

M5 Hiper EndoFree Plasmid Midi Kit

超量无内毒素质粒中提试剂盒

使用说明书

产品名称	单位	货号
M5 Hiper EndoFree Plasmid Midi Kit	10T	MF112-01

【储存条件】 常温运输，室温（15~30°C）保存。

【产品简介】

本试剂盒专门用于从 15-50 ml 菌液中高效、快速提取质粒。在碱裂解法裂解细胞的基础上，采用独特的硅基质膜吸附技术，高效专一的结合质粒 DNA，每个吸附柱最高可吸附 **250 µg** 的质粒 DNA；同时采用特殊的缓冲液系统和除内毒素过滤器，有效去除内毒素、基因组 DNA、RNA、蛋白等杂质。由本试剂盒所得质粒纯度高、质量稳定，可用于细胞转染，同时也可用于 DNA 测序，PCR，体外转录，内切酶消化等实验。

【产品组份】

	10T
Buffer P1	30 ml
Buffer P2	30 ml
Buffer E3	30 ml
Buffer PS	15 ml
Buffer PW (concentrate)	10 ml
Endo-Free Buffer EB	30 ml
RNase A (10 mg/ml)	600 µl
Endo-Remover FX	10
Plungers	10
Spin Columns DX	
With Collection Tubes	10
Centrifuge Tubes (15 ml)	10

【实验准备】

- 所有组分可在干燥、室温（15-30°C）环境稳定保存 1 年，将吸附柱置于 2-8°C 可保存更长时间，加入 RNase A 的 Buffer P1 置于 2-8°C 可稳定保存 6 个月。
- 第一次使用前，将 RNase A 溶液全部加入到 Buffer P1 中，混匀，置于 2-8°C 保存，使用前需在室温中放置一段时间，恢复至室温后使用。
- 第一次使用前应按照试剂瓶标签的说明在 Buffer PW 中加入无水乙醇。
- 使用前请先检查 Buffer P2 和 Buffer E3 是否出现结晶或沉淀，如有结晶或沉淀现象，可在 37°C 水浴几分钟，即可恢复澄清。
- 注意不要直接接触 Buffer P2 和 Buffer E3，使用后应立即盖紧盖子。
- 提取质粒的量和纯度与细菌培养浓度、菌株种类、质粒大小、质粒拷贝数等因素有关。
- 使用 Buffer PS 处理过的吸附柱最好立即使用，避免放置时间过长影响使用效果。

【自备试剂】 无水乙醇、异丙醇

【操作步骤】

1. 取 15-50 ml 过夜培养的菌液，加入离心管（自备）中， $\sim 5,000\times g$ 离心 10 分钟收集细菌，尽量吸弃全部上清。
2. 向留有菌体沉淀的离心管中加入 2.5 ml Buffer P1（请先检查是否已加入 RNase A），用移液器或涡旋振荡器充分混匀，悬浮细菌沉淀。

注意：如果菌块未彻底混匀，将会影响裂解效果，使提取量和纯度偏低。

3. 向离心管中加入 2.5ml Buffer P2，温和上下颠倒混匀 8-10 次，使菌体充分裂解，室温放置 3-5 分钟。此时溶液应变得清亮粘稠。

注意：温和混匀，不要剧烈震荡，以免打断基因组 DNA，造成提取的质粒中混有基因组 DNA 片段。如果溶液未变得清亮，提示可能菌量过大，裂解不彻底，应减少菌体量。

4. 向离心管中加入 2.5ml Buffer E3，立即上下颠倒混匀 8-10 次，此时出现白色絮状沉淀。

注意：Buffer E3 加入后应立即混匀，避免产生局部沉淀。

5. 安装过滤器（Endo-Remover FX）的滤帽，将步骤 4 所得溶液转移至过滤器中，待白色絮状沉淀浮于溶液上层，去掉过滤器的滤帽，对准干净的 15 ml 离心管（自备），慢慢推动推柄（Plungers）过滤，使溶液尽可能多的通过，将滤液收集在离心管中。

6. 向滤液中加入 1/3 溶液体积的异丙醇，上下颠倒混匀。

7. 柱平衡：向已装入 15 ml 离心管的吸附柱（Spin Columns DX）中加入 1 ml Buffer PS， $2500\times g$ 离心 2 分钟，倒掉离心管中的废液，将吸附柱重新放回离心管中。

8. 将步骤 6 中滤液与异丙醇的混合溶液转移至已平衡的吸附柱（已装入收集管）中。

9. $2500\times g$ 离心 1 分钟，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。

注意：吸附柱的最大容积为 4 ml，所以第 8 步中所得溶液分 2 次过柱。

10. 向吸附柱中加入 2 ml Buffer PW（请先检查是否已加入无水乙醇）， $2500\times g$ 离心 1 分钟，倒掉收集管中的废液。

11. 重复步骤 10。

12. 将吸附柱重新放回收集管中， $2500\times g$ 离心 2 分钟，倒掉废液，将吸附柱置于室温干燥 5 分钟。

注意：这一步的目的是将吸附柱中残余的乙醇去除，乙醇的残留会影响后续的酶促反应（酶切、PCR 等）

13. 将吸附柱置于一个新的 15 ml 离心管中，向吸附膜的中间部位加入 0.5-1 ml Endo-Free Buffer EB，室温放置 2-5 分钟， $2500\times g$ 离心 2 分钟，将质粒溶液收集到离心管中。 -20°C 保存质粒。

注意：1) 为了增加质粒的回收效率，可将得到的溶液重新加入到吸附柱中，室温放置 2-5 分钟， $2500\times g$ 离心 2 分钟，将质粒溶液收集到离心管中。

2) 质粒拷贝数较低或 >10 kb 时，Endo-Free Buffer EB 在 $65-70^{\circ}\text{C}$ 水浴预热，可以增加提取效率。

【备注】

本产品仅供科研使用。在确认产品质量出现问题时，本公司承诺为客户免费更换等量的质量合格产品。