

M5 Easy-High EndoFree Low copy Plasmid Maxi Kit

“易高得”无内毒素低拷贝偏大质粒质粒大提使用说明书

产品名称	单位	货号
M5 Easy-High EndoFree Low copy Plasmid Maxi Kit	10T	MF2085-01

【储存条件】 RNase A、Lysozyme Solution 置于-20℃保存，其他组分室温保存。若溶液 II 产生沉淀，应在使用前置于 37℃下溶解沉淀，澄清后使用。加入 RNase A 后的 Solution I 应置于 2~8℃保存。

【产品简介】

本试剂盒用于低拷贝无内毒素质粒大量制备。在碱裂解处理后，质粒从菌体中释放出来，并特异、高效地被离心柱硅胶膜吸附，并在柱上去除内毒素，操作简单。通过去蛋白液和漂洗液的清洗可去除蛋白及其他杂质，最后得到无内毒素质粒 DNA（内毒素残留≤1 EU/μg）。所得质粒可直接用于酶切、转化、PCR、测序、细胞转染等分子生物学实验。质粒提取得率不仅与试剂盒有关，也与质粒大小有关，**质粒越大，拷贝数越低，得率就越低**。小质粒（<10kb）拷贝数高，100ml 菌液通常能提到 500-1500ug 质粒；大质粒（>10kb）拷贝数低，200ml 菌液通常能提到 200-600ug 质粒。本试剂盒**真实提取效率**优于市面上其他品牌。**谨防其他品牌 OD 虚高，请跑电泳确定提取的质量和浓度，而不是只看 OD 值。OD 值无法确保提取质粒的质量**，因为 RNA 污染或蛋白污染都会增大 OD 值，对 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 和 OD₂₆₀/OD₂₃₀ 比值影响很小。

【产品特色】

1. 裂解物离心彻底，可以直接倒，免去推柄除蛋白，**极大降低蛋白污染导致 OD 值虚高的问题**。
2. 不用推柄，操作简便，对女同学操作友好，而且极大节约时间，**比竞品缩短 1 个小时**；
3. 内毒素去除简单：柱上去除内毒素，方便快捷，清除彻底，更适合下游转染。

【产品组份】

试剂盒成分	10 T
Buffer BL	25 ml
Solution I	100 ml
Solution II	100 ml
Solution N3	100 ml
ToxinOut Buffer	60 ml
Buffer WB2 (concentrate)	60 ml
Buffer EB	30 ml
RNase A (10 mg/ml)	1 ml
Lysozyme Solution (50 mg/ml)	10x1ml
MaxiSpin Columns with Collection Tubes (50 ml)	10 个
Collection Tubes (50 ml)	10 个

注意：使用前将全部 RNase A 溶液加到 Solution I 中混合均匀，2-8℃保存；按要求在 Buffer WB2 中加入无水乙醇）

【注意事项】

1. 细菌培养时间一般为 12-16 小时（用锥形瓶或者试管摇菌，**摇瓶的体积是菌液量的 3-5 倍**，留够足够的空间让细菌接触空气，**利于细菌生长**），如接种量大则应减少培养时间，过度培养会降低质粒质量甚至导致质粒 DNA 突变；
2. 培养好的菌液及时收集菌体并提取质粒；若摇好的菌不能马上提质粒，尽量收集菌体后置于 4 度保存，而不是保存菌液。
3. 每次使用时都要注意 Solution II 和 N3 是否形成沉淀，如有沉淀 37℃加热溶解后再用；
4. 质粒的产量跟细菌量、质粒拷贝数、质粒大小和操作规范程度密切相关。

【操作步骤】

柱平衡：向吸附柱中（吸附柱放入收集管中）加入 2.5 ml 的平衡液 BL，8,000 rpm 离心 2 min，弃收集管中滤液，将吸附柱重新放回收集管中。（请使用当天处理过的柱子，别嫌这步麻烦，它能带来近 10-20%回收效率的提升，强烈建议不要省去此步！）

1. 取 100-150 ml（低拷贝质粒可收集更多菌液，最高 200ml 菌液）过夜培养的菌液，室温 8,000 rpm 离心 2 min，弃上清。

注意：如果菌液浓度高，收集 100ml 菌液的菌体即可；菌液浓度低，收集 150-200ml 菌液。以管底菌体（1.5cm²）大小为宜。

2. 加入 10 ml Solution I，旋涡震荡或用移液器充分吹打使菌体重悬均匀，呈现出均匀混浊的棕红色。

注意：菌体沉淀一定要悬浮均匀，如有未彻底悬浮的菌块会影响裂解，导致提取的质粒浓度及纯度降低。

3. 加入 1ml 溶菌酶溶液使其终浓度为 5 mg/ml，混匀，37°C处理 30 min。

注意：加入溶菌酶的浓度和处理的时间可根据不同的菌株和具体实验条件进行调整。

4. 加入 10 ml Solution II，颠倒混匀使菌体完全裂解，直到溶液变成清亮、粘稠的紫红色。

注意：不可 vortex 但适当用点力度颠倒，以免造成基因组 DNA 片段的污染，所用时间不要超过 5 min，以免质粒受到破坏，如未完全变得清亮，可能是菌体太多，可增加 Solution II 的用量，在后续的操作中 Solution N3 的用量也要相应增加。

5. 加入 10 ml Solution N3，立即适当用点力度颠倒混匀，可见红黄相间的絮状物产生，继续混匀直到完全变为黄色，静置 2min。然后 10,000 rpm 离心 10 min，将上清转移至干净离心管（自备）中，注意不要带入沉淀。

注意：1) Solution N3 加入后，如果上清中还有紫色漂浮物，说明中和不充分，继续稍用力混匀至溶液颜色完全变为澄清的黄色。
2) 离心后在最上层可能会形成一层致密的漂浮膜，注意不要倒入吸附柱。

（如果实验室离心机采用吊篮式，不是固定转子，转速达不到 10000rpm，可以采用吊篮离心的最大转速 4250g，离心 10 分钟）

6. 加入 0.3 倍滤液体积的异丙醇，上下颠倒混匀。

注意：加入异丙醇有时会有质粒凝结核析出，不要丢弃，一同倒入吸附柱中，切勿加入过多异丙醇，容易导致 RNA 污染。

7. 将步骤 5 中液体与异丙醇的混合溶液转移到平衡好的吸附柱中（使用当天用平衡液处理的吸附柱，放入 50 ml 收集管中），8,000 rpm 离心 1 min（不要超过 1min，以免离心时间长膜起皱），弃收集管中的滤液。

注意：吸附柱的最大容积为 15 ml，所以上步中所得溶液分多次过柱。如果离心机转子倾角较大时，建议加入吸附柱的溶液体积不超过 10 ml，以防发生漏液现象。

8. 向吸附柱中加入 5 ml ToxinOut Buffer，室温静置 5 min，8,000 rpm 离心 1 min，弃收集管中滤液。

9. 加入 10 ml Buffer WB2，室温 8,000 rpm 离心 1 min，弃收集管中滤液。

注意：Buffer WB2 为浓缩液，按要求加入无水乙醇，用后应立即盖紧瓶盖，以防酒精挥发。

10. 加入 5 ml Buffer WB2，室温 8,000 rpm 离心 1 min，弃收集管中滤液。

11. 室温 8,000 rpm 离心 5 min，甩干残留液体。

12. 将离心吸附柱置于一个新的 50 ml 塑料离心管中，打开管盖，放置 5 min，使乙醇彻底挥发干净。

13. 加入 1-2 ml 洗脱液 Buffer EB（可以 60 度水浴预热），室温放置 2 min，8,000 rpm 离心 2 min，离心管底溶液即质粒 DNA。

注意：一次洗脱仅能回收大概 60%左右的质粒，为增加洗脱效率（尤其是>5kb 以上的质粒），可将得到的质粒溶液重新加入到吸附柱中重复收集三到四次，以获得最大洗脱效率。Buffer EB 成分单一，不会影响下游的酶切，转染或者其他分子生物学实验，请放心使用。不提倡用去离子水洗脱，如必须使用去离子水洗脱，请先用 NaOH 调整其 pH 值在 8.0 - 8.5 之间后才用于洗脱。

【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。

北京市昌平区回龙观龙域北街 10 号院 1 号楼四层 422-1 室（创集合大楼）

技术热线：（86）13811994670