

M5 Multi-color EndoFree Plasmid Midi Kit

多彩无内毒素质粒中提（小提中量）试剂盒

使用说明书

产品名称	单位	货号
M5 Multi-color EndoFree Plasmid Midi Kit	50T	MF113-01

【储存条件】 常温运输，室温（15~30℃）保存。

【产品简介】

本试剂盒适用于无内毒素质粒 DNA 的小提中量制备。菌体经碱裂解、高盐、低 pH 处理，质粒可从菌体中释放出来，并特异、高效地被离心柱硅胶膜吸附。再经内毒素清除液清洗，可将绝大多数菌体内毒素清除干净，然后通过清洗液的清洗可去除蛋白及其他杂质，最后在低盐、高 pH 条件下洗脱得到高纯度无内毒素的质粒 DNA。使用本试剂盒可从 5 ~ 12 ml 过夜培养的菌液中纯化得到高达 70 ug 的无内毒素质粒 DNA，所得质粒除可用于常规分子生物学实验外，还适合细胞株的转染实验。

【产品特点】

1. 快捷、高效：操作简便，得率高，节约时间；
2. 纯度高：沉淀致密，去杂干净；
3. 内毒素去除简单：柱上去除内毒素，方便快捷，清除干净。

【产品组份】

试剂盒成分	50T
Buffer BL	25 ml
Solution I	30 ml
Solution II	30 ml
Solution N3	30 ml
ToxinOut Buffer	30 ml
Buffer WB2 (concentrate)	15 ml
Buffer EB	15 ml
RNase A (10 mg/ml)	300 ul
MiniSpin Column With Collection Tubes	50 套

注意：1、使用前将全部 RNase A 溶液加到 Solution I 中混合均匀，2 ~ 8℃保存； 2、按要求在 Buffer WB2 中加入无水乙醇。

【实验准备及自备试剂耗材】

1. 细菌培养时间一般为 12 ~ 16 小时，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. 每次使用时都要注意 Solution II 和 N3 是否形成沉淀，如有沉淀 37℃溶解后再用；
3. 注意溶液 I、II 和 N3 的用量比例，若细菌量增大，需按比例放大这些溶液的使用量；
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。
5. 自备异丙醇（用于基因组 DNA 沉淀）
6. 自备 2mL 或 5mL 离心管（用于 Solution I/II/III 和异丙醇液体混合）

【操作步骤】

柱平衡：向吸附柱中（吸附柱放入收集管中）加入 400 μ l 的平衡液 BL，12,000 rpm (-13,400 $\times$ g) 离心 1 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）

（请大家别嫌这步麻烦，它是为了盒子放置时间长不用，处理一下效果如新，减少浪费。如果新开封马上用，可以不做柱平衡）

1. 取 5 ~ 12 ml 过夜培养的菌液，室温 12,000 rpm 离心 1 min，尽量将上清去除干净。

注意：根据菌液的浓度决定取液量，浓度高时取 1.5 ml 菌液离心即可，浓度低时可多收集一次。

2. 加入 500 μ l Solution I，旋涡震荡或用移液器充分吹打使菌体重悬均匀。

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 500 μ l Solution II，温和颠倒混匀使菌体完全裂解，直到溶液变成清亮、粘稠。

注意：不可剧烈震荡，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。

4. 加入 500 μ l Solution N3，立即温和颠倒混匀，可见红黄相间的沉淀物产生，继续混匀直到完全变为黄色，室温静置 2 min，然后 12,000 rpm 离心 5 min。

注意：Solution N3 加入后应立即混合，避免产生局部沉淀，如果上清中还有紫色漂浮物，说明复性不充分，继续混匀至溶液颜色完全变为澄清的黄色。

5. 小心将上清液转移到一个新的离心管中，加入 0.3 倍的异丙醇，混匀。然后将上述液体转入离心吸附柱中，静置 2 min，让质粒 DNA 与吸附柱中的硅胶膜充分结合。12,000 rpm 离心 0.5 min，弃收集管中滤液。（**注意：**吸附柱一次只能转移 750 μ l 液体，剩余液体分次转入）

6. 向吸附柱中加入 500 μ l ToxinOut Buffer，室温静置 5 min，12,000 rpm 离心 1 min，弃收集管中滤液。

7. 加入 600 μ l Buffer WB2，室温 12,000 rpm 离心 0.5 min，弃收集管中滤液。

注意：Buffer WB 2 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。

8. 加入 500 μ l Buffer WB2，室温 12,000 rpm 离心 2 min，甩干残留液体。

注意：此步不能省略，否则残留乙醇会影响质粒的后续使用。

9. 将离心吸附柱置于一个新的 1.5 ml 塑料离心管（自备）中，加入 100 ~ 300 μ l 的洗脱液 Buffer EB，室温放置 2 min。12,000 rpm 离心 1 min，离心管底溶液即质粒 DNA。

注意：为增加洗脱效率，可将洗脱液在 60 $^{\circ}$ C 预热。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。为了增加质粒回收率，可将得到的溶液重新加入到离心管中，室温放置 2 min，再次离心收集。

【低拷贝或大质粒 (>10 kb) 提取】

如果所提质粒为低拷贝质粒，或大于 10 kb 的大质粒，或提取农杆菌质粒，或提取革兰氏阳性菌质粒，应加大菌体使用量，使用 5 ~ 12 ml 过夜培养物，同时按照比例增加 Solution I、II、N3 的用量，洗脱液 Buffer EB 应在 60 $^{\circ}$ C 水浴预热，在吸附和洗脱时可以适当延长时间，以增加提取效率。其它步骤相同。

【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。