

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
S6 Multi-color EndoFree Plasmid Midi Kit	50T, 200T	SP0110

【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 ~ 10 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	200
Buffer BL	25 ml	100 ml
Solution I	30 ml	120 ml
Solution II	30 ml	120 ml
Solution N3	30 ml	120 ml
ToxinOut Buffer	30 ml	120 ml
Buffer WB2 (concentrate)	15 ml	60 ml
Buffer EB	15 ml	60ml
RNase A (10 mg/ml)	300 ul	1.2ml
MiniSpin Column With Collection Tubes	50 套	200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。

【实验准备】

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. 每次使用时都应注意 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。

【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 ~ 10 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 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，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 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、粘稠的紫红色。

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。转移上清液到一干净的 2 ml 离心管中，**加入 0.3 倍体积的异丙醇**，混匀。

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. 小心将混合液转移到离心吸附柱中，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 0.5min，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 2 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 ~ 200 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。如需使用去离子水洗脱，可用 NaOH 调整其 pH 值在 7.0 - 8.5 之间，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 ~ 10 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 10 延长时，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。