

目 录

简 介-----	2
原 理-----	2
组 成-----	3
保质期-----	4
准备工作-----	4
1. HiPure M13 DNA Mini Kit 离心方案-----	5
2. HiPure M13 DNA 96 Kit 离心方案-----	7
3. HiPure M13 DNA Maxi Kit 离心方案-----	9
常见问题回答-----	11

版本: 2010-10

简介

HiPure M13 DNA Kits 为 M13 单链 DNA 制备提供了一种简单且经济的方法。试剂盒采用硅胶柱纯化技术，可在 30-60 分钟完成多个样品抽提工作，操作过程不需接触酚氯仿等有机物抽提，也不需用到耗时的醇类沉淀。纯化的 DNA 可直接用于自动测序，酶切，PCR，标记等。

	M13 DNA Mini Kit	M13 DNA 96 Kit	M13 DNA Maxi Kit
产品编号	P1171	P1172	P1173
培养液用量	1-3 ml	1-1.5 ml	200 ml
柱子结合能力	20 µg	20µg	500 µg
使用的离心机	小型离心机	96 孔板离心机	桶状离心机
柱子类型	1.5 ml 柱子	96 孔板	50 ml 柱子
产量	2-20 µg	1-10 µg	300-500 µg
洗脱体积	15-50 µl	50-100 µl	1-2 ml

原理

HiPure 硅胶柱是采用高结合力的玻璃纤维滤膜为基质。滤膜在高浓度离子化剂(如盐酸胍或异硫氰酸胍)条件下，可通过氢键和静电等物理作用吸附核酸，而蛋白质或其它杂质不被吸附而去除。吸附了核酸的滤膜经洗涤去除蛋白质和盐，最后可以用低盐缓冲液(如 Buffer TE)或水，洗脱出滤膜上吸附的核酸。得到的核酸纯度高，可直接用于各种下游实验。

HiPure M13 DNA Kit 采用硅胶柱纯化方式。M13 噬菌体感染液经离心去除细菌后，加入 Buffer MP1 过滤吸附 M13 噬菌体颗粒；加入 Buffer MP2 至滤膜上裂解 M13 噬菌体并吸附 M13 单链 DNA，而蛋白质则不被吸附而去除；滤膜经洗涤液去除杂质后，最后 DNA 被低盐缓冲液(10Mm Tris, pH8.5)洗脱。纯化的 DNA 可直接用于自动测序，酶切，PCR，标记等。

组 成

HiPure M13 Mini Kit

Cat.No.	P1171-01	P1171-02	P1171-03
Package	10 次	50 次	250 次
Buffer MP1	10 ml	40 ml	200 ml
Buffer MP2	15 ml	60 ml	270 ml
Buffer PW2*	6 ml	20 ml	2 x 50 ml
Elution Buffer	5 ml	20 ml	60 ml
HiPure DNA Mini Column II	5	50	250
2 ml Collection Tube	5	50	250

HiPure M13 96 Kit

Cat.No.	P1172-01	P1172-02	P1172-03
Package	1 x 96 次	4 x 96 次	20 x 96 次
Buffer MP1	50 ml	150 ml	700 ml
Buffer MP2	120 ml	500 ml	4 x 500 ml
Buffer PW2*	50 ml	3 x 50 ml	8 x 100 ml
Elution Buffer	30 ml	100 ml	500 ml
HiPure DNA Plate	1	4	20
2 ml Collection Plate	1	2	4
0.5ml Collection Plate	1	4	20

组 成

HiPure M13 Maxi Kit

Cat.No.	P1173-01	P1173-02	P1173-03
Package	2 次	10 次	50 次
Buffer MP1	100 ml	2 x 250 ml	5 x 500 ml
Buffer MPX2	20 ml	100 ml	500 ml
Buffer MPX3	20 ml	100 ml	500 ml
Buffer MPX4	20 ml	100 ml	500 ml
Buffer PW2*	20 ml	50 ml	4 x 100 ml
Elution Buffer	5 ml	30 ml	200 ml
HiPure DNA Maxi Column II	2	10	50
50 ml Collection Tube	2	10	50

保 质 期

HiPure M13 DNA 提取试剂盒可在室温下（15-25℃）干燥保存 12 个月。长期保存时需置于 2-8℃。

1. HiPure M13 DNA Mini Kit 离心方案(D1171)

该方案采用离心方法，适合于从 1-3ml M13 噬菌体培养液中提取 2-20 μ g 高纯度的 M13 单链 DNA。以下离心条件都必须在室温下进行操作。

准备工作

- 无水乙醇
- 小型离心机($\sim 12,000 \times g$)
- 1.5ml 灭菌离心管和灭菌枪头
- LB 培养液和相应的培养管

1. 将 M13 噬菌体原液接种于 1-5ml 处于指数生长期的细菌培养液中。37 $^{\circ}$ C 振荡培养 5~6 小时。

用于 M13 噬菌体培养的菌株一般是 TG1, JM101, JM109 或其它 JM100 系列的菌株。在 M13 感染之前，细菌培养时间应为 6-8 小时，过长的培养时间会导致感染效率下降。菌株必须是平板上新鲜划线培养的单菌落。甘油或液体培养的菌株有可能会丢失 F 因子而导致感染效率下降。

2. 取 **1-3ml M13 噬菌体培养液**。10,000 $\times g$ 离心 5 分钟(或 5000rpm 离心 15 分钟)。小心转移上清液至 5ml 离心管中。

转移上清液时不要扰动细菌沉淀。细菌污染会带来细菌 DNA 和 M13 双链 DNA 的污染。可重复离心一次去除上清液中的细菌颗粒。

3. 加入 **0.2 倍体积 Buffer MP1 至上清液，颠倒 15 次混匀**。室温静置 10 分钟。

4. 将 HiPure DNA Mini Column II 柱子套在收集管中。**转移混合液($\leq 750\mu$ l) 至柱子中**。8,000 $\times g$ 离心 30-60 秒。

5. 倒弃滤液，把柱子套回收集管中。**转移混合液($\leq 750\mu$ l) 至柱子中**。8,000 $\times g$ 离心 30-60 秒。重复此步直至把所有混合液都转移至柱子中过滤完毕。

HiPure DNA Mini Column I 一次能装 750 μ l 溶液。处理 3ml 培养液时，需 5 次过柱。

6. 倒弃滤液，把柱子套回收集管中。**加入 500 μ l Buffer MP2 至柱子中。静置 2 分钟**。8,000 $\times g$ 离心 30-60 秒；

7. 倒弃滤液，把柱子套回收集管中。**加入 500 μ l Buffer MP2 至柱子中**。8,000 $\times g$ 离心 30-60 秒；

8. 倒弃滤液，把柱子套回收集管中。加入 **500 μ l Buffer PW2 (已用无水乙醇稀释)**至柱子中。8,000 \times g 离心 30-60 秒；
注：使用前 **Buffer PW2** 必须用无水乙醇稀释。稀释条件请按瓶子上的标签指示。若低温保存，请恢复至室温后使用。
9. 倒弃滤液，把柱子套回收集管中。加入 **500 μ l Buffer PW2** 至柱子中。8,000 \times g 离心 30-60 秒；
10. 倒弃滤液，把柱子套回收集管中。12,000 \times g 离心 2 分钟。
注：不要忽略此步。这一步可去除残留在柱子的乙醇。残留的乙醇会影响下游的实验。
11. 把柱子套在灭菌的 1.5ml 离心管中。加入 **20-50 μ l Elution Buffer** 或灭菌水至柱子的膜中央。静置 3 分钟，12,000 \times g 离心 1 分钟以洗脱 DNA。
12. 弃去柱子，把 M13 DNA 保存于-20 $^{\circ}$ C。
注：DNA 产量取决于培养液体积和 M13 噬菌体的滴度。一般 3ml M13 培养液可得到 5-15 μ g 的单链 DNA。

2. HiPure M13 96 Kit 离心方案(D1172)

该方案采用离心方法，适合于从 1~1.5ml M13 噬菌体培养液中提取 3~10 µg 高纯度的 M13 单链 DNA。以下离心条件都必须在室温下进行操作。

准备工作

- 无水乙醇
- 96 孔板离心机(4,500 × g)
- LB 培养液和相应的培养管

1. 将 M13 噬菌体原液接种于 1-3ml 处于指数生长期的细菌培养液中。37°C 振荡培养 5-6 小时。

用于 M13 噬菌体的菌株一般是 TG1, JM101, JM109 或其它 JM100 系列的菌株。在 M13 感染之前，细菌培养时间应为 6-8 小时，过长的培养时间会导致感染效率下降。菌株必须是平板上新鲜划线培养的单菌落。甘油或液体培养的菌株有可能会丢失 F 因子而导致感染效率下降。

2. 取 1-1.5ml M13 噬菌体培养液。3,000~4,500 × g 离心 15 分钟。小心转移上清液(1~1.5ml)至新的 96 孔板中。

转移上清液时不要扰动细菌沉淀。细菌污染会带来细菌 DNA 和 M13 双链 DNA 的污染。可重复离心一次去除上清液的细菌颗粒。

3. 加入 0.2 倍体积 Buffer MP1 至上清液中，吸打混匀 5~6 次。室温静置 15 分钟。

4. 将 HiPure DNA Plate 套在 2ml 收集管中。转移~0.75ml 混合液至 96 孔结合板中。3,000~4,500 × g 离心 3 分钟。

5. 倒弃滤液，把结合板套回收集管中。转移剩余的混合液至 96 孔结合板中。3,000~4,500 × g 离心 3 分钟。

6. 倒弃滤液，把结合板套回收集管中。加入 500µl Buffer MP2 至柱子中。3,000~4,500 × g 离心 3 分钟。

7. 倒弃滤液，把结合板套回收集管中。加入 500µl Buffer MP2 至柱子中，静置 3 分钟，3,000~4,500 × g 离心 3 分钟。

8. 倒弃滤液，把结合板套回收集管中。加入 **600 μ l Buffer PW2 (已用无水乙醇稀释)**至柱子中。3,000~4,500 \times g 离心 3 分钟。
使用前 Buffer PW2 必须用无水乙醇稀释。稀释条件请按瓶子上的标签指示。若低温保存，请恢复至室温后使用。
9. 倒弃滤液，把结合板套回收集管中。加入 **600 μ l Buffer PW2** 至柱子中。3,000~4,500 \times g 离心 3 分钟。
10. 倒弃滤液，把结合板套回收集管中。4,500 \times g 离心 10 分钟。
不要忽略此步。这一步可去除残留在柱子的乙醇。残留的乙醇会影响下游的实验。
11. 倒弃滤液，把结合板套回新的收集管中。加入 **75 μ l Elution Buffer** 至膜中央。静置 3 分钟，4,500 \times g 离心 3 分钟洗脱 DNA。
12. 弃去 M13 96 孔板。把 M13 ssDNA 保存于-20 $^{\circ}$ C。
DNA 产量取决于培养液体积和 M13 噬菌体的滴度。一般 3ml M13 培养液可得到 5-8 μ g 的单链 DNA。

3. HiPure M13 Maxi Kit 离心方案(D1173)

该方案采用离心方法，适合于从 200ml M13 噬菌体培养液中提取 500 µg 高纯度的 M13 单链 DNA。以下离心都必须在室温下进行。

1. 将 M13 噬菌体原液接种于 200ml 处于指数生长期的细菌培养液中。37°C 振荡培养 5~6 小时。
用于 M13 噬菌体培养的菌株一般是 TG1, JM101, JM109 或其它 JM100 系列的菌株。在 M13 感染之前，细菌培养时间应为 6-8 小时，过长的培养时间会导致感染效率下降。菌株必须是平板上新鲜划线培养的单菌落。甘油或液体培养的菌株有可能会丢失 F 因子而导致感染效率下降。
2. 取 200ml M13 噬菌体培养液。13,000 x g 离心 10 分钟去除细菌。转移上清液至新的高速离心管中。
转移上清液时不要扰动细菌沉淀。细菌污染会带来细菌 DNA 和 M13 双链 DNA 的污染。可重复离心一次去除上清液中的细菌。
3. 加入 0.2 倍体积 Buffer MP1 至上清液中，颠倒混匀 10~15 次。冰上静置 60 分钟。
4. 13,000 x g 离心 10 分钟收集 M13 噬菌体颗粒。小心倒弃上清液。
5. 加入 8ml Buffer MPX2，涡旋充分重悬噬菌体颗粒。
6. 加入 8ml Buffer MPX3，颠倒 15~20 次混匀。70°C 水浴 20 分钟裂解噬菌体颗粒。
7. 加入 8ml Buffer MPX4，颠倒混匀 15~20 次混匀。冰上放置 10 分钟。
8. 13,000 x g 离心 10 分钟去除沉淀。转移上清液至新的离心管中。
9. 加入 12ml 无水乙醇至上清液中，颠倒 15~20 次混匀。室温静置 5 分钟。
10. 将 M13 Maxi 柱子套在 50ml 收集管中，转移一半混合液至柱子中。3,000~4,500 x g 离心 3 分钟。
11. 倒弃滤液，把 M13 Maxi 柱子套在 50ml 收集管中。转移剩余的混合液至柱子中。3,000~4,500 x g 离心 3 分钟。
12. 倒弃滤液，把 M13 Maxi 柱子套在 50ml 收集管中。加入 15 ml Buffer PW2

(已用无水乙醇稀释)至柱子中。3,000~4,500 × g 离心 3 分钟。

注：使用前 Buffer PW2 必须用无水乙醇稀释。稀释条件请按瓶子上的标签指示。
若低温保存，请恢复至室温后使用。

- 13. 倒弃滤液，把 M13 Maxi 柱子套在 50ml 收集管中。4,500 × g 离心 15 分钟。**

不要忽略此步。这一步可去除残留在柱子的乙醇。残留的乙醇会影响下游的实验。

- 14. 把 M13 Maxi 柱套回新的 50ml 收集管中，加入 1ml 预热至 65°C Elution Buffer 至膜中央。静置 10 分钟，4,500 × g 离心 3 分钟以洗脱 DNA。**

- 15. 弃去 M13 柱。把 M13 ssDNA 保存于 -20°C。**

DNA 产量取决于培养液体积和 M13 噬菌体的滴度。一般 3ml M13 培养液可得到 5-8μg 的单链 DNA。

常见问题回答

该列表可能有利于解决提取过程所碰到的问题。此外，Magen 的技术人员也可以随时为您提供服务，若您对试剂盒存在问题或建议，或您在分子生物学碰到问题，都请您联系我们。我们将竭尽全力为您排忧解难。

现象	原因及解决方法
产量低或无产量	
细菌培养时间过长	细菌培养时间不要超过 6-8 小时。过长培养的细菌会导致 M13 噬菌体感染效率降解
M13 噬菌体原液滴度低	提高 M13 噬菌体的滴度，以提高感染效率
Buffer PW2 没有用乙醇稀释	Buffer PW2 在使用前须用无水乙醇进行稀释。收到试剂盒后，应尽快把乙醇加到 Buffer W2 中，以防止微生物的污染；
洗脱时有问题	洗脱核酸最好使用 Elution Buffer (10mM Tris, pH8.5)，灭菌水因 pH 较低，显酸性，而导致洗脱效率下降。洗脱液必须加到柱子的膜的中央；
下游实验结果不理想	
盐分污染	加入 Buffer W2 后，静置 5 分钟后，再离心
乙醇污染	确保空柱离心速度高于或等于 12,000xg，离心时间为 2 分钟。
膜材料脱落	硅胶膜在离心过程中可能会发生脱落。脱落到质粒中硅胶膜是不溶解的，可通过 12,000xg 离心 2 分钟去除。

Note: