

目 录

简 介 ----- 2

原 理 ----- 2

组 成 ----- 3

保质期 ----- 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: 2024-01

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 | 10       | 50       | 250       |
| 2 ml Collection Tube      | 10       | 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 $\mu$ 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 $\mu$ 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 $\mu$ 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 $\mu$ 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 $\mu$ l Buffer PW2 (已用无水乙醇稀释)至柱子中。**8,000  $\times$  g 离心 30-60 秒；  
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 $\mu$ 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。  
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 $\mu$ 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 $\mu$ 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℃ 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 600µl Buffer PV2 (已用无水乙醇稀释)**

**至柱子中。**  $3,000\sim 4,500 \times g$  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 $\mu$ l Buffer PW2 至柱子中。**  
 $3,000\sim 4,500 \times g$  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 $\mu$ 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  $-20^{\circ}\text{C}$ 。  
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 $\mu\text{g}$  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 × 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 × 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 × 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 × 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 × 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 PV2 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。我们将竭尽能力为您排忧解难。

| 现 象                | 原因及解决方法                                                                             |
|--------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>产量低或无产量</b>     |                                                                                     |
| 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 PW2 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。 |
| <b>下游实验结果不理想</b>   |                                                                                     |
| 盐分污染               | 加入 Buffer PW2 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。                             |