

# Endo-free Plasmid Miniprep Kit 去内毒素质粒小提试剂盒（离心柱型）

Technical literature is available at: [www.mesgenbio.com](http://www.mesgenbio.com). E-mail MesGen Technical Services if you have questions on use of this system: [tech@mesgenbio.com](mailto:tech@mesgenbio.com)

**MESGEN**<sup>™</sup>  
INNOVATION BIOTECHNOLOGY

## 产品简介

本试剂盒采用碱裂解法裂解细菌，再通过离心吸附柱在高盐和低pH条件下高效结合溶液中的DNA。离心吸附柱中采用的特制玻纤膜材料可高效、专一吸附DNA。试剂盒采用优化后的内毒素特异去除试剂Endo-Out Solution，有效降低质粒溶液中的内毒素成分（低于0.1EU/μg质粒DNA）。本试剂盒适用于提取1-5 ml过夜培养的大肠杆菌，质粒提取得率和质量与宿主菌的种类和培养条件、细胞的裂解、质粒拷贝数、质粒的稳定性、抗生素等因素有关。使用本试剂盒提取的质粒DNA。可适用于下游各种高要求操作实验，包括酶切、PCR、测序、连接、转化、文库筛选、体外翻译、细胞转染等。

## 试剂盒组成

产品组成	MPD2100-50T	MPD2100-100T	MPD2100-250T
Solution I	15ml	30ml	70ml
Solution II	15ml	30ml	70ml
Solution III	50ml	100ml	120ml × 2
Solution PE	30ml	60ml	125ml
Endo-Out Solution	6ml	12ml	30ml
DNA Wash Buffer	12ml ( Add 48ml ethanol )	24ml ( Add 96ml ethanol )	12ml ( Add 115ml ethanol )
Elution Buffer	10ml	20ml	50ml
RNase A	150μl	300μl	750μl
吸附柱	50个	50个 × 2	50个 × 5
收集管	50个	50个 × 2	50个 × 5

## 储存条件

试剂盒可置于室温（15-25℃）干燥条件下，可保存12个月，更长时间的保存可置于4℃。

注意：第一次使用前将RNase A加入Solution I中混匀后建议置于4℃保存；Solution III 和Endo-Out Solution 置于4℃保存；

## 注意事项

- Solution I** 在使用前应先加入RNase A（将试剂盒中提供的RNase A全部加入），混匀后4℃保存。
- Solution II** 如有混浊现象，可在37℃水浴中加热几分钟，即可恢复澄清。使用后应立即盖紧盖子，以避免空气中的CO<sub>2</sub>与**Solution II** 中的NaOH反应，从而造成溶液裂解效率下降。
- DNA Wash Buffer** 在使用前先加入无水乙醇（按试剂盒包装规定的体积加入）。
- 所有离心步骤均为使用常规台式离心机室温下进行离心。
- 去蛋白液PE可以有效去除残留的蛋白污染，当宿主菌为endA+（TG1、BL21、HB101、ET12567、JM系列）等核酸酶含量较高的菌株时，则推荐使用去蛋白液PE。

## 操作方法

1. 取1-5 ml过夜培养的菌液,加入离心管中,使用常规台式离心机,4,000 rpm 离心3 min,尽量吸除上清(菌液较多时可以通过多次离心将菌体沉淀收集到一个离心管中)。
2. 向有菌体沉淀的离心管中加入250µl **Solution I** (已加入**RNase A**),使用移液器或涡旋振荡器彻底悬浮细菌沉淀,然后静置5 min。  
*注意:如果有未彻底混匀的菌块,会影响裂解,导致提取量和纯度偏低。*
3. 向离心管中加入250µl **Solution II**,温和地上下翻转6-8次使菌体充分裂解。  
*注意:温和地混合,不要剧烈震荡,以免打断基因组DNA,造成提取的质粒中混有基因组DNA片断。此时菌液应变得清亮粘稠,所用时间不应超过5min,以免质粒受到破坏。如果未变得清亮,可能由于菌体过多,裂解不彻底,应减少菌体量。*
4. 向离心管中加入350µl **Solution III**,立即温和地上下翻转6-8次,充分混匀,此时将出现白色絮状沉淀。12,000 rpm离心10 min。  
*注意:Solution III 加入后应立即混合,避免产生局部沉淀。*
5. 将上一步收集的上清液用移液器转移到新的1.5 ml离心管中,加入0.1 volume的**Endo-Out Solution**,混匀后冰浴10 min,其间不时摇匀。
6. 取出后置于65°C水浴 5 min,此时溶液变浑浊,此时加入100µl氯仿,轻微摇匀,12,000 rpm室温离心10 min;
7. 将上一步收集的无色上清液用移液器转移到新的2.0 ml离心管中,注意尽量不要吸出红色有机相以及其他沉淀。加入0.5 volume的**Solution III**以及0.5 volume的无水乙醇,轻摇混匀;
8. 将上述上清液700 µl/次用移液器转移到吸附柱中(吸附柱放入收集管中),12,000 rpm离心30 sec,倒掉收集管中的废液,将吸附柱放入收集管中,重复该操作数次至全部上清液过柱完毕;
9. 可选步骤:向吸附柱中加入500 µl去蛋白液 **Solution PE**,12,000 rpm离心30 sec,倒掉收集管中的废液,将吸附柱重新放回收集管中。如果宿主菌是end A+宿主菌(TG1, BL21, HB101, JM系列, ET12567等),这些宿主菌含有大量的核酸酶,易降解质粒DNA,推荐采用此步。如果宿主菌是endA-宿主菌(DH5 α, TOP10等),这步可省略。
10. 向吸附柱中加入500 µl **DNA Wash Buffer** (使用前请先检查是否已加入相应体积的无水乙醇),12,000 rpm离心30 sec,倒掉收集管中的废液,将吸附柱放入收集管中。
11. 重复操作步骤7。
12. 将吸附柱放入收集管中,12,000 rpm离心1 min,将吸附柱中残余的漂洗液去除。
13. 将吸附柱开盖,置于室温放置3-5 min,以彻底晾干吸附材料中残余的漂洗液。
14. 将吸附柱置于一个干净的1.5ml离心管中,向吸附膜的中间部位滴加100-150 µl洗脱缓冲液**Elution Buffer** (或者ddH<sub>2</sub>O),室温放置2 min,12,000 rpm离心2 min将质粒溶液收集到离心管中。  
*注意:将洗脱缓冲液Elution Buffer (或者ddH<sub>2</sub>O) 预热至60°C将有助于提高质粒洗脱的效果。*

仅供科学研究,不得用于临床治疗