**Endo-freePlasmid Midiprep Kit 去内毒素质粒中量提取试剂盒 （离心柱型） MPD2200**

****

**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**

**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5-30 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可适用于各种常规操作，包括酶切、PCR、测序、连接、转化、文库筛选、体外翻译、转染一些常规的传代细胞等。

**试剂盒组成**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **产品组成** | **MPD2200-10T** | **MPD2200-25T** |
| Solution I | 22ml | 55ml |
| Solution II | 22ml | 55ml |
| Solution III | 75ml | 185ml |
| Solution PE | 36ml | 90ml |
| Endo-Out Solution | 8ml | 20ml |
| DNA Wash Buffer | 16ml（Add 64ml ethanol） | 40ml（Add 160ml ethanol） |
| Elution Buffer | 12ml | 30ml |
| RNase A | 250μl | 550μl |
| 吸附柱 | 10个 | 25个 |
| 收集管 | 10个 | 25个 |

**储存条件**

试剂盒置于室温（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 建议置于4℃保存；

**注意事项**

**1. 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。

1. **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CO2与**Solution II 中的**NaOH反应，从而造成溶液裂解效率下降。
2. **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）。
3. 所有离心步骤均为使用常规台式离心机室温下进行离心。
4. 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5-30 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2 ml **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。*

1. 向离心管中加入2 ml **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。*

1. 向离心管中加入2.8 ml **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。

1. 将上一步收集的上清液用移液器转移到新的15 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。
2. 取出后置于65℃水浴 5 min，此时溶液变浑浊，此时加入1ml氯仿，轻微摇匀，12,000 rpm室温离心10 min；
3. 将上一步收集的无色上清液用移液器转移到新的15 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；
4. 将上述上清液3.5 ml/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；
5. 可选步骤：向吸附柱中加入3.5 ml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（DH5α，TOP10等），这步可省略。
6. 向吸附柱中加入3.5 ml **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。
7. 重复操作步骤10。
8. 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。
9. 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。
10. 将吸附柱置于一个干净的15ml离心管中，向吸附膜的中间部位滴加0.5-1.0 ml洗脱缓冲液**Elution Buffer**（或者**ddH2O**），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****ddH2O****）预热至60℃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**