

## 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。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。（低内毒素型质粒中量抽提试剂盒参见MPD2200）

## 试剂盒组成

产品组成	MPD2000-10T	MPD2000-25T
Solution I	22ml	55ml
Solution II	22ml	55ml
Solution III	30ml	75ml
Solution PE	36ml	90ml
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 建议置于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。
3. 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。
4. 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。
5. 将上一步收集的上清液用移液器转移到吸附柱中（吸附柱放入收集管中），注意尽量不要吸出沉淀。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。
6. 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。
7. 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。
8. 重复操作步骤7。
9. 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。
10. 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。
11. 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