

UE 质粒大量制备试剂盒

本试剂盒采用改进的 SDS 碱裂解法，结合 DNA 制备膜选择性地吸附 DNA 的方法达到快速纯化质粒 DNA 的目的。适合于从 120-300 ml 细菌培养物中提取多至 600 µg 高纯的质粒 DNA，用于测序、体外转录与翻译、限制性内切酶消化、细菌转化等分子生物学实验。

一、试剂盒组成、贮存、稳定性

Cat.No.	UE-MX-P-10	UE-MX-P-25
Kit size	10 preps	25 preps
Maxiprep column	10	25
RNase A	270 µl	700 µl
Buffer S1	115 ml	285 ml
Buffer S2	115 ml	285 ml
Buffer S3K	115 ml	285 ml
Buffer B	115 ml	285 ml
Buffer W1	2×80 ml	350 ml
Buffer W2 concentrate	2×36 ml	150 ml
Eluent	25 ml	60 ml
Protocol manual	1	1

二、实验准备及注意事项

- 使用前，RNase A 全部加入 Buffer S1 中，4℃贮存。
- 使用前确认 Buffer S2 是否出现沉淀，如出现沉淀，应于 37℃水浴加热溶解并冷却至室温后使用。
- 使用前，Buffer W2 concentrate 中加入指定体积的无水乙醇。
- 加入 Buffer S2 和 Buffer S3K 的两个步骤操作必须温和。剧烈摇晃将导致基因组 DNA 的污染。
- 需要自备 50 ml 干净离心管。
- 提取质粒 DNA 的产量与菌液浓度、菌株种类、质粒拷贝数、质粒大小等因素有关。
- 可以提前预冷 Buffer S3K 和 Buffer B，有助于离心沉淀。

三、操作步骤

- 取 120 ml 在 LB 培养基中培养过夜的高拷贝数质粒菌液，或 250 ml 过夜培养的低拷贝质粒/Cosmid 菌液（若使用丰富培养基，菌液体积应减半或更少），≥4,000×g 离心 5 min，弃上清。将离心管倒置于纸巾上数分钟，除尽上清。
- 加 10 ml Buffer S1 悬浮细菌沉淀，悬浮需均匀，不应留有小的菌块。
*确认 Buffer S1 中已加入 RNaseA。
- 加 10 ml Buffer S2，温和并充分地上下翻转 8-10 次混合均匀使菌体充分裂解，直至形成透亮的溶液。
*Buffer S2 使用后立即盖紧瓶盖，以免空气中的 CO₂ 中和 Buffer S2 中的 NaOH，降低溶菌效率。
*避免剧烈摇晃，否则将导致基因组 DNA 的污染。
*此步骤不宜超过 5min。
- 加 10 ml 4℃预冷的 Buffer S3K，温和并充分地上下翻转 10-12 次混合均匀，直至形成紧实的凝集块，室温放置 5 min，8,000×g 离心 10 min。
*加入 Buffer S3K 后应立即混合，以避免形成局部的凝集块。
*避免剧烈摇晃，否则将导致基因组 DNA 的污染。
*离心完成后，上清液尽量澄清，如果浑浊，负压过柱容易堵柱，可以将上清液再次离心

- 将步骤 4 中的上清转入新的 50 ml 离心管（自备）中，向上清中加 10 ml 4℃ 预冷的 Buffer B，温和并充分地上下翻转 10-12 次混合均匀。

步骤 6~9 可选择负压法或者离心法

A. 负压法

- 正确连接负压装置，将大量制备管插到负压装置的插口上。吸取步骤 5 中的混合液，分 2 次转移到大量制备管中，开启并调节负压至 -25-30 英寸汞柱，缓慢吸尽管中溶液。
- 保持负压，加 12 ml Buffer W1，吸尽管中溶液。
- 加 14 ml Buffer W2，吸尽管中溶液。
*确认在 Buffer W2 concentrate 中已按试剂瓶上的指定体积加入无水乙醇。
- 将大量制备管置于 50 ml 离心管中，加 4 ml Buffer W2 溶液，≥7,000×g 离心 5 min。
*低拷贝质粒，建议加 4 ml 无水乙醇≥7,000×g 离心 5 min 洗涤 1 次提高 260/230 值。

B. 离心法

- 大量制备管放入 50 ml 离心管中，将步骤 5 中的混合液分 2-3 次转移至制备管中，每次≥7,000×g 离心 2 min。
*混合液加入大量制备柱体积尽量不要超过刻度线。
*如果存在离心管与制备柱不匹配，推荐百赛耗材 50 ml 离心管（BL2012500）。
- 弃滤液，加 12 ml Buffer W1，≥7,000×g 离心 2 min。
- 弃滤液，加 14 ml Buffer W2，≥7,000×g 离心 2 min。
- 将大量制备管置于 50 ml 离心管中，加 4 ml Buffer W2 溶液，≥7,000×g 离心 5 min。
- 将大量制备管置于另一洁净的 50 ml 离心管中，在制备管的膜中央上加 1-1.5 ml Eluent，室温静置 2-5 min，≥6,000×g 离心 5 min 收集质粒 DNA，-20℃保存。
*如果负压法无水乙醇甩干后膜表面极度缺水，若用去离子水（pH7.5-8.0）洗脱，需要克服较大的表面张力浸润膜表面，导致质粒 DNA 洗脱效率差，要进行洗脱液二次重复过柱洗脱。
*低拷贝或者大片段质粒 DNA 将 Eluent A 加热至 65℃将提高洗脱效率。

五、流程图

