

## 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 500 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-5	UE-MX-P-10	UE-MX-P-25
Kit size	5 preps	10 preps	25 preps
Maxiprep column	5	10	25
RNase A	135 μl	270 μl	700 μl
Buffer S1	70 ml	115 ml	285 ml
Buffer S2	70 ml	115 ml	285 ml
Buffer S3K	70 ml	115 ml	285 ml
Buffer B	70 ml	115 ml	285 ml
Buffer W1	80 ml	160 ml	350 ml
Buffer W2 concentrate	36 ml	2×36 ml	150 ml
Eluent	13 ml	25 ml	60 ml
Protocol manual	1	1	1

RNase A : 50 mg/ml, 室温贮存 6 个月; 长期贮存于 -20°C.

Buffer S1: 细菌悬浮液, 加入 RNase A 后, 混合均匀, 4°C 贮存.

Buffer S2: 细菌裂解液 (含 SDS/NaOH), 室温密封贮存.

Buffer S3K: 中和液, 室温密封贮存.

Buffer B: DNA 结合溶液, 室温密封贮存.

Buffer W1: 洗涤液, 室温密封贮存.

Buffer W2 concentrate: 去盐液. 使用前, 按试剂瓶上指定的体积加入无水乙醇 (用 100%乙醇或 95%乙醇), 混合均匀, 室温密封贮存.

Eluent: 2.5 mM Tris-HCl, pH 8.5, 室温密封贮存.

### 二、注意事项

- 细菌过量将影响溶菌及质粒 DNA 的释放。
- 在步骤 3 和步骤 4 中操作必须温和。剧烈摇晃，将导致基因组 DNA 的污染。但混合必须充分，否则影响得率。
- 在加入 Buffer S3K 时，蛋白质和基因组 DNA 形成粘稠的白色絮状沉淀，必须充分混合均匀，使凝集块中间也得到充分中和凝结。
- DNA 分子呈酸性，建议在 2.5 mM Tris-HCl, pH 8.5 洗脱液中保存。

### 三、实验准备

- 第一次使用时，在 Buffer W2 concentrate 中按试剂瓶上指定的体积加入无水乙醇。
- 准备无核酸和核酸酶污染的 Tip 头、离心管。
- 4°C 预冷 Buffer S3K 和 Buffer B。
- 将洗脱液或去离子水加热至 65°C，有利于提高洗脱效率。
- 使用前检验 Buffer S2 是否出现沉淀，若出现沉淀，应于 37°C 温浴溶解并冷却至室温后再使用。

### 四、操作步骤

第一次使用时，将 RNase A 全部加入 Buffer S1 中，混合均匀，4°C 贮存。

- 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），≥3,000×g 离心 10 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 使用后应立即盖紧瓶盖，以免空气中的 CO<sub>2</sub> 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°C 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 (4°C) 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。

- 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°C 预冷的 Buffer B，温和并充分地上下翻转 10-12 次混合均匀。

- 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，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，≥6,000 ×g 离心 5 min。

\*可选步骤：将大量制备管插到负压装置的插口上，最大负压吸 10 min 以确保除尽残留的 Buffer W2。

- 将大量制备管置于洁净的 50 ml 离心管中，在制备管的膜中央上加 1.5 ml Eluent 或去离子水，室温静置 5 min，≥6,000×g 离心 5 min 收集质粒 DNA。

- 可选步骤：同样方法，在制备管的膜中央上加 0.75 ml Eluent 或去离子水，室温静置 1 min。≥6,000×g 离心 5 min 收集质粒 DNA。

### 五、流程图

