

UE 质粒中量制备试剂盒

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 30-100 ml (O D600 为 1-1.5) 细菌培养物中提取多至 200 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-MD-P-10	UE-MD-P-25
Kit size	10 preps	25 preps
Midiprep column	10	25
1.5 ml Microfuge tube	20	50
Plastic wrench	1	1
RNase A	120 µl	270 µl
Buffer S1	55 ml	125 ml
Buffer S2	55 ml	125 ml
Buffer S3K	55 ml	125 ml
Buffer B	55 ml	125 ml
Buffer W1	80 ml	2×100 ml
Buffer W2 concentrate	36 ml	72 ml
Eluent	6 ml	20 ml
Protocol manual	1	1

RNase A: 50 mg/ml, 室温贮存 6 个月；长期贮存于 -20℃。

Buffer S1: 细菌悬浮液。加入 RNase A 后，混合均匀，4℃贮存。

Buffer S2: 细菌裂解液（含 SDS/NaOH）。室温密闭贮存。

Buffer S3K: 中和液，室温密闭贮存。

Buffer B: DNA 结合溶液，室温密闭贮存。

Buffer W1: 洗涤液，室温密闭贮存。

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（可用 100%乙醇或 95%乙醇），混合均匀，室温密闭贮存。

Eluent: 洗脱液，室温密闭贮存。

二、注意事项

- 细菌过量将影响细菌裂解及质粒 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。
- 将 Eluent 或去离子水加热至 65℃，有利于提高洗脱效率。
- DNA 分子呈酸性，建议在 2.5 mM Tris-HCl, pH 7.0-8.5 洗脱液中保存。
- Buffer S2、Buffer S3K、Buffer B 和 Buffer W1 试剂含刺激性化合物，操作时要戴乳胶手套和眼镜，避免沾染皮肤、眼睛和衣服，谨防吸入口鼻。若沾染皮肤、眼睛时，要立即用大量清水或生理盐水冲洗，必要时寻求医疗咨询。

三、实验准备

- 第一次使用前，RNase A 全部加入 Buffer S1 中，4℃ 贮存。
- 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℃预冷 Buffer S3K 和 Buffer B。
- 使用前，检查 Buffer S2 是否出现沉淀，应于 37℃温浴加热溶解并冷却至室温后再使用。
- 需要使用负压装置。（推荐使用百赛利德配套负压装置 Cat No.:BS-VM 或 BS-VM-II）

四、操作步骤

- 取 30 ml 在 LB 培养基中培养过夜的高拷贝数质粒菌液，或 100 ml 过夜培养的低拷贝质粒菌液（若使用丰富培养基，菌液体积应减半或更少），≥3,000×g 离心 8 min，弃上清。将离心管倒置于纸巾上 1 min，除尽上清。
- 加 4.5 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 RNase A。
- 加 4.5 ml Buffer S2，温和并充分地上下翻转 6-8 次混合均匀使菌体充分裂解，直至形成透亮的溶液；此步骤不宜超过 5 min。
*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 5 min。
- 加 4.5 ml 4℃ 预冷的 Buffer S3K，温和并充分地上下翻转 10 次混合均匀，直至形成紧实的凝集块；室温放置 5 min。≥6,000×g 离心（4℃）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。
- 取步骤 4 中的上清转入新的 50 ml 离心管（自备）中，向上清中加 4.5 ml 4℃预冷的 Buffer B，温和并充分地上下翻转 10 次混合均匀。
- 正确连接负压装置，将中量制备管插到负压装置的插口上。
- 吸取步骤 5 中的混合液，转移到中量制备管中，开启并调节负压至 -25-30 英寸汞柱，缓慢吸走管中溶液。
*上清液过柱液体流速与菌液量有关，如果流速过慢，可能菌液量过多。
- 保持负压，加 7 ml Buffer W1，吸尽管中溶液。
- 加 8 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。
- 用塑料扳手顺时针取下中量制备管下部含质粒的制备管管头，置于洁净的 1.5 ml 离心管（试剂盒内提供）中，加 0.3 ml Buffer W2，12,000×g 离心 2 min。
- 将制备管管头置于另一洁净的 1.5 ml 离心管（试剂盒内提供）中，在制备管的膜中央加 0.3 ml Eluent 或去离子水。室温静置 1 min。12,000×g 离心 1 min 收集质粒 DNA。
*将 Eluent 或去离子水加热至 65℃将提高洗脱效率。
- 可选步骤：同样方法，在制备管的膜中央加 0.2 ml Eluent 或去离子水，室温静置 1 min。12,000×g 离心 1 min 收集质粒 DNA。

五、流程图

