

## UE 质粒大量制备试剂盒（离心法）

本试剂盒适合于从 100-250ml 细菌培养物中提取多至 1.5 mg 高纯的质粒 DNA。提取的质粒 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

| Cat.No.                  | UE-MX-P-S-10 | UE-MX-P-S-20 |
|--------------------------|--------------|--------------|
| Kit size                 | 10 preps     | 20 preps     |
| Maxiprep column C7       | 10           | 20           |
| Collection Tubes (50 ml) | 20           | 40           |
| UERed (可选)               | 600 µl       | 1.2 ml       |
| Buffer AC (可选)           | 30 ml        | 60 ml        |
| RNase A                  | 1.2 ml       | 2×1.2 ml     |
| Buffer S1                | 115 ml       | 230 ml       |
| Buffer S2                | 115 ml       | 230 ml       |
| Buffer S3K               | 115 ml       | 230 ml       |
| Buffer W2B concentrate   | 48 ml        | 96 ml        |
| Eluent                   | 25 ml        | 50 ml        |
| Protocol manual          | 1            | 1            |

### 二、运输和保存

试剂盒室温（15-30℃）干燥保存。RNase A 室温可贮存 6 个月，长期贮存于 -20℃。

### 三、实验准备及注意事项

- 第一次使用前，RNase A 和 UERed（可选）全部加入 Buffer S1 中混匀，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 W2B 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。
- 需要自备无水乙醇、异丙醇和 50ml 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。

### 四、操作步骤

- 取 100-300 ml 过夜培养的菌液，8,000×g 离心 4 分钟，弃上清。

| 高拷贝质粒菌液最大推荐量             |                        |                        |
|--------------------------|------------------------|------------------------|
| OD <sub>600</sub> ×ml 菌液 | OD <sub>600</sub> =1.5 | OD <sub>600</sub> =3.0 |
| 360                      | 240 ml                 | 120 ml                 |

\*菌体量太多会影响裂解效果导致得率降低，RNA 残留多异丙醇沉淀会堵柱。

- 加 10 ml Buffer S1 悬浮细菌沉淀，旋涡震荡 30 s-1 min，悬浮需均匀，不应留有小的菌块，混匀后的溶液为浑浊的红色。

\*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，室温放置 2-3 min，此时菌液呈现透亮的紫红色溶液。

此步骤不宜超过 5min，避免质粒 DNA 受到破坏。

- 加 10 ml Buffer S3K，温和并充分地上下翻转 10-12 次混合均匀，出现白色絮状沉淀，直至溶液全部变成黄色。室温放置 5 min，8,000 ×g 离心（4℃）10 min。

\*中和完成后，絮状沉淀中混有紫红色说明复性不充分，应继续混匀直至絮状沉淀全部为白色，溶液全部变为澄清的黄色。以上步骤 2-4 为添加 UERed 指示剂参考步骤。

\*加入 Buffer S3K 后应立即温和颠倒混匀，避免产生局部沉淀。

- 将步骤 4 中的上清液转入新的 50 ml 离心管（自备）中，加入 0.3 倍体积（约 9 ml）的异丙醇，上下颠倒混匀。
- （可选）制备管活化：向置于收集管中的制备管里添加 2.5 ml Buffer AC，静置 2 min，7,000×g 离心 2 min，弃除滤液。
- 大量制备管放入 50 ml 收集管中，将步骤 5 中的混合液分 3-4 次转移至制备管中，每次≥7,000×g 离心 2 min。
- 弃滤液，加 10 ml Buffer W2B，≥7,000×g 离心 2 min。重复操作一次。
- 弃滤液，加 3 ml 无水乙醇，≥7,000×g 离心 5 min。
- 将大量制备管置于另一洁净的 50 ml 收集管中，在制备管的膜中央上加 1-1.5 ml Eluent，室温静置 2-5 min，≥7,000×g 离心 5 min 收集质粒 DNA，-20℃保存。

\*制备管活化处理过程能够改善制备管的均一性和稳定性，减少批间差异，消除高温/潮湿或者环境其它不良因素对其造成的影响。建议制备管放置超过 6 个月进行活化处理。

\*吸附柱最大容积为 15 ml，建议不要超过 12 ml，需要分 3-4 次过柱。个别离心机转子的倾角较大，此时建议减少加入吸附柱的溶液体积。

\*洗脱液体积不建议少于 1ml，首次洗脱可获得 65%-80%的质粒 DNA，可以用第一次洗出的洗脱液进行二次重复洗脱。

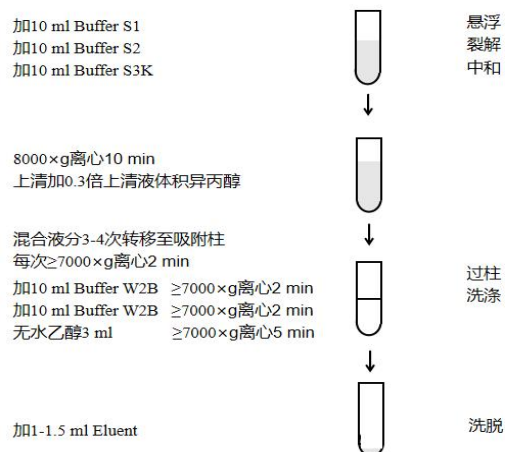
\*低拷贝或者大片段质粒 DNA 将 Eluent 加热至 65℃将提高洗脱效率。

\*去离子水洗脱，确保 pH 在 7.0-8.5 范围，洗脱得率较低可以将去离子水二次重复洗脱。

### 五、（可选）质粒 DNA 浓缩

- 1 ml 质粒 DNA 加入 0.1 ml（0.1 倍样本体积）3 M 醋酸钠（pH 5.2）和 0.7 ml（0.7 倍样本体积）异丙醇，上下颠倒混匀。
- 15000×g 离心 20 min，小心弃除上清保留沉淀。
- 用 1 ml 70%乙醇洗涤质粒 DNA 沉淀，15000×g 离心 10 min，小心弃除上清。
- 空气干燥质粒 DNA 5-10 min，加入 100-500 µl Eluent 或者去离子水溶解质粒 DNA。

### 六、流程图



## 七、添加指示剂参考图例



① Buffer S1 10 ml 重悬



② Buffer S2 10 ml 裂解



③ Buffer S3K 10 ml 中和



④ 8000g/10min