

## 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 细菌培养物中提取多至 100 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-5	UE-MD-P-10	UE-MD-P-25
Kit size	5 preps	10 preps	25 preps
Midiprep column	5	10	25
1.5 ml Microfuge tube	10	20	50
Plastic wrench	1	1	1
RNase A	60 µl	120 µl	270 µl
Buffer S1	30 ml	55 ml	125 ml
Buffer S2	30 ml	55 ml	125 ml
Buffer S3K	30 ml	55 ml	125 ml
Buffer B	30 ml	55 ml	125 ml
Buffer W1	40 ml	80 ml	2×100 ml
Buffer W2 concentrate	18 ml	36 ml	72 ml
Eluent	3 ml	6 ml	20 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 (可用 100%乙醇或 95%乙醇), 混合均匀, 室温密封贮存。

Eluent: 洗脱液, 室温密封贮存。

### 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集。
- 将 Eluent 或去离子水加热至 65°C, 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, 避免污染皮肤、眼睛和衣服, 谨防吸入口鼻。若污染皮肤、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°C 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°C 预冷 Buffer S3K 和 Buffer B。
- 使用前, 检查 Buffer S2 是否出现沉淀, 应于 37°C 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 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 5 min。
- 加 4.5 ml 4°C 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°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。
- 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°C 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。
- 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。
- 用塑料扳手下取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°C 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

