

## AxyPrep-96 质粒 DNA 试剂盒

AxyPrep-96 质粒 DNA 纯化试剂盒适合从 1.3 ml 高拷贝质粒菌培养物中快速提取多至 20 µg 质粒 DNA（每孔）。本试剂盒采用改进的 SDS/NaOH 裂解法，结合 silica 膜选择性吸附 DNA 的方法，达到快速制备质粒 DNA 的目的。提取的质粒 DNA 无蛋白质、基因组 DNA 和 RNA 污染，适合用作大规模测序、限制性酶切、Southern 印迹分析等分子生物学实验的质粒 DNA 的制备。

### 一、试剂盒组成、贮存、稳定性

说明书，耗材：96 孔 2.2 ml 深孔板、96 孔 1.6 ml 深孔板、96 孔过滤板、96 DNA 制备板、96 V 型板、BF-400 膜、不干胶片、硅胶片。

Rnase A: 50 mg/ml，室温保存。

Buffer S1: 细菌悬浮液，加入 RNase A 后，4°C 贮存。

Buffer S2: 细菌裂解液，室温密闭贮存。(若出现沉淀，应于 37°C 温浴溶解并冷却至室温后再使用。)

Buffer S3: 中和液，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，根据瓶上数量加入乙醇，混合均匀，室温密闭贮存。用 100%乙醇或 95%乙醇。

Eluent: 2.5 mM Tris-HCl, pH 8.5, 室温密闭贮存。

10×Buffer W2 (24×96 试剂盒): 用于配制 Buffer W2。

### 二、注意事项

Buffer S2 含 NaOH 腐蚀性化合物，Buffer S3 和 Buffer W1 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

1. 第一次使用前，RNase A 全部加入到 Buffer S1 中，4°C 贮存。
2. Buffer W2 (24×96 试剂盒) 配制: 在提供的 500 ml 空瓶中加入 15 ml 10×Buffer W2, 135 ml 去离子水和 350 ml 无水乙醇，可用 100%无水乙醇或 95%无水乙醇。
3. 第一次使用前，Buffer W2 concentrate 中加入指定体积的无水乙醇。

#### 四、操作步骤

1. 在 96 孔 2.2 ml 深孔板的每孔中加 1.3 ml 含适当选择性试剂(如抗生素)的高营养培养基。挑取单个菌落并接种于每孔中，上口用 BF-400 膜封住。在 37°C，250-300 rpm 速度下震荡至 20-24 hr。
2. 1,500×g 离心 5 min。将 96 孔 2.2 ml 深孔板迅速倒置以丢弃培养上清，倒置扣紧放于纸巾上 2 min 以丢弃残留的培养上清。
3. 每孔加 0.3 ml 含 RNase A 的 Buffer S1，用不干胶片密封各孔，细菌沉积块用旋涡震荡彻底悬浮均匀。

\* 确认 RNase A 已加入 Buffer S1 中。

4. 弃不干胶片，每孔加 0.3 ml Buffer S2，用硅胶片密封各孔，温和但充分混合 6-8 次。

\* 此步停留不宜超过 5 min。

\* 如 S2 溶液出现沉淀，应于 37°C 水浴中温育溶解并冷却至室温后再使用。

\* 将深孔板置于离心机中短速离心至 2,500×g 后停止。

5. 弃硅胶片。每孔加 0.45 ml Buffer S3，再用新硅胶片封上 96 孔 2.2 ml 深孔板，温和但充分混合 6-8 次。静置 5 min，弃硅胶片。
6. 移去负压装置上的 96 孔板支架，将一块新的 96 V 型底板放到负压装置内，将 96 DNA 制备板放置在 96 V 型底板上。将 96 板支架置回到负压装置上，最后将 96 孔过滤板放置在 96 孔板支架上，保证滤板下部的导流管伸入到 96 孔制备板孔中。
7. 用排枪从一侧伸入 96 孔 2.2 ml 深孔板（步骤 5）中，吸取所有溶菌上清并转移至 96 过滤板中；开启并调节负压至-20-30 英寸汞柱，吸尽过滤板中液体。弃 96 孔过滤板，将 96 DNA 制备板暂时转移至洁净的长纤维纸巾上。
8. 将废液槽放入负压装置内，将制备板放在负压装置支架上，开启并调节负压至-20-30 英寸汞柱，吸尽过滤板中液体。
9. (可选步骤) 96 DNA 制备板每孔中加 0.5 ml Buffer W1，负压吸尽溶液，以除尽残留液体。

\* 此 Buffer W1 步骤仅使用于除去在质粒构建时使用了 end A+细菌株的内切酶，如 JM 系列和 HB101 系列。宿主菌如 XL-1 Blue 和 DH5 α 不需要 Buffer W1 洗。

10. 保持负压，每孔加 0.9 ml Buffer W2，负压吸尽溶液。重复此步骤一次。

\* 确认在 Buffer W2 concentrate 中已按试剂瓶上的指定体积加入无水乙醇。

11. 将负压调节至最大（-30 英寸汞柱）吸尽残留的乙醇。

12. 关闭并释放负压，将 96 DNA 制备板在吸水纸巾上用力地拍击 6-8 次以除尽底部残留液体。

\* 建议使用无尘的吸水纸巾，防止细小的纤维由于静电作用污染质粒和后续的电泳。

\* 另外，96 DNA 制备板可采用离心法除去残留的 Buffer W2,关闭负压装置，将 96 DNA 制备板置于 96 孔 1.6 ml 深孔板上，3,000 ×g 离心 5 min。

\* 本试剂盒包含 96 孔 1.6 ml 深孔板，可在后续实验中使用。

13. 移去负压装置上的 96 板支架，将一块新的 96 孔 1.6 ml 深孔板放到负压装置内，将 96 孔 V 型底板放置在深孔板上。将 96 板支架置回到负压装置上，最后将 DNA 制备板放置在负压装置上。

14. 取 80-100  $\mu$ l Eluent 或去离子水在每孔的膜中央，室温静置 1 min，开启负压缓慢增加至-15-30 英寸汞柱，保持负压 5 min。

15. 关闭并缓慢释放负压，在 96 V 型底板中得到纯化后的 DNA。