

AxyPrep Easy-96 质粒 DNA 试剂盒

Easy-96 质粒 DNA 制备试剂盒是专门为同时从多个 96 孔小量体积培养的细菌中提取高拷贝质粒 DNA 而设计的。可以从 1.3 ml 高拷贝质粒菌培养物中快速提取多至 10-20 μg 质粒 DNA。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、BF-400 膜、96 孔过滤板、不干胶片、硅胶片。

RNase A: 50 mg/ml。室温密闭贮存。

Buffer S1: 细菌悬浮液。加入 RNase A 后应贮于 4°C。

Buffer S2: 细菌裂解液。室温密闭贮存, 避免与空气中 CO₂ 接触, 以免降低溶菌效率。如溶液有沉淀出现时, 可于 37°C 温浴溶解, 并冷却至室温后使用。

Buffer NP: 中和溶液, 室温密闭贮存。

二、注意事项

Buffer S2 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. 92°C 水浴。

四、操作步骤

使用之前, 在每瓶 Buffer S1 中加入 1 支随试剂盒携带的 RNase A, 混合均匀。加了 RNase A 的 Buffer S1 应置于 4°C 保存。

1. 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, 出口用 BF-400 膜封住。培养物于 37°C, 260-300 rpm 速度下震荡至 10-24 hr。
2. 将 96 孔 2.2 ml 深孔板置于离心机中, 1,500×g 离心 5 min。
3. 弃 BF-400 膜, 将 96 孔 2.2 ml 深孔板迅速倒置丢弃培养上清, 倒置紧扣 96 孔 2.2 ml 深孔板于纸巾上轻轻拍击以丢弃残留的培养上清。
4. 每孔加 0.3 ml Buffer S1, 用不干胶片密封各孔, 用旋涡混合器悬浮细菌。悬浮必须充分, 不应留有小的细菌团块。
5. 每孔加 0.3 ml Buffer S2, 用新不干胶片封住各孔, 温和地上下翻转 6-8 次以充分混合均匀。

* 混合必须温和, 以防造成基因组 DNA 剪切、游离。

* 此步骤不宜超过 5 min。

6. 每孔加 0.3 ml 4°C 预冷的 Buffer NP，用新的硅胶片封住各孔，立即温和但充分混合均匀（温和上下翻转 6-8 次），室温静置 5 min。
- 7.（可选步骤）将 96 孔 2.2 ml 深孔板置于 92°C 水浴中，静置 8 min。

- * 温浴温度不宜超过 92°C，否则易出现基因组 DNA 污染。
- * 温浴时间不宜超过 8-15 min。

- 8.（可选步骤）转移至冰水浴中，静置 15 min。

- * 若采用步骤 7，步骤 8 为必须。

步骤 9-10 可以选择负压法或离心法过滤溶菌上清。

A. 负压法

- 9A. 将一块新的 96 孔 2.2 ml 深孔板放到负压装置内。将 96 孔滤板放置在负压装备的支架上。
- 10A. 用排枪从一侧伸入 96 孔 2.2 ml 深孔板中，吸取所有溶菌上清并转移至 96 过滤板中；开启调负压至-20-30 英寸汞柱；吸尽过滤板中液体。

B. 离心法

- 9B. 将 96 孔滤板放置在洁净的 96 孔 2.2 ml 深孔板上，用排枪从一侧伸入 96 孔 2.2 ml 深孔板（步骤 6 或步骤 8）中，吸取所有溶菌上清并转移至 96 过滤板中。
- 10B. 同时将 96 孔滤板和 96 孔 2.2 ml 深孔板放入离心机内，2,000×g 离心 5 min。
11. 除去 96 孔滤板，在 96 孔 2.2 ml 深孔板每孔中加 0.65 ml 异丙醇，用新的硅胶片封住各腔，上下倒置几次使溶液混合均匀。
12. 将 96 孔 2.2 ml 深孔板 3,000×g 离心 20 min。将 96 孔 2.2 ml 深孔板迅速倒置于废液槽中，弃尽上清。倒置 96 孔 2.2 ml 深孔板于长纤维性纸巾几分钟。
13. 每孔加 0.6 ml 冰浴预冷的 70%乙醇，用新的硅胶片封住各腔。以 3,000×g 离心 3 min。倒置孔板弃洗涤液，将 96 孔 2.2 ml 深孔板倒置紧扣于多层长纤维性纸巾上，并轻轻拍击。空气中置 15-20 min 或真空下置 10 min 干燥样品。

- * 要确保所有的乙醇液滴挥发殆尽，但不宜使 DNA 沉淀完全干透，否则将很难再被溶解。

14. 加 40-80 μl 1 mM Tris-HCl, pH 8.5 洗脱液，用新的硅胶片封住各腔，旋涡振荡溶解 DNA。