

AxyPrep 质粒大量试剂盒

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 120-300 ml 细菌培养物中提取多至 500 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

说明书，耗材：大量DNA制备管、大量滤器。

RNase A: 50 mg/ml，室温密闭贮存

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）；若出现沉淀，应于37°C温浴溶解并冷却至室温后再使用。

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，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。

二、注意事项

1. 细菌过量将影响溶菌及质粒DNA的释放。
2. 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。
3. 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。
4. 将洗脱液或水加热至65°C，有利于提高洗脱效率。
5. DNA分子呈酸性，建议在2.5 mM Tris-HCl, pH 8.5洗脱液中保存。

三、实验准备

1. 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。
2. 准备无核酸和核酸酶污染的 Tip 头、离心管。
3. 4°C 预冷的 **Buffer S3K** 和 **Buffer B**。

四、操作步骤

第一次使用时，将 **RNase A** 全部加入 **Buffer S1** 中，混合均匀，4°C 保存。

1. 取 120 ml 在 LB 培养基中培养过夜的高拷贝数质粒菌液，或 250 ml 过夜培养的低拷贝质粒/Cosmid 菌液（若使用丰富培养基，菌液体积应减半或更少）， $\geq 3,000 \times g$ 离心 10 min，弃上清。将离心管倒置于纸巾上数分钟，除尽上清。
2. 用 10 ml 已加入 **RNase A** 的 **Buffer S1** 悬浮细菌沉淀，悬浮需均匀，不应留有小的菌块。
3. 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，直至形成透亮的溶液；此步骤不宜超过 5 min。
4. 加入 10 ml 4°C 预冷的 **Buffer S3K**，温和并充分地上下翻转 10-12 次混合均匀，直至形成紧实的凝集块；室温放置 5 min。
5. 加入 10 ml 4°C 预冷的 **Buffer B**，温和并充分地上下翻转 10-12 次混合均匀； $10,000 \times g$ 离心（4°C）10 min。
6. 正确连接负压装置，将大量 DNA 制备管插到负压装置的插口上。
7. 吸取步骤 5 中的混合液，转移到大量滤器中，插入注射器芯，垂直向下缓慢推注至大量 DNA 制备管中，开启并调节负压至 -25-30 英寸汞柱，缓慢吸尽管中溶液。
8. 保持负压，加 12 ml **Buffer W1**，吸尽管中溶液。
9. 加 14 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。

10. 将大量 DNA 制备管置于 50 ml 离心管中，加 4 ml **Buffer W2** 溶液， $\geq 6,000 \times g$ 离心 5 min。

* 可选步骤：将大量制备管插到负压装置的插口上，最大负压吸引 10 min 以确保除尽残留的 **Buffer W2**。

11. 将大量 DNA 制备管置于洁净的 50 ml 离心管中，在 DNA 制备管的基质上加 1.5 ml 水或 **Eluent**，室温静置 5 min。 $\geq 6,000 \times g$ 离心 5 min 收集质粒 DNA。
12. 可选步骤：同样方法，在 DNA 制备管的基质上加 0.75 ml 水或 **Eluent**，室温静置 1 min。 $\geq 6,000 \times g$ 离心 5 min 收集质粒 DNA。