

AxyPrep 无内毒素质粒小量试剂盒

本试剂盒采用 SDS 碱裂解法，结合 DNA 制备膜选择性吸附 DNA。同时采用特殊溶液（Buffer ETR 和 Buffer PF）有效去除内毒素，可从 1-4ml 细菌培养物中提取出多至 20 µg 高纯度质粒 DNA，其内毒素水平控制在 0.1 EU/µg 以下。

一、试剂盒组成、贮存、稳定性

Cat. No.	AP-MN-EP-4	AP-MN-EP-50	AP-MN-EP-150
制备次数	4 preps	50 preps	150 preps
制备管	4	50	150
2 ml 离心管	4	50	150
1.5 ml 离心管	8	100	300
RNase A	10 µl	30 µl	90 µl
Buffer S1	2 ml	15 ml	45 ml
Buffer S2	2 ml	15 ml	45 ml
Buffer S3	2.5 ml	21 ml	63 ml
Buffer W1	2.8 ml	30 ml	96 ml
Buffer W2 concentrate	2.4 ml	24 ml	72 ml
ET-free water (70% ethanol)	1.5 ml	18 ml	54 ml
Eluent A	1.0 ml	12 ml	36 ml
Buffer ETR	0.9 ml	9 ml	27 ml
Buffer PF	0.2 ml	2.5 ml	7.5 ml
说明书	1	1	1

RNase A: 50 mg/ml，室温可贮存 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），室温密闭贮存。

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，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，室温密闭贮存。

ET-free water (70% ethanol): 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，室温密闭贮存。

Eluent A : 洗脱液。室温密闭贮存。

Buffer ETR: 内毒素去除液。室温密闭贮存。

Buffer PF: 分相缓冲液。室温密闭贮存。

二、注意事项

Buffer S2、Buffer S3 和 Buffer W1 含刺激性化合物，操作时要戴乳胶手套和防护眼镜，避免沾染皮肤、眼睛和衣物，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 Buffer S1 中，4 °C 贮存。
2. 准备无核酸和核酸酶污染的 Tip 头、离心管。
3. 第一次使用前，Buffer W2 concentrate 中加入指定体积的无水乙醇。
4. 第一次使用前，ET-free water (70%ethanol)中加入指定体积的无水乙醇。使用前置于-20 °C 预冷。
5. 使用前，检查 Buffer S2 是否出现沉淀，如出现沉淀，应于 37 °C 温浴加热溶解并冷却至室温后使用。
6. Eluent A 在 65 °C 预热后使用，能提高质粒得率。
7. Buffer ETR 使用前放到 4 °C 预冷。
8. 准备 42 °C 水浴。

四、操作步骤

实验前，请务必认真阅读本试剂盒操作步骤。

1. 取 1-4 ml 在 LB 培养基中培养过夜的菌液（若使用丰富培养基，菌液体积应减半或更少），12,000×g 离心 1 min，弃尽上清。
2. 加 250 µl 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。
3. 加入 250 µl Buffer S2，温和并充分地上下翻转 4-6 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 CO₂ 中和 Buffer S2 中的 NaOH，降低裂解效率。
* 避免剧烈摇晃，否则将导致基因组 DNA 污染。
* 此步骤不宜超过 5 min。
4. 加 350 µl Buffer S3，温和并充分地上下翻转混合 6-8 次，12,000×g 离心 10 min。
* 避免剧烈摇晃，否则将导致基因组 DNA 污染。

步骤 5~8 可以选择负压法或离心法纯化质粒 DNA。

A. 负压法

5A. 将质粒 DNA 制备管插到负压装置的接口上。吸取步骤 4 中的离心上清并转移到制备管中，开

启并调节负压至-25-30 英寸汞柱，缓慢吸走管中溶液。

6A. 加 500 μ l **Buffer W1**，吸尽管中溶液。

7A. 加 700 μ l **Buffer W2**，吸尽管中溶液；以同样的方法再用 700 μ l **Buffer W2** 洗涤一次。

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

* 两次使用 **Buffer W2** 冲洗能确保盐份被完全清除，消除对酶切反应的影响。

8A. 将制备管置于 2 ml 离心管（试剂盒内提供）中，12,000 \times g 离心 1 min。

B. 离心法

5B. 吸取步骤 4 中的离心上清并转移到制备管（置于 2 ml 离心管（试剂盒内提供）中），12,000 \times g 离心 1 min，弃滤液。

6B. 将制备管置回离心管，加 500 μ l **Buffer W1**，12,000 \times g 离心 1 min，弃滤液。

7B. 将制备管置回离心管，加 700 μ l **Buffer W2**，12,000 \times g 离心 1 min，弃滤液；以同样的方法再用 700 μ l **Buffer W2** 洗涤一次。弃滤液。

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

* 两次使用 **Buffer W2** 冲洗能确保盐份被完全清除，消除对酶切反应的影响。

8B. 将制备管置回 2 ml 离心管中，12,000 \times g 离心 1 min。

9. 将制备管移入新的 1.5 ml 离心管（试剂盒内提供）中，在制备管膜中央加 150 μ l **Eluent A**，室温静置 1 min。12,000 \times g 离心 1 min。

10. 弃制备管。在滤液中加入 150 μ l 预冷的 **Buffer ETR**，剧烈混合 1 min。

* 如果 **Buffer ETR** 浑浊，于冰上静置，直至溶液变得清亮；如果出现分层，则需混合均匀后使用。

11. 加入 38 μ l **Buffer PF**，混合均匀。

12. 置于 42 $^{\circ}$ C 孵育 2 min。12,000 \times g 离心 2 min。

* 孵育后溶液为浑浊。

13. 取无色上相至 1.5 ml 离心管（试剂盒内提供）中，加入 0.8 倍体积异丙醇（如：取得 350 μ l 无色上相，则加入 280 μ l 异丙醇），混合均匀。室温静置 10 min。12,000 \times g 离心 10 min。

* 质粒含量较少时，会影响对沉淀的观察，此时需要在离心管上标记离心方向，以便观察和后续处理。

14. 尽可能弃尽上清。加入 1 ml 预冷的 **ET-free water (70% Ethanol)**，12,000 \times g 离心 5 min。

* **ET-free water (70% Ethanol)** 使用前确定已加入指定体积的无水乙醇。

15. 尽可能弃尽上清。在超净台中干燥 5-10 min。

* 管壁上残留液体可短暂离心后吸弃。

16. 加入 60 μ l **Eluent A** 溶解质粒 DNA。

五、流程图

加 250 μ l Buffer S1
加 250 μ l Buffer S2
加 350 μ l Buffer S3

加 500 μ l Buffer W1
加 700 μ l Buffer W2
加 700 μ l Buffer W2

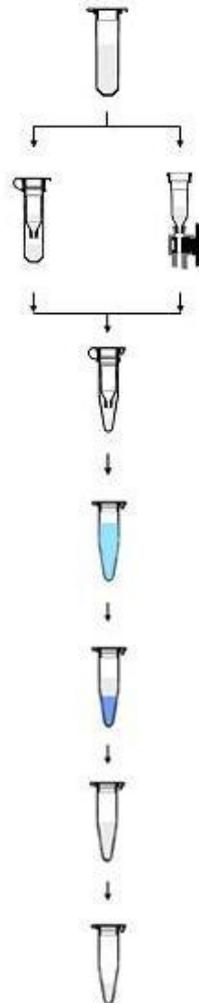
加 150 μ l Eluent A

加 150 μ l Buffer ETR
加 38 μ l Buffer PF
42 °C 孵育 2 min

12,000 \times g 离心2 min

加0.8 体积异丙醇至上相
加1 ml 预冷的ET-free water (70% Ethanol)

加60 μ l Eluent A



裂解
中和

结合
洗涤

洗脱

内毒素去除

分相

沉淀质粒

溶解质粒