

UE Easy-96质粒DNA小量试剂盒

UE-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

Cat. No.	UE-E96-P-4	UE-E96-P-24
Kit size	4×96	24×96
96-well Filtration plate	4	24
96-well 2.2 ml growblock	8	48
Silicone mat	12	72
Adhesive film	20 sheets	120 sheets
BF-400 breathable film	5	25
RNase A	270 µl	2×820 µl
Buffer S1	135 ml	2×410 ml
Buffer S2	135 ml	2×410 ml
Buffer NP	135 ml	2×410 ml
Protocol manual	1	1

RNase A: 50 mg/ml。室温贮存 6 个月；长期贮存于-20℃。

Buffer S1: 细菌悬浮液。加入 RNase A，混合均匀后，4℃ 贮存。

Buffer S2: 细菌裂解液（含 SDS/NaOH）。室温密闭贮存。

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℃ 贮存。
2. 准备 92℃ 水浴。
3. 使用前检查 Buffer S2 是否出现沉淀，若出现沉淀，应于 37℃ 温浴溶解，并冷却至室温后使用。
4. 4℃ 预冷 70%乙醇和 Buffer NP。

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℃ 贮存。

1. 96 孔 2.2 ml 深孔板（试剂盒内提供）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。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 300 μ l Buffer S1，用不干胶片密封各孔，用漩涡混合器悬浮细菌。悬浮必须充分，不应留有小的细菌团块。

* 确认 Buffer S1 中已加入 RNase A。

5. 每孔加 300 μ l 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。

* 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，降低溶菌效率。

6. 每孔加 300 μ l 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，8 min。

* 水浴温度不宜超过 92°C，否则易出现基因组 DNA 污染。

* 水浴时间不宜超过 15 min。

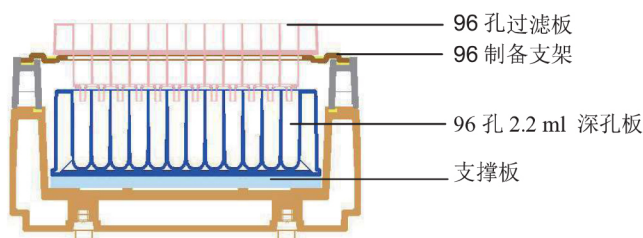
8. （可选步骤）转移至冰浴中，静置 15 min。

* 若采用步骤 7，步骤 8 为必须的步骤。

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. 将洁净的 96 孔 2.2 ml 深孔板（试剂盒内提供）放到负压装置内。将 96 孔滤板放置在负压装备的支架上且置于 96 孔 2.2 ml 深孔板上，保证滤板下部的导流管伸入到 96 孔 2.2 ml 深孔板中。（参照下图）



- 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 孔过滤板中；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 孔过滤板放置在洁净的 96 孔 2.2 ml 深孔板（试剂盒内提供）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 孔过滤板中。

10B. 同时将 96 孔过滤板和 96 孔 2.2 ml 深孔板放入离心机内， $2,000\times g$ 离心 5 min。

11. 除去 96 孔过滤板，在 96 孔 2.2 ml 深孔板每孔中加 650 μl 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 $3,000\times g$ 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 600 μl 冰浴预冷的 70% 乙醇，用新的硅胶片封住各腔， $3,000\times g$ 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完全，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，用新的不干胶片封住各腔，漩涡振荡溶解 DNA。

五、流程图

