

🔥 QIAGEN 质粒中提

当质粒的使用量过大时,可以使用中提的方法,扩大提取量。本 Protocol 使用 QIAGEN 的中提试剂盒,实验过程参照试剂盒说明书,包含质粒的提取操作和异丙醇沉淀的纯化操作

实验开始前, 检查试剂盒中的所有试剂:

- 在 4°C 冰箱中, 检查含有 RNase 和 LyseBlue 的 P1 Buffer, 以及中提所需要的 P3 Buffer
- 无菌水、异丙醇、4°C 预冷的 75% 酒精

实验前一天:

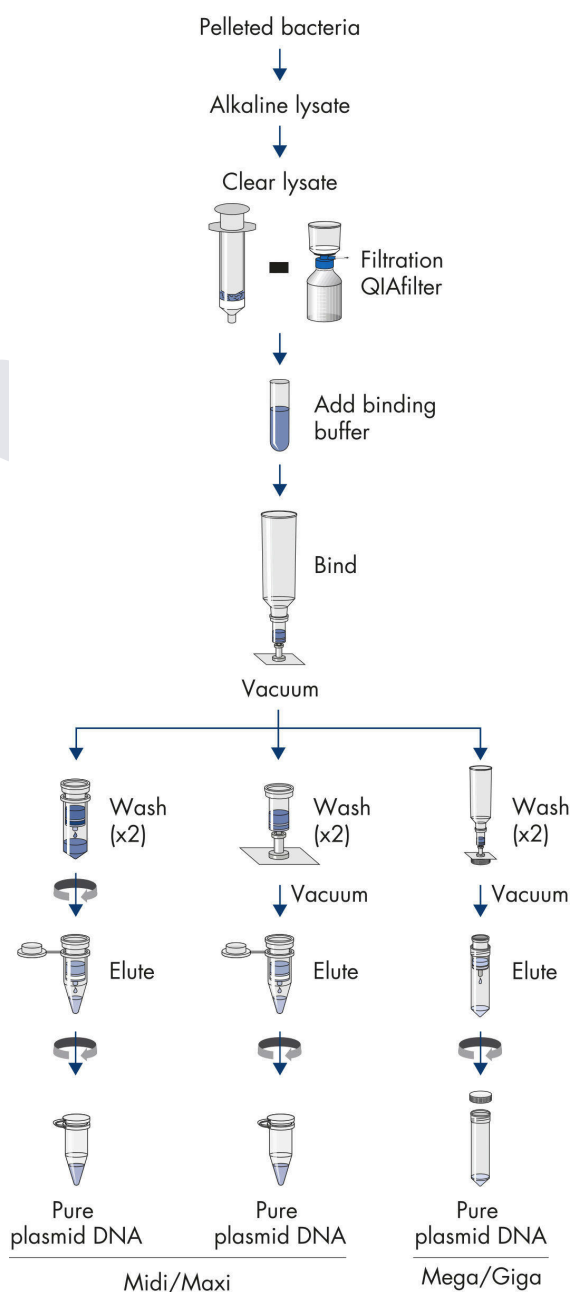
1. 配制 150 mL LB, 加入抗生素后, 1:1000 接菌, 37°C 220rpm 过夜摇菌

实验当天:

本实验移液需要使用电子移液器和移液管, 调整出液速度为 5, 所有加入液体的操作都沿侧壁

2. 将 150 mL 菌液分装至 3 个 50 mL 管中(无需保持无菌环境), 配平后, 4°C 4000 rpm 离心 10 分钟
3. 开盖倒掉培养基上清(每个样品留一个离心管盖子), 控干液体后, 使用 6 mL 4°C 预冷的 P1 Buffer 将菌体重悬, 并合并为一管, 涡旋振荡 30 秒
4. 添加 6 mL P2 Buffer, 盖上盖子, 轻柔地颠倒混匀 4-6 次, 并室温静置 5 分钟, 此时样品呈现为深蓝色; DNA 在碱裂时易受损伤, 因而这一步需要 **严格计时**, 计时到 4 分时提前取出 4°C 预冷的 P3 Buffer 并准备好加液
5. 在静置期间, 准备下一步的装置: 找到 QIAfilter Cartridge (下部带有旋钮的针管) 和其对应的 cap(一个小旋钮), 并将两者装好, 放在 50 mL 管架上, 确保稳定不倒

QIAGEN Plasmid *Plus* Procedure



6. 提前打开离心管盖子(此时可能会有粘液拉丝, 可以拽着盖子扯到远处使其自然断掉), 准时加入 6 mL 预冷的 P3 Buffer, 盖盖颠倒混匀 4-6 次, 直至样品颜色完全消失, 溶液澄清
7. 将澄清样品连同沉淀物一起倒入 QIAfilter Cartridge(下端已封口), 室温孵育 10 分钟, 孵育期间不要装上针管塞子
8. 孵育期间, 准备铁饭盒或其他大开口容器作为废液缸, 使用试剂盒提供的 QIArack 配合底部开口的橙色 50 mL 管架, 将 HiSpeed Tip 固定好, 加入 4 mL QBT Buffer 洗柱子
9. 孵育完成后, 打开针管底部的旋钮, 使用针管塞子将澄清液体压入到 HiSpeed Tip, 注意不要压太快防止沉淀物堵塞, 直至完全按压不出液体为止
10. 当液体滤过 Tip 后, 加入 20 mL QC Buffer 洗柱子
11. 待流尽后再加入 5 mL QF Buffer 洗脱 DNA, 下接到 15 mL 管中
12. 加入 3.5 mL 异丙醇, 混匀并室温静置 5 分钟 (这一步可以暂停下实验, 需将样品在 4°C 暂存)
13. 期间准备 20 mL 针管和 QIAprecipitator Module, 拔出针管塞后, 再在针管前端装上沉淀过滤器(插紧即可, 别太用力, 防止滤器口破裂)
14. 静置时间到后, 将 DNA-异丙醇溶液倒入针管中, 常压过滤进滤器(别压太猛, 轻用力, 缓慢推. 防止堵塞)
15. 取下滤器, 用纸擦干滤口, 拔出塞子, 装上滤器, 加入 2 mL 75% 酒精, 装上塞子, 轻推慢压
16. 取下滤器, 用纸擦干滤口, 拔出塞子, 装上滤器, 装上塞子, 强推空气, 挤压出剩余的液体
17. 再重复上一步骤 1 次, 确保挤压不出残留液体
18. 取下滤器, 取 5 mL 针管, 拔下塞子, 装上滤器, 加入 1 mL 无菌水, 装上塞子, 将 DNA 洗脱进 1.5 mL 管中
19. 使用洗脱液, 重复上一步操作再次洗脱一遍, 确保 DNA 被完全洗脱出来
20. 标记样品, 测定浓度, 可以进行稀释或乙醇沉淀浓缩; 收拾整理实验用品 (试剂盒中装置均为一次性用品)

修订日期 2024-04-23