**NucleoBond® Xtra Midi/Maxi Plus(740412.2/740416.2)操作总流程**

**注意：严格控制菌体培养条件（抗生素等），分高、低拷贝质粒进行处理。**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **步骤** | **操作描述** | **体积** | | **重要提示** |
| **Midi** | **Maxi** |
| **1实验准备** | 向RNase A中加入1ml 缓冲液RES，完全溶解后转移到RES中，4°C保存。 |  |  | 缓冲液LYS在室温下储存（20-25°C），因为其中含有SDS，如果出现沉淀，将其置于30-40°C数分钟，直至完全溶解。 |
| **2菌体培养** | **A 准备起始培养液**  将一个单菌落自平板中挑出，培养在3-5 ml的起始LB培养基中。37 °C，300rpm培养8 h。 |  |  | 确保平板和液体培养基中含有合适的选择性抗生素以保证质粒的繁殖（更多信息参照说明书4.3部分）。 |
|  | **B 过夜培养准备大量菌液**  将起始培养液用一定体积的LB培养基1/1000稀释，LB培养基中含有合适的选择性抗生素，过夜培养。如果已知菌种在培养基种的生长状况不佳或质粒不是高拷贝的，请参照说明书4.4部分，进行大规模培养。  37°C持续摇菌（300 rpm），12-16 h | 不低于**200 ml**  （高拷贝）  **400ml**(低拷贝) | 不低于**600ml**  （高拷贝）  **1200ml**(低拷贝) | 注意：为全部利用NucleoBond® Xtra纯化柱的高结合率，提供足量的质粒DNA是十分重要的。如果不是十分清楚质粒的拷贝数，及宿主的生长情况，增加培养体积，并在第3步确定操作中使用多少菌。  1、ODV = OD600 x Vol [ml]  2、菌湿重 |
| **3菌体收集** | 测定细胞培养液的OD600并取得培养液的体积。4,500-6,000 × g，4°C离心≥10min，完全弃去上清液。  Vol [ml]= ODV /OD600  **推荐体积：**是指在高拷贝下用上述公式计算得到的体积。故低拷贝的一般都要加双倍体积的RES，LYS和NEU。 | **高拷贝**  ODV =400  湿重：  0.75g  **低拷贝**  ODV =  800  湿重：  1.5g | **高拷贝**  ODV =1200  湿重：  2.25g  **低拷贝**  ODV =  2400  湿重：  4.5g | 可以使用大体积的培养液，例如，如果质粒并非典型的高拷贝类型，在这种情况下，成比例的增加RES，LYS和NEU缓冲液体积。如果培养液的体积多于推荐培养液体积的2倍，推荐在**第8步**使用离心步骤来澄清裂解液，而不使用NucleoBond® Xtra过滤管。 |
| **4重悬** | 将菌在重悬液RES＋RNaseA中重悬，用枪反复吸吹。  确保悬浮液中没有结块的菌，以使细菌得到有效的裂解。 | 8 ml | 12 ml | 如果使用了多于推荐的菌液体积，按比例增加RES缓冲溶液的体积。 |
| **5裂解细胞** | 向重悬液中加入裂解缓冲液LYS。将管颠倒5次，轻轻混和溶液。不要涡旋，避免剪切力使细胞碎片中的基因组DNA释放到重悬液中污染质粒。  将混和溶液在室温（20-25°C）下培育5min。 | 8 ml | 12ml | 如果使用多于推荐质量的细菌，按比例增加LYS缓冲液的体积 |
| **6 平衡** | 将平衡缓冲液EQU平衡NucleoBond® Xtra纯化柱和嵌入的过滤管。  将缓冲溶液**沿过滤管的周边**加入柱中，如图所示。使溶液通过重力流过，并保证溶液浸湿整个过滤管。 | 12 ml | 25 ml | 纯化柱不可以在干燥的状态下使用。 |
| **7中和** | 向悬浮液中加入中和缓冲液NEU，并立刻将管颠倒10-15次，轻轻混和溶液，不要涡旋。  确保中和完全以沉淀所有的蛋白和基因组DNA。使裂解液从一种连续的粘稠溶液变成低粘度，有白色絮凝沉淀的悬浮液。 | 8 ml | 12 ml | 立刻开始第8步。没必要将裂解液孵育一段时间;  如果使用多于推荐质量的细菌，按比例增加NEU缓冲液的体积;  这一步使用的烧瓶或管子不可以装载超过2/3的体积，以保证溶液的均一混和。 |
| **8澄清并上柱** | 在将裂解液加入到平衡了的NucleoBond® Xtra柱上之前，为确保沉淀的**重悬液是均一**的，将颠倒管3次，以避免过滤管的堵塞。（**这点非常重要！**）  裂解液被同时澄清并加入到柱上。如果一次不能全部加到过滤管中，重新加入多余的裂解液。使之通过重力流过。 |  |  | 如果培养液的体积多于推荐培养液体积的2倍，建议先用离心（≥5,000×g，至少10 min）的方法去除沉淀。 |
| **9EQU洗涤过滤管和纯化柱** | 用平衡缓冲液EQU洗涤NucleoBond® Xtra过滤管和纯化柱。 | 5 ml | 15 ml | 将缓冲液沿漏斗形过滤管的边缘加入，并且保证其将过滤管中剩余的裂解液都完全洗涤。忽略此步骤可能会降低质粒的产量。 |
| **10弃掉过滤管** | 将NucleoBond® Xtra过滤管拉出或将纯化柱颠倒取出过滤管弃掉。 |  |  |  |
| **11洗涤纯化柱（WASH）** | 用洗涤缓冲液WASH洗涤NucleoBond® Xtra纯化柱。在加入洗涤缓冲液WASH之前，一定要在洗涤前将过滤管取出，避免降低纯度。 | 8 ml | 25 ml |  |
| **12洗脱** | 用洗脱缓冲液ELU洗脱质粒DNA。 | 5 ml | 15 ml | 利用UV分光光度法测定质粒的产量，以调节DNA的目标浓度，并计算沉淀后的得率。 |
|  |  | Midi -  Finalizer | Maxi -  Finalizer Large | 如果midi的需要**1mg/ml**以上的浓度，maxi的需要**3mg/ml**以上的浓度,推荐不要用Finalizer，而是参照英文说明24页的12-15步进行。 |
| 13 DNA  **沉淀** | 向洗脱液中加入0.7 V异丙醇（室温），vertex混匀，静置2 min。 | 3.5 ml | 10.5 ml | 如果从一次处理的样品个数较多也可以选择离心沉淀法 |
| **14 DNA**  **沉淀液装载入注射器** | 抽出注射器中的柱塞，用红色的塞子将注射器的头部塞住，将DNA沉淀液装载入30ml注射器中，插入柱塞，颠倒注射器将红色塞子换成Finalizer。用均衡的力缓慢推进DNA沉淀液通过Finalizer，弃去透过液。 |  |  | 红色塞子在30ml注射器中；  此步操作需倍加小心，防止液体漏溅，影响产量。 |
| **15洗涤沉淀** | 类似上步，向30ml注射器中加入2ml 70％乙醇，用均衡的力缓慢推进乙醇通过Finalizer，弃去透过液。 | 2ml | 2ml | 70％乙醇需另备。 |
| **16干燥Finalizer** | 类似上步，用均衡的力**缓慢**推进注射器中的空气通过NucleoBond® Finalizer，至少3次，直到没有乙醇吹出。 |  |  | 可以用一个新的注射器加速此步（未提供，可以把以前用过的洗净晾干备用） |
| **17洗脱DNA** | 取1ml注射器，类似上步，向其中加入重溶缓冲溶液**TRIS**或TE，用均衡的力缓慢推进注射器中缓冲溶液通过Finalizer，收集洗脱液。 | 500-1000μl | 500-1000μl | 详细的见说明书中4.9；  准备新的Ep管收集洗脱液，先将Ep管置于注射器底部，再加入洗脱液。 |
|  | 将第一次的洗脱液全部加到1ml注射器中，重复上步，收集洗脱液。 | 第一次的全部洗脱液 | 第一次的全部洗脱液 | 此步有利于提高产量。  最后还需用针筒吹一下，以确保Finalizer中残留的溶液都下来。 |
| **18确定产量** | 利用UV分光光度法测定质粒的产量，并用琼脂糖凝胶电泳法检测其质量。 |  |  | 核酸浓度可以通过测定260nm处的1cm光路的光吸收来确定。 |