

Wizard[®] Plus SV

小量制备 DNA 纯化系统



原英文技术手册号码: TB225

本说明书用于产品 A1270, A1330, A1340, A1460 和 A1470。
所有的技术文献均可从公司网站 www.promega.com 得到
请访问公司网站以证实您所使用的技术手册为最新版本

I. 介绍.....	2
II. 产品组成	3
III. 操作方法.....	4
A. <i>E. Coli</i> 的制备.....	4
B. 澄清裂解液产物.....	5
C. 质粒 DNA 的分离及纯化操作方法.....	5
IV. 补充信息.....	6
A. 质粒及 <i>E. Coli</i> 菌株的选择及制备.....	6
B. 挑选菌株.....	7
C. 碱性蛋白酶的使用.....	8
D. 用于荧光自动测序的有关注意事项.....	8
V. 问题及解决方法.....	9
VI. 溶液及缓冲液的组成.....	10
VII. 相关产品.....	11
VIII. 参考文献.....	11

I. 介绍

Wizard® Plus SV 小量制备 DNA 纯化系统为快速分离质粒 DNA 提供了简单可靠的方法。整个过程所用时间取决于处理样品的数量，一般在 30 分钟或更短的时间之内即可完成。该系统能够分离 *E. Coli* 宿主中的各种质粒，但当质粒小于 20, 000bp 时最有效。纯化的质粒不需后续处理即可用于 DNA 荧光自动测序及其它标准的分子生物学操作。当用于体外转录实验时，需配合核糖核酸酶抑制剂使用，如：重组 RNasin® 核糖核酸酶抑制剂(Cat.#N2511)。

本手册提供的方法用于从 *E. Coli* 中分离质粒 DNA。使用 Wizard® Plus SV 小量制备 DNA 纯化系统，可以从 1-10ml 过夜培养的 *E. Coli* 中纯化质粒 DNA。许多因素都能够影响质粒的产量，包括细菌培养液的体积，质粒的拷贝数，培养基的种类及所使用的菌株。图 1 是使用 Wizard® Plus SV 小量制备 DNA 纯化系统分离及纯化质粒 DNA 的示意图。

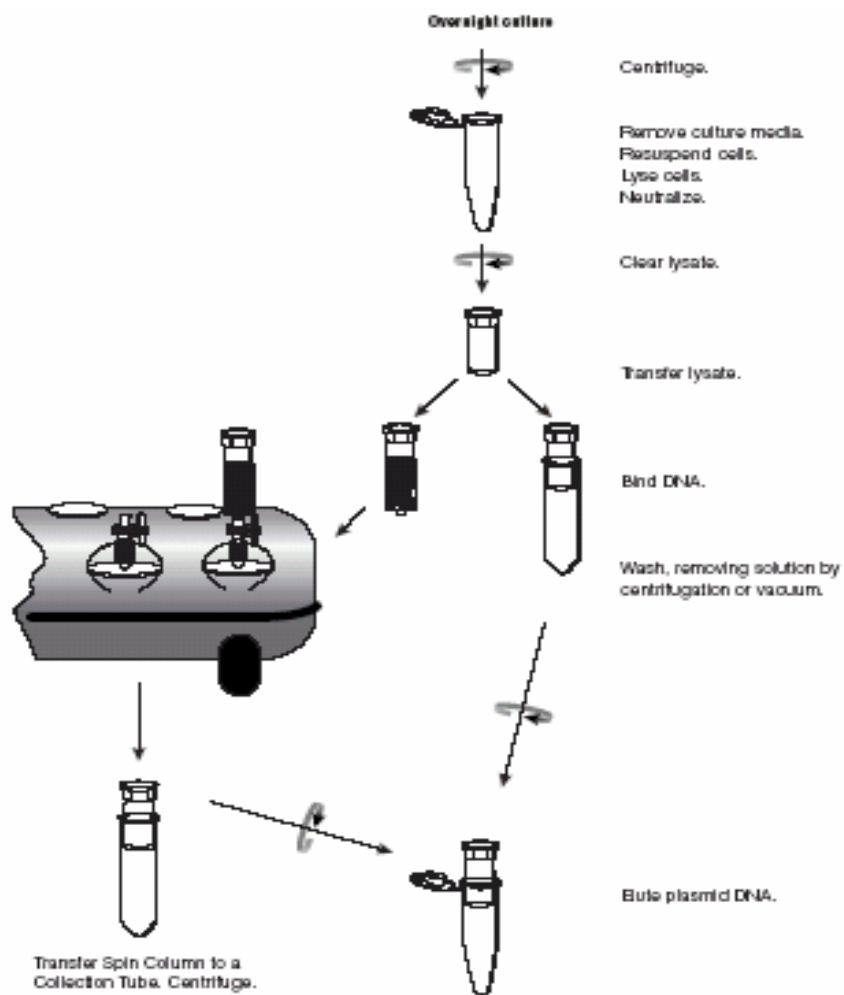


图 1. 使用 Wizard® Plus SV 小量制备 DNA 纯化系统分离及纯化质粒 DNA 流程图。

II. 产品组成

产品	包装	目录号
Wizard® Plus SV 小量制备 DNA 纯化系统 (带真空转接器)	50 次制备	A1340

实验室使用。每个系统提供足够进行 50 次分离所需的试剂,每次分离可处理 1-10ml 培养液。包括:

- 20ml Wizard® Plus SV 细胞悬浮液
- 20ml Wizard® Plus SV 细胞裂解液
- 30ml Wizard® Plus SV 中和溶液
- 20ml Wizard® Plus SV 柱清洗液
- 50 Wizard® SV 微量柱
- 50 收集管 (2ml)
- 550µl 碱性蛋白酶溶液
- 13ml 无核酸酶纯水
- 20 真空转接器
- 1 技术手册

产品	包装	目录号
Wizard® Plus SV 小量制备 DNA 纯化系统 (带真空转接器)	250 次制备	A1470

实验室使用。每个系统提供足够进行 250 次分离所需的试剂,每次分离可处理 1-10ml 培养液。包括:

- 75ml Wizard® Plus SV 细胞悬浮液
- 75ml Wizard® Plus SV 细胞裂解液
- 100ml Wizard® Plus SV 中和溶液
- 100ml Wizard® Plus SV 柱清洗液
- 250 Wizard® SV 微量柱
- 250 收集管 (2ml)
- 2,700µl 碱性蛋白酶溶液
- 25ml 无核酸酶纯水
- 20 真空转接器
- 1 技术手册

产品	包装	目录号
Wizard® Plus SV 小量制备 DNA 纯化系统	50 次制备	A1330
	250 次制备	A1460

实验室使用。

产品	包装	目录号
Wizard® Plus SV 小量制备 DNA 纯化系统(试用装)	10 次制备	A1270

实验室使用。每个系统提供足够进行 10 次分离所需的试剂,每次分离可处理 1-10ml 培养液。包括:



注意: 不要用其它 Wizard® Plus 系统中的任何组分替代 Wizard® Plus SV 小量制备 DNA 纯化系统中的组分。Wizard® Plus 和 Wizard® Plus SV 系统中的组分不能互换。

注意: 产品 A1330 和 A1460 不包括真空转接器。

注意: 本中文操作手册仅供实验参考,在实际使用中请详细对照原英文技术手册 TB225。如遇到问题请与 Promega 公司北京办事处联系, 免费电话: 8008108133; E-mail: promega@promega.com.cn

技术手册号码: CTB225

- 3ml Wizard® Plus SV 细胞悬浮液
- 3ml Wizard® Plus SV 细胞裂解液
- 4ml Wizard® Plus SV 中和溶液
- 4ml Wizard® Plus SV 柱清洗液
- 10 Wizard® SV 微量柱
- 10 收集管 (2ml)
- 550µl 碱性蛋白酶溶液
- 1ml 无核酸酶纯水
- 5 真空转接器
- 1 技术手册

储存及稳定性: 所有 Wizard® Plus SV 小量制备组分都应存放于 22-25 °C。试剂的有效期标注于产品标签上。

III. 操作方法

由用户准备的材料

(溶液组成见章节 VI.)

- 含抗生素的 LB 琼脂平板
- 含抗生素的 LB 培养液
- 酒精 (95%)
- 能够达到 14,000 x g 的微量离心机
- 1.5ml 消毒离心管
- 能够达到 10,000 x g 的离心机

在使用 Wizard® Plus SV 小量制备 DNA 纯化系统前,按照下述方法稀释 Wizard® Plus SV 柱清洗液:

对于 10 次制备系统 (Cat.#A1270): 加入 **7ml** 95%酒精至终体积为 **11ml**。

对于 50 次制备系统 (Cat.#A1330 和 A1340): 加入 **35ml** 95%酒精至终体积为 **55ml**。

对于 250 次制备系统 (Cat.#A1460 和 A1470): 加入 **170ml** 95%酒精至终体积为 **270ml**。

注意: 当 A₆₀₀ 达到 2.0-4.0 时, 细菌就达到了适于收获并分离 DNA 的生长密度。

A. 大肠杆菌的制备

1. 从新鲜的 LB 琼脂平板 (含抗生素) 上挑出一个单个并容易分离的克隆放入 1-10ml LB 培养液 (含相同的抗生素) 进行培养。我们推荐使用 LB 培养液。富含营养的培养液, 如 Terrific Broth, 会导致细胞浓度过高, 这样会使 DNA 纯化系统过载。
2. 于 37 °C 摇床中培养过夜 (12-16 小时)。对于确定体积的培养液, 培养时间可以优化以提高质粒 DNA 的产量。但是曾经观察到培养时间过长会导致质粒 DNA 的产量下降, 这是由于培养液中的细胞死亡及裂解造成的。

对于高拷贝数的质粒, 我们推荐处理的细菌培养物不要超过 5ml。如果处理的细菌培养物超过 5ml, 就会超出 Wizard® SV 微量柱的处理范围因而不会提高质粒 DNA 的产量。

对于低拷贝数的质粒，有必要处理较大体积的细菌培养物（多至 10ml）以获得足够的质粒 DNA。处理量如果超过 10ml 则会导致细菌裂解液无法充分澄清并因此增加质粒 DNA 的污染。

B. 获得澄清的裂解液

1. 将 1-5ml (高拷贝数的质粒)或 10ml (低拷贝数的质粒) 的细菌培养物用台式离心机 10,000 x g 离心 5 分钟。弃去上清并将试管倒置于纸巾上吸去剩余的培养液。
2. 加入 250µl 细胞悬浮液并旋涡震荡或吹打以充分悬浮细胞。充分悬浮细胞非常关键。如果不在离心管中，将悬浮的细胞转移至 1.5ml 消毒离心管中。
3. 加入 250µl 细胞裂解液并颠倒离心管 4 次以充分混合(不要旋涡震荡)。孵育至细胞悬浮液澄清，大约需要 1-5 分钟。

注意：加入碱性蛋白酶溶液（第 4 步）之前观察裂解液部分澄清非常重要；但是孵育时间不要超过 5 分钟。

4. 加入 10µl 碱性蛋白酶溶液并颠倒离心管 4 次以充分混合。于室温孵育 5 分钟。

碱性蛋白酶能够灭活核酸酶及其它在细菌裂解过程中释放出的能够影响分离质粒质量的蛋白。

5. 加入 350µl Wizard[®] Plus SV 中和溶液并迅速颠倒离心管 4 次以充分混合（不要旋涡震荡）。
6. 于室温将细胞裂解液以最大速度（约 14,000 x g）离心 10 分钟。

C. 质粒 DNA 的分离及纯化操作方法

同时购买了真空转接器(Cat.#1340, A1470)的用户使用 Wizard[®] Plus SV 小量制备 DNA 纯化系统时，可以对质粒 DNA 的纯化方法进行选择。可以利用离心细菌裂解液使得澄清裂解液流过 Wizard[®] SV 微量柱并清洗质粒 DNA 的方法来纯化质粒 DNA。或者利用真空使得裂解液流过离心柱并清洗质粒 DNA。纯化质粒 DNA 时可以利用真空转接器连接真空接头及真空源。

离心方法

质粒 DNA 纯化单元的准备：对于每一个样品将一个离心柱插入一个 2ml 收集管中。

真空方法

将一个带有 LuerLok[®] 的真空转接器与接头（例如：Vac-Man[®] 实验室真空接头）的一个出口相连。将一个离心柱插入真空转接器并紧密贴合。

注意：第二步以后，不要旋涡震荡以避免切断染色体 DNA。

注意：第四步用碱性蛋白酶孵育时，不要超过 5 分钟，否则质粒 DNA 会出现缺口。

注意：如果不小心将白色沉淀转移到了离心柱中，将离心柱中的内含物重新转入一个 1.5ml 消毒离心管中并以最大速度离心 5-10 分钟。将离心后的上清液转移至先前使用的离心柱中。离心柱中可以重复使用，但仅限于同一样品。

英寸汞柱与其它压力度量单位的比较。

15 英寸汞柱

50.8kPa

381 Torr

0.501atm

7.37psi

38.1cm Hg

508mbar

注意：如果 DNA 将用于自动荧光测序，在第十一步不要向 DNA 中加入 TE 缓冲液。

1. 将澄清裂解液（大约 850 μ l，章节 III.B, 第 6 步）转移至准备好的离心柱中。不要搅动或将任何白色沉淀与上清液一同转移。
 2. 于室温用离心机以最大速度离心上清液 1 分钟。从收集管中取出离心管并弃去收集管中的液体。将离心柱重新插入收集管中。
 3. 加入 750 μ l 先前用 95%酒精稀释过的柱清洗液。
 4. 于室温用离心机以最大速度离心 1 分钟。从收集管中取出离心管并弃去收集管中的液体。将离心柱重新插入收集管中。
 5. 用 250 μ l 柱清洗液重复清洗步骤。
 6. 于室温用离心机以最大速度离心 2 分钟。
 7. 将离心柱转移至一个新的 1.5ml 消毒离心管中，操作时需小心，不要将任何一点柱清洗液与离心柱一同转移。如果离心柱上粘有柱清洗液，则重新以最大速度离心 1 分钟。
 8. 将离心柱转移至一个新的 1.5ml 消毒离心管中。
 9. 将 100 μ l 无核酸酶的水加入离心柱以洗脱质粒 DNA。于室温用离心机以最大速度离心 1 分钟。
 10. 洗脱质粒 DNA 后，将离心柱从 1.5ml 消毒离心管中取出并弃去离心柱。
 11. 不加缓冲液的 DNA 水溶液在-20 $^{\circ}$ C 及以下是稳定的。TE 缓冲液中的 DNA 在 4 $^{\circ}$ C 是稳定的。如果需要将 DNA 存放于 TE 缓冲液中，将 11 μ l 10XTE 缓冲液加入 100 μ l 洗脱的 DNA 中。
 12. 将离心管盖好并将纯化后的质粒 DNA 存放于-20 $^{\circ}$ C 或以下。
1. 将澄清裂解液（大约 850 μ l，章节 III.B, 第 6 步）转移至准备好的离心柱中。不要搅动或将任何白色沉淀与上清液一同转移。
 2. 使用最少 15 英寸汞柱的真空将液体从离心柱吸出。当所有的液体被吸出后，释放真空。
 3. 加入 750 μ l 先前用 95%酒精稀释过的柱清洗液。
 4. 用真空将柱清洗液从离心柱吸出。当所有的液体被吸出后，释放真空。
 5. 用 250 μ l 柱清洗液重复清洗步骤。用真空将液体从离心柱吸出。
 6. 继续使用真空 10 分钟以吸干离心柱。
 7. 关闭真空并将离心柱转移至一个 2ml 收集管中。以最大速度离心 2 分钟以除去残留的柱清洗液。弃去 2ml 收集管及本步收集的所有液体。

IV. 补充信息

A. 质粒及 *E. Coli* 菌株的选择及制备

可以利用 Wizard[®] Plus SV 小量制备 DNA 纯化系统从过夜培养的 *E. Coli* 中纯化质粒 DNA。质粒的产量与许多因素有关，包括质粒的拷贝数，细菌培养液中细胞的密度，培养基的种类及所使用的菌株。

质粒的拷贝数是影响质粒 DNA 产量的重要因素。质粒的拷贝数主要取决于并包括复制起始区在内的 DNA 周围区域。这一区域通常被称为复制子，有细菌的酶复合体控制质粒 DNA 复制。如果将某些 DNA 插入某一特定的质粒，将会干扰质粒的复制而降低其拷贝数。

从新鲜的 LB 琼脂平板（含抗生素）上挑出一个单个并容易分离的克隆放入 1-10ml LB 培养液（也含抗生素）进行培养。培养物应于 37 °C 摇床中培养过夜(12-16 小时)。对于高拷贝数的质粒而言,当 A₆₀₀ 达到 2.0-4.0 时, 细菌就达到了适于收获并分离 DNA 的生长密度。

B. 挑选菌株

核酸内切酶 I 是一种 12k Da 的胞周蛋白, 它可以降解双链 DNA。该蛋白有 *endA* 基因编码。基因型为 *endA1* 的 *E. Coli* 在野生型的 *endA* 基因中引入了一个突变, 导致其产生没有活性的内切酶。具有这种突变的 *E. Coli* 被命名为 EndA⁻。

表 1 是 EndA⁻和 EndA⁺ *E. Coli* 菌株的列表。

表 1. EndA⁻和 EndA⁺ *E. Coli* 菌株

EndA ⁻	EndA ⁺
BJ5183	BL21(DE3)
DH1	CJ236
DH20	HB101
DH21	JM83
DH5α TM	JM101
JM103	JM110
JM105	LE392
JM106	MC1061
JM107	NM522 (所有的 NM 系列菌株均为 EndA ⁺)
JM108	NM554
JM109	P2392
MM294	PR700 (所有的 PR 系列菌株均为 EndA ⁺)
Select96 TM	Q358
SK1590	RR1
SK1592	TB1
SK2267	TG1
SRB	Y1088 (所有的 Y10 系列菌株均为 EndA ⁺)
TOP10	BMH 71-18
XL1-Blue	ES1301
XLO	

如果 *E. Coli* 菌株的基因型中缺少 *endA1* (或 *endA*) 则意味着存在野生型基因, 它表达具有活性的核酸内切酶 I。野生型表示为 EndA⁺。利用 Wizard[®] Plus SV 小量制备 DNA 纯化系统可以轻易地从 EndA⁻和 EndA⁺ *E. Coli* 菌株中获得高质量的 DNA。但是 EndA⁺ *E. Coli* 菌株对于许多应用都存在一些问题。一般而言, 我们推荐尽可能使用 EndA⁻菌株, 特别是对于诸如自动荧光测序一类的应用。

对于诸如自动荧光测序一类的应用, 应特别注意选择质粒及菌株以优化产量及质粒质量。若要得到适宜的荧光 DNA 测序结果, 质粒扩增时应使用高拷贝数质粒及 EndA⁻菌株。

注意: 本中文操作手册仅供实验参考, 在实际使用中请详细对照原英文技术手册 TB225。如遇到问题请与 Promega 公司北京办事处联系, 免费电话: 8008108133; E-mail: promega@promega.com.cn

技术手册号码: CTB225

注意：为了得到适宜的自动荧光测序结果，一般使用高拷贝数质粒及 EndA⁻ E.coli 菌株。

C. 碱性蛋白酶的使用

为了提高从 EndA⁻ 和 EndA⁺ *E. Coli* 菌株分离的质粒 DNA 质量，Wizard[®] Plus SV 小量制备 DNA 纯化系统包含了碱性蛋白酶溶液。碱性蛋白酶，最初被命名为 subtilisin Carlsberg，是从 *Bacillus licheniformis* 细菌中分离到的 (1)。在制备澄清细菌裂解液以灭活核酸内切酶的过程中，于裂解步骤的最后向每个样品中加入大约 250µg 碱性蛋白酶。碱性蛋白酶也可以非特异性地降解蛋白，这样就降低了澄清细菌裂解液中蛋白污染的整体水平 (2,3)。

碱性蛋白酶在本步骤中非常有用，因为它的最适 PH 为 9 或以上，能够在裂解步骤的环境中保持活性。当裂解液被中和后，碱性蛋白酶活性也随着降低 (4,5)。

本方法制备的 DNA 已经被广泛的分子生物学应用所验证，包括荧光测序，内切酶消化及克隆。

D. 用于自动荧光测序时的有关注意事项

对于自动荧光测序应用，应特别注意选择质粒种类及大肠杆菌菌株以优化产量及质粒质量。

纯化的质粒 DNA 必须在适于自动循环测序的浓度范围内 (理想浓度为 0.2µg/µl 而不要低于 0.1µg/µl)。当操作低拷贝质粒时，我们强烈推荐：在任何应用之前，应使用琼脂糖凝胶/溴乙啶方法确定质粒 DNA 的浓度 (6)。用分光光度计对 DNA 定量容易导致误差而且需要大量的样品。

当使用 pGEM[®] 载体及 1.5ml LB 培养液中的 DH5α[™] 细胞时，Wizard[®] Plus SV 小量制备 DNA 纯化系统的常规质粒 DNA 产量为 3.5-5.0µg。对于低拷贝数质粒，需要较大体积的培养液以得到足够用于测序的 DNA。当使用 pALTER[®] -1 载体(安卡抗性)及 10ml LB 培养液中的 DH5α[™] 细胞时，典型低拷贝数质粒 DNA 产量为 1.5-3.0µg。

使用 BigDye[®] 试剂测序时的特别注意事项

用 Wizard[®] Plus SV 小量制备 DNA 纯化系统纯化的模板适用于许多荧光染色测序方法，包括 ABI PRISM[®] BigDye[®] 末端终止反应 (Perkin-Elmer Cat.#4303149, 4303150, 4303151)。

当稀释 BigDye[®] 终止反应混合物时必须使用合适的稀释缓冲液 (250 mM Tris-HCl [PH 9.0], 10mM MgCl₂)。

当使用高拷贝数质粒并将终止反应混合物稀释 6 倍时，可以得到超过 500 碱基的可读序列。

表 2 概括了为得到 BigDye[®] 终止反应混合物的合适稀释度而需要的终止反应混合物和稀释缓冲液的量。如需了解这些反应的详细信息，请参考 BigDye[®] 末端终止系统提供的操作手册。对于每一反应，应将表 2 中的试剂加入到单独的试管中。

表 2. BigDye® 末端终止反应的合适稀释度

组分	量			
	不稀释	1:2	1:4	1:6
终止反应混合物*	8.0µl	4.0µl	2.0µl	1.3µl
双链质粒 DNA				
模板	200-500ng	200-500ng	200-500ng	200-500ng
引物	3.2pmol	3.2pmol	3.2pmol	3.2pmol
稀释缓冲液**	0µl	2.0µl	3.0µl	3.4µl
加入无核酸酶纯水使终体积为:	20µl	20µl	20µl	20µl

*终止反应混合物是 2.5X 溶液。

**稀释缓冲液是 5X 溶液。

VI. 问题及解决方法

问题	可能原因	评论
细胞裂解不好	培养液中的细菌细胞太多	使用 A ₆₀₀ 为 2.0-4.0 的细菌培养液。所有培养液应含有抗生素。对于低或高拷贝数质粒使用推荐的培养体积（低拷贝数最多 10ml，高拷贝数最多 5ml）。
	沉淀的细菌细胞悬浮不好	在裂解细胞前充分悬浮细胞。旋涡震荡或吹打细胞悬浮液。悬浮后应看不到细胞团块。
无纯化的质粒 DNA	柱清洗液中未加入酒精	操作前按照章节 III 介绍的方法准备柱清洗液。
	质粒 DNA 定量不准	使用琼脂糖凝胶/溴乙啶电泳方法确定质粒 DNA 的产量。
质粒 DNA 产量低	在凝胶定量上样时 DNA 漂出加样孔	最后一步清洗后，确保干燥 10 分钟（真空方法），让剩余的酒精挥发掉。提高上样染料的浓度。
	使用了低拷贝数质粒	使用高拷贝数质粒。
质粒 DNA 产量低	细菌培养液中未转化	确认所有的液体及固体培养基中均使用了抗生素。
	细菌过度生长	从新鲜的过夜培养的平板上挑选一个克隆加入含有抗生素的培养基。于 37 °C 培养 12-16 小时。
质粒 DNA 产量低	细菌培养时间过长	了解所使用质粒的拷贝数；我们推荐使用高拷贝数质粒。
	使用了低拷贝数质粒	了解所使用质粒的拷贝数；我们推荐使用高拷贝数质粒。
质粒 DNA 有缺口	质粒 DNA 定量不准	使用琼脂糖凝胶/溴乙啶电泳方法确定质粒 DNA 的产量。不要依赖分光光度计定量的准确性。
	碱水解过程中孵育时间过长	当细胞悬液中加入裂解液及碱性蛋白酶孵育时，每一步不要超过 5 分钟。

对未标于此处的
问题，请与您当地的 Promega 办事处或分公司联系。进一步的资料可登陆网页 www.promega.com。

E-mail: techserv@promega.com

自动荧光测序结果不好	测序反应时加入的 DNA 太少	使用新挑选的 E. coli 克隆并用新鲜的 LB 培养基 进行培养。纯化质粒并用琼脂糖凝胶/溴乙啶电泳方法确定质粒 DNA 的产量。
	DNA 洗脱时使用了 TE 缓冲液	重新纯化质粒 DNA 并用无核酸酶的水洗脱 DNA。
	质粒 DNA 的浓度定量不准确	必须使用琼脂糖凝胶/溴乙啶电泳方法确定质粒 DNA 的产量。
内切酶无法消化	提高内切酶的浓度，延长消化时间	增加内切酶的用量或延长孵育时间。使用建议温度及适合所用内切酶的缓冲液进行消化。用乙醇沉淀质粒 DNA 以除去残留的盐。
染色体 DNA 污染	旋涡震荡或过度混合会造成染色体 DNA 污染使用了错误的试剂	样品中加入裂解液后不要旋涡震荡以避免切断染色体 DNA。 确认在使用前用酒精稀释柱清洗液。 注意：Wizard[®] Plus 和 Wizard[®] Plus SV 组分不能互换。
凝胶上的 DNA 产量看起来低于分光光度计的读数	洗脱的 DNA 中存在的痕量污染会导致分光光度计的读数升高	用苯酚:氯仿抽提并用乙醇沉淀 DNA，并在重复分光光度计读数前用 70%乙醇清洗 DNA 沉淀。用琼脂糖凝胶/溴乙啶电泳方法以得到最准确的定量结果。

VI. 缓冲液及溶液的组成

5X 稀释缓冲液

250mM Tris-HCl (PH 9.0)
10mM MgCl₂

10X TE 缓冲液

100mM Tris-HCl (PH 7.5)
10mM EDTA

LB 培养基

10g 酪蛋白胨
5g 酵母提取物
5g NaCl
15g 琼脂（仅用于平板）
溶解于 1L 双蒸水中。高压并冷却到 55°C 后加入抗生素。

Wizard[®] Plus SV 细胞裂解液

0.2M NaOH
1% SDS

Wizard[®] Plus SV 细胞悬浮液

50mM Tris-HCl (PH 7.5)
10mM EDTA
100µg/ml Rnase A

Wizard[®] Plus SV 中和溶液

4.09M 盐酸胍
0.759M 醋酸钾
2.12M 冰醋酸
最终 PH 约为 4.2。

Wizard[®] Plus SV 柱清洗液

168.2 mM 醋酸钾
22.6mM Tris-HCl (PH 7.5)
0.109mM EDTA (PH 8.0)
如章节 III 所述对于 50 次制备系统加入 35ml 95%酒精(对于 250 次制备系统加入 170ml 95%酒精,对于 10 次制备系统加入 7ml 95%酒精)。终浓度约为: 60% 酒精, 60mM 醋酸钾, 8.3mM Tris-HCl 及 0.04mM EDTA。

VII. 相关产品

产品	包装	目录号
Wizard [®] SV 96 质粒 DNA 纯化系统*	1x96 次制备	A2250
	5x96 次制备	A2255
Wizard [®] SV 9600 质粒 DNA 纯化系统	100x96 次制备	A2258
Wizard [®] SV 96细胞悬浮液*	500ml	A7113
Wizard [®] SV 96细胞裂解液*	500ml	A7123
Wizard [®] SV 96中和溶液*	500ml	A1481
Wizard [®] SV清洗液*	185ml	A1311
Wizard [®] SV 96 结合板*	10包	A2271
Wizard [®] SV 96 裂解物清除板*	10包	A2241
Vac-Man 实验室真空接头	20-样品容量	A7231
	2-样品容量	A7660
Vac-Man 96真空接头	96-孔容量	A2291
真空转接器	20	A1331
SV总RNA分离系统*	50次制备	Z3100
Bright-Glo [™] 荧光素酶检测系统	10次制备	Z3101

*实验室使用。

VIII. 参考文献

1. Guntelberg, A.V. and Otteson, M. (1954) *Compt. Rend. Trav. Lab. Carlsberg* **29**, 36.
2. Aehle, W. *et al.* (1993) Rational protein engineering and industrial application: Structure prediction by homology and rational design of protein-variants with improved 'washing performance'-the alkaline protease from *Bacillus alcalophilus*. *J. Biotechnol.* **28**, 31.
3. Van der Osten, C. *et al.* (1993) Protein engineering of subtilisins to improve stability in detergent formulations. *J. Biotechnol.* **28**, 55.
4. Vetter, R. *et al.* (1994) Highly alkaline proteases. U.S. Pat. No. 5,352,603. (October 4, 1994).
5. Shetty, J. K., Patel, C. P. and Nicholson, M. A. (1995) Method of preparation of purified alkaline proteases. U.S. Pat. No.5,439,817. (August 8, 1995).
6. Kahn, M. *et al.* (1979) Plasmid cloning vehicles derived from plasmids *Co/EI*, *F*, *R6K*, and *RK2*. *Meth. Enzymol.* **68**, 268.