

UE 无内毒素质粒大量试剂盒（离心法）

本试剂盒适合于从 100-250 ml 细菌培养物中提取多至 1.5 mg 高纯的质粒 DNA。提取的质粒 DNA 用于测序、体外转录与翻译、限制性内切酶消化、细菌转化等分子生物学实验。

一、试剂盒组成

Cat.No.	UE-MX-EP-S-10	UE-MX-EP-S-20
Kit size	10 preps	20 preps
Maxiprep column C7	10	20
Endotoxin-Removal column	10	20
Collection Tubes (50 ml)	20	40
Buffer AC (可选)	30 ml	60 ml
RNase A	1 ml	2×1 ml
Buffer S1	115 ml	230 ml
Buffer S2A	115 ml	230 ml
Buffer S3K	115 ml	230 ml
Buffer ETR	40 ml	80 ml
Buffer W2B concentrate	48 ml	96 ml
Eluent A	25 ml	50 ml
Protocol manual	1	1

二、运输和保存

试剂盒室温（15-30℃）干燥保存。RNase A 室温可贮存 6 个月，长期贮存于 -20℃。

三、实验准备及注意事项

- 第一次使用前，RNase A 全部加入 Buffer S1 中混匀，4℃贮存。
- 使用前确认 Buffer S2A 是否出现沉淀，如出现沉淀，应于 37℃ 水浴加热溶解并冷却至室温后使用。
- 使用前，Buffer W2B concentrate 中加入指定体积的无水乙醇。
- 加入 Buffer S2A 和 Buffer S3K 的两个步骤操作必须温和。剧烈摇晃将导致基因组 DNA 的污染。
- 需要自备无水乙醇、异丙醇和 50ml 干净离心管。
- 提取质粒 DNA 的产量与菌液浓度、菌株种类、质粒拷贝数、质粒大小等因素有关。

四、操作步骤

- 取 100-250 ml 过夜培养的菌液，8,000×g 离心 4 分钟，弃上清。

高拷贝质粒菌液最大推荐量		
OD ₆₀₀ ×ml 菌液	OD ₆₀₀ =1.5	OD ₆₀₀ =3.0
360	240 ml	120 ml

*菌体量太多会影响裂解效果导致得率降低，RNA 残留多异丙醇沉淀会堵住。

- 加 10 ml Buffer S1 悬浮细菌沉淀，旋涡振荡 30 s-1 min，悬浮需均匀，不应留有小的菌块。
*确认 Buffer S1 中已加入 RNaseA。
- 加 10 ml Buffer S2A，温和并充分地上下翻转 8-10 次混合均匀使菌体充分裂解，室温放置 2-3 min，此时菌液呈现透亮均质粘稠溶液。
此步骤不宜超过 5min，避免质粒 DNA 受到破坏。
- 加 10ml Buffer S3K，温和并充分地上下翻转 10-12 次混合均匀，出现白色絮状沉淀。室温放置 5 min，8,000×g 离心（4℃）10 min。
*加入 Buffer S3K 后应立即温和颠倒混匀，避免产生局部沉淀。

以下去内毒素步骤可选择常规版和加强版

- 5A. 常规版：**将步骤 4 中的上清液转入内毒素去除柱中，过滤到新的 50 ml 离心管（自备）中。

- 5B. 加强版：**步骤 5A 中的液体继续加入 3 ml 预冷的 Buffer ETR 颠倒混匀形成悬液。将悬液冰浴 5 min 后，再 42℃ 水浴 5 min，然后 10000 rpm 离心 5 min，放置 1-2 min，看到明显的下层蓝色分相，小心取上相。

*Buffer ETR 如果出现浑浊分层可以于冰上或者 4℃ 放置，直至溶液变得澄清

- 步骤 5 中的液体中加入 0.3 倍体积的异丙醇，上下颠倒混匀。
- （可选）制备管活化：向置于收集管中的制备管里添加 2.5 ml Buffer AC 静置 2 min，≥7,000×g 离心 2 min，弃除滤液。
*制备管活化处理过程能够改善制备管的均一性和稳定性，减少批间差异，消除高温/潮湿或者环境其它不良因素对其造成的影响。建议制备管放置超过 6 个月进行活化处理。
- 大量制备管放入 50 ml 收集管中，将步骤 6 中的混合液分 3-4 次转移至制备管中，≥7,000×g 离心 2 min。
*吸附柱最大容积为 15 ml，建议不要超过 12 ml，需要分 3-4 次过柱。个别离心机转子的倾角较大，此时建议减少加入吸附柱的溶液体积。
- 弃滤液，加 10 ml Buffer W2B，≥7,000×g 离心 2 min。重复操作一次。
- 弃滤液，加 3 ml 无水乙醇，≥7,000×g 离心 5 min。
- 将大量制备管置于另一洁净的 50 ml 收集管中，在制备管的膜中央上加 1-1.5 ml Eluent A，室温静置 2-5 min，≥7,000×g 离心 5 min 收集质粒 DNA，-20℃ 保存。

*低拷贝或者大片段质粒 DNA 将 Eluent A 或去离子水加热至 65℃ 将提高洗脱效率。

*首次洗脱可获得 65%-80% 的质粒 DNA，建议用第一次洗出的洗脱液进行二次重复洗脱。

*如果需要较大质粒 DNA 浓度，可以适当减少洗脱液的体积，2 次重复洗脱。

五、（可选）质粒 DNA 浓缩

- 1 ml 质粒 DNA 加入 0.1 ml（0.1 倍样本体积）3 M 醋酸钠（pH 5.2）和 0.7 ml（0.7 倍样本体积）异丙醇，上下颠倒混匀。
- 15000×g 离心 20 min，小心弃除上清保留沉淀。
- 用 1 ml 70% 乙醇洗涤质粒 DNA 沉淀，15000×g 离心 10 min，小心弃除上清。
- 空气干燥质粒 DNA 5-10 min，加入 100-500 μl Eluent A 或者去离子水溶解质粒 DNA。

六、流程图

