

UE 无内毒素质粒中量试剂盒

本试剂盒采用 SDS 碱裂解法，结合 DNA 制备膜选择性吸附 DNA。同时采用特殊溶液（Buffer ETR 和 Buffer PF）有效去除内毒素，可从 30-50 ml（OD600 为 1-1.5）细菌培养物中提取出多至 200 µg 高纯度质粒 DNA，其内毒素水平控制在 0.1 EU/µg。

一、试剂盒组成、贮存、稳定性

Cat.No.	UE-MD-EP-10	UE-MD-EP-25
Kit size	10 preps	25 preps
Midiprep column	10	25
1.5 ml Microfuge tube	30	75
Plastic wrench	1	1
RNase A	120 µl	270 µl
Buffer S1	55 ml	125 ml
Buffer S2	55 ml	125 ml
Buffer S3K	55 ml	125 ml
Buffer B	55 ml	125 ml
Buffer W1	80 ml	200 ml
Buffer W2 concentrate	36 ml	72 ml
ET-free water (70%Ethanol)	3.6 ml	9 ml
Eluent A	8 ml	20 ml
Buffer ETR	4 ml	10 ml
Buffer PF	1 ml	3 ml
Protocol manual	1	1

RNase A: 50 mg/ml，室温可贮存 6 个月，长期贮存于 -20 °C。

Buffer S1: 细菌悬浮液。加入 RNase A 后，混合均匀，4°C 贮存。

Buffer S2: 细菌裂解液（含 SDS/NaOH），室温密闭贮存。

Buffer S3K: 中和液，室温密闭贮存。

Buffer B: DNA 结合溶液，室温密闭贮存。

Buffer W1: 洗涤液，室温密闭贮存。

Buffer W2 concentrate: 去盐液。使用前，按试剂瓶上指定的体积加入无水乙醇（可用 100%乙醇或 95%乙醇）。

混合均匀，室温密闭贮存。

ET-free water (70%Ethanol): 使用前，按试剂瓶上指定的体积加入无水乙醇（可用 100%乙醇或 95%乙醇）。

混合均匀，室温密闭贮存。

Eluent A: 洗脱液。室温密闭贮存。

Buffer ETR: 内毒素去除液。室温密闭贮存。

Buffer PF: 分相缓冲液。室温密闭贮存。

二、注意事项

- 细菌过量将影响细菌裂解、质粒 DNA 的释放，导致内毒素含量过高。
- 步骤 3 和步骤 4 的操作必须温和。剧烈摇晃将导致基因组 DNA 的污染。但混合必须充分，否则影响得率。
- 在加入 Buffer S3K 时，蛋白质和基因组 DNA 形成粘稠的白色絮状沉淀，必须充分混合均匀，使凝集块中间也得到充分中和凝结。
- Buffer S2、Buffer S3K、Buffer B 和 Buffer W1 含刺激性化合物，操作时要戴乳胶手套和防护眼镜，避免沾染皮肤、眼睛和衣物，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

- 第一次使用前，RNase A 全部加入 Buffer S1 中，4°C 贮存。
- 第一次使用前，Buffer W2 concentrate 中加入指定体积的无水乙醇。
- 第一次使用前，ET-free water (70%Ethanol) 中加入指定体积的无水乙醇。使用前置于 -20°C 预冷。
- 使用前，检查 Buffer S2 是否出现沉淀，如出现沉淀，应于 37°C 温浴加热溶解并冷却至室温后使用。

- Eluent A 在 65°C 预热后使用，有利于提高质粒得率。
- Buffer S3K、Buffer B 和 Buffer ETR 使用前置于 4°C 预冷。
- 准备无核酸和核酸酶污染的 Tip 头、离心管。
- 准备 56 °C 水浴。

四、操作步骤

- 取 30-50 ml 在 LB 培养基中培养过夜的菌液（若使用丰富培养基，菌液体积应减半或更少），3,000×g 离心 8 min，弃上清。将离心管倒置于纸巾上 1 min，除尽上清。
**一般过夜培养的菌液 OD₆₀₀ 在 2.0-4.0 之间。若菌液 OD₆₀₀>4，菌量需减少。*
- 加 4.5 ml Buffer S1，悬浮细菌沉淀，悬浮需均匀，不应留有小的菌块。
**确认 Buffer S1 中已加入 RNase A。*
- 加 4.5 ml Buffer S2，温和并充分地上下翻转混合均匀，使菌体充分裂解，直至形成透亮的溶液。此步骤不宜超过 5 min。
**Buffer S2 使用后应立即盖紧瓶盖，以免空气中的 CO₂ 中和 Buffer S2 中的 NaOH，降低溶菌效率。*
**避免剧烈摇晃，否则将导致基因组 DNA 污染。*
- 加 4.5 ml 4°C 预冷的 Buffer S3K，温和并充分地上下翻转混合，直至溶液颜色均一并形成紧实的凝集块，室温放置 5 min ≥ 6,000×g 离心（4°C）10 min。
**加入 Buffer S3K 后应立即混合，以避免形成局部的凝集块。*
**避免剧烈摇晃，否则将导致基因组 DNA 污染。*
**离心完成后，上清液尽量澄清，如果浑浊，负压过柱容易堵柱，可以将上清液再次离心。*
- 取步骤 4 中的上清转入新的 50 ml 离心管（自备）中，向上清中加 4.5 ml 4°C 预冷的 Buffer B，温和并充分地上下翻转混合 10 次，

步骤 6-9 为负压法

- 正确连接负压装置，将中量制备管插到负压装置的插口上。
- 吸取步骤 5 中的上清液，转移到中量制备管中，开启并调节负压至 -25 ~ -30 英寸汞柱，缓慢吸走管中溶液。
**上清液过柱液体流速与菌液量有关，如果流速过慢，可能菌液量过多。*
- 保持负压，加 7 ml Buffer W1，吸尽管中溶液。
- 加 8 ml Buffer W2，吸尽管中溶液。
**确认在 Buffer W2 concentrate 中已按试剂瓶上的指定体积加入无水乙醇。*
- 用塑料扳手顺时针取下中量制备管下部含质粒的制备管管头，置于洁净的 1.5 ml 离心管（试剂盒内提供）中，加 0.3 ml Buffer W2，12,000×g 离心 2 min。
- 将制备管管头置于另一洁净 1.5 ml 离心管（试剂盒内提供）中，在制备管膜中央加 350 µl Eluent A，室温静置 1 min。12,000×g 离心 1 min 收集质粒 DNA。
**将 Eluent A 加热至 65°C 将提高洗脱效率。*
- 弃制备管。在滤液中加入 350 µl 预冷的 Buffer ETR，混合均匀。
**如果 Buffer ETR 浑浊，于冰上静置，直至溶液变得清亮；如果出现分层或去内毒后质粒断裂，将 ETR 试剂瓶 65°C 加热 2h，4°C 预冷后使用。*
- 加入 88 µl Buffer PF，混合均匀。
**溶液可能会出现轻微的浑浊现象，此为正常现象。*
- 置于 56°C 孵育 2-5 min。室温 12,000×g 离心 2 min。
**孵育后溶液应出现大量乳白色沉淀，否则延长孵育时间。*
**孵育后溶液有可能出现分层现象，此为正常现象。*

15. 取无色上相至 1.5 ml 离心管（试剂盒内提供）中，加入 0.8 倍体积异丙醇（如：取得 650 μ l 无色上相，则加入 520 μ l 异丙醇），混合均匀。室温静置 10 min。12,000 $\times$ g 离心 10 min。
16. 尽可能弃尽上清。加入 1 ml 预冷的 ET-free water（70%Ethanol），洗涤沉淀，12,000 $\times$ g 离心 5 min。
*ET-free water（70%Ethanol）使用前确定已加入指定体积的无水乙醇。
17. 尽可能弃尽上清。在超净台中干燥 5-10 min。
*管壁上残留液体可短暂离心后吸弃。
18. 加入 150-300 μ l Eluent A 或无内毒素水溶解质粒 DNA。
*溶解质粒 DNA 时需用吸头上下吹打直至沉淀完全溶解。

五、流程图

