

## UE 无内毒素质粒小量试剂盒（快速法）

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) 有效去除内毒素，可 30 min 内从 1-4 ml 细菌培养物中提取出多至 20 µg 高纯度质粒 DNA，其内毒素水平控制在 0.1 EU/µg 以下。

### 一、试剂盒组成、贮存、稳定性

| Cat.No.                      | UE-MN-FEP-50 | UE-MN-FEP-150 |
|------------------------------|--------------|---------------|
| Kit size                     | 50 preps     | 150 preps     |
| Miniprep column-T            | 100          | 300           |
| Uncapped 2 ml Microfuge tube | 100          | 300           |
| 1.5 ml Microfuge tube        | 100          | 300           |
| RNase A                      | 30 µl        | 90 µl         |
| Buffer S1                    | 15 ml        | 45 ml         |
| Buffer S2                    | 15 ml        | 45 ml         |
| Buffer S3                    | 21 ml        | 63 ml         |
| Buffer W1                    | 30 ml        | 96 ml         |
| Buffer W2 concentrate        | 48 ml        | 72 ml*2       |
| Buffer B                     | 55 ml        | 160 ml        |
| Eluent A                     | 12 ml        | 36 ml         |
| Buffer ETR                   | 9 ml         | 27 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 S3: 中和液, 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。

Buffer B: DNA 结合溶液, 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。

### 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。
- 使用前, 检查 Buffer S2 是否出现沉淀, 如出现沉淀, 应于 37°C 水浴加热溶解并冷却至室温后使用。
- Buffer S2、Buffer S3 和 Buffer W1 和 Buffer B 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。
- Eluent A 在 65°C 预热后使用, 能提高质粒得率。
- Buffer ETR 使用前放到 4°C 预冷。
- 准备无核酸和核酸酶污染的 Tip 头、离心管。
- 准备 42°C 水浴。

### 四、操作步骤

实验前, 请务必认真阅读本试剂盒操作步骤。

- (可选) 制备管平衡步骤: 向置于 2 ml 离心管中的制备管 (Miniprep column, ) 里添加 500 µl 3M NaOH 溶液, 12,000 rpm 离心 1 min, 弃除滤液。(请使用当天处理过的制备管)  
\* 3M NaOH 溶液配制方法: 称取 120g NaOH, 溶于 1L 去离子水。  
\* 制备管的核酸结合能力会随贮存时间延长及保存温度高于 25°C 而逐渐降低, 为确保最佳实验性能, 如果制备管超过一个月以上, 必须进行制备管平衡处理, 保证质粒得率。
- 取 1-4 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), 12,000 rpm 离心 1 min, 弃尽上清。  
★一般过夜培养的菌液 OD<sub>600</sub> 在 2.0-4.0 之间。若菌液 OD<sub>600</sub>>4, 菌量需减少。
- 加 250 µl 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。
- 加入 250 µl Buffer S2, 温和并充分地上下翻转 4-6 次, 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 CO<sub>2</sub> 中和 Buffer S2 中的 NaOH, 降低裂解效率。  
\* 避免剧烈摇晃, 否则将导致基因组 DNA 污染。  
\* 此步骤不宜超过 5 min。
- 加 350 µl Buffer S3, 温和并充分地上下翻转混合 6-8 次, 12,000 rpm 离心 10 min。  
\* 避免剧烈摇晃, 否则将导致基因组 DNA 污染。

步骤 6~9 可以选择离心法或负压法纯化质粒 DNA。

#### A. 离心法

- 6A. 吸取步骤 4 中的离心上清并转移至 Miniprep column-T [其置于 Uncapped 2 ml Microfuge tube (试剂盒内提供) 中], 12,000 rpm 离心 1 min, 弃滤液。
- 7A. 将 Miniprep column-T 置回 Uncapped 2 ml Microfuge tube 中, 加 500 µl Buffer W1, 12,000 rpm 离心 1 min, 弃滤液。
- 8A. 将 Miniprep column-T 置回 Uncapped 2 ml Microfuge tube 中, 加 700 µl Buffer W2, 12,000 rpm 离心 1 min, 弃滤液; 以同样的方法再用 700 µl Buffer W2 洗涤一次。弃滤液。  
\* 确认在 Buffer W2 concentrate 中已按试剂瓶上的指定体积加入无水乙醇。  
\* 两次使用 Buffer W2 冲洗能确保盐份被完全清除, 消除对酶切反应的影响。
- 9A. 将 Miniprep column-T 置回 Uncapped 2 ml Microfuge tube 中, 12,000 rpm 离心 1 min。

#### B. 负压法

- 6B. 将 Miniprep column-T 插到负压装置的接口上。吸取步骤 4 中的离心上清并转移到 Miniprep column-T 中, 开启并调节负压至 -25 ~ -30 英寸汞柱, 缓慢吸走管中溶液。
- 7B. 加 500 µl Buffer W1, 吸尽管中溶液。
- 8B. 加 700 µl Buffer W2, 吸尽管中溶液; 以同样的方法再用 700 µl Buffer W2 洗涤一次。  
\* 确认在 Buffer W2 concentrate 中已按试剂瓶上的指定体积加入无水乙醇。  
\* 两次使用 Buffer W2 冲洗能确保盐份被完全清除, 消除对酶切反应的影响。
- 9B. 将 Miniprep column-T 置于 Uncapped 2 ml Microfuge tube (试剂盒内提供) 中, 12,000 rpm 离心 1 min。
10. 将 Miniprep column-T 移入新的 1.5 ml 离心管 (试剂盒内提供) 中, 在 Miniprep column-T 膜中央加 150 µl Eluent A, 室温静置 1 min。12,000 rpm 离心 1 min。
11. 弃 Miniprep column-T。在滤液中加入 150 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。

12. 置于 42°C 孵育 2 min。室温 12,000 rpm 离心 2 min。

\*孵育后溶液将变浑浊，否则延长孵育时间直至溶液变浑浊。

\*孵育后溶液有可能出现分层现象，此为正常现象。

13. 取无色上相至 1.5 ml 离心管（试剂盒内提供）中，加入 2 倍体积 Buffer B（如：取得 300 µl 无色上相，则加入 600 µl Buffer B），混合均匀。

14. 将步骤 12 中的混合液转移至 Miniprep column-T 置于 Uncapped 2 ml Microfuge tube（试剂盒内提供）中，12,000 rpm 离心 1 min，弃滤液。

\*若混合液过多，则可分两次过柱。

15. 将 Miniprep column-T 置回离心管，加 700 µl Buffer W2，12,000 rpm 离心 1 min，弃滤液。以同样的方法再用 700 µl Buffer W2 洗涤一次。弃滤液。

\*确认在 Buffer W2 concentrate 中已按试剂瓶上的指定体积加入无水乙醇。

\*两次使用 Buffer W2 冲洗能确保盐份被完全清除，消除对酶切反应的影响。

16. 将 Miniprep column-T 置回离心管中，12,000 rpm 离心 1 min。

\*管壁上残留液体可短暂离心后吸弃。

17. 将 Miniprep column-T 移入新的 1.5 ml 离心管（试剂盒内提供）中，在 Miniprep column-T 膜中央加 60-80 µl Eluent A 或无内毒素水，室温静置 2 min。12,000 rpm 离心 2 min 洗脱 DNA。

## 五、流程图

加 250 µl Buffer S1  
加 250 µl Buffer S2  
加 350 µl Buffer S3

加 500 µl Buffer W1  
加 700 µl Buffer W2  
加 700 µl Buffer W2

加 150 µl Eluent A

加 150 µl Buffer ETR  
42°C 孵育 2 min

12,000 rpm 离心 2 min

加 700 µl Buffer W2  
加 700 µl Buffer W2

加 60-80 µl Eluent A 或无内毒素水



裂解  
中和

结合  
洗涤

洗脱

内毒素去除

分相

洗涤

洗脱