

UE 质粒小量制备试剂盒（离心法）

本试剂盒采用改进的 SDS 碱裂解法，吸附柱选择性地吸附 DNA 的方法达到快速纯化质粒 DNA 的目的。适合于从 1-10 ml ($OD_{600}=1-1.5$) 细菌培养物中提取多至 45 μ g 高纯的质粒 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、贮存、稳定性

Cat.No.	UE-MN-P-S-10	UE-MN-P-S-50	UE-MN-P-S-250	UE-MN-P-S-500
Kit size	10 preps	50 preps	250 preps	500 preps
Miniprep column A3	10	50	250	500
2 ml Collection tube	10	50	250	500
RNase A	6 μ l	30 μ l	150 μ l	300 μ l
Buffer S1	3 ml	15 ml	75 ml	150 ml
Buffer S2	3 ml	15 ml	75 ml	150 ml
Buffer S3	5 ml	21 ml	105 ml	210 ml
Buffer W1	6 ml	28 ml	145 ml	280 ml
Buffer W2 concentrate	5 ml	24 ml	2 $\times$ 72 ml	2 $\times$ 120 ml
Eluent	1 ml	5 ml	25 ml	50 ml
Protocol manual	1	1	1	1

RNase A: 50 mg/ml, 室温可贮存 6 个月, 长期贮存于 -20℃, 使用前瞬时离心至管底。

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

Eluent: 洗脱液, 室温密闭贮存。

二、注意事项

- 加入 Buffer S2 和 Buffer S3 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。但混合必须充分, 否则影响得率。
- 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, 降低裂解效率; 裂解时间不宜超过 5 min。
- Buffer S2、Buffer S3 和 Buffer W1 含刺激性化合物, 操作时要戴乳胶手套和眼镜, 避免沾染皮肤、眼睛和衣服, 谨防吸入口鼻。若沾染皮肤或眼睛时, 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℃贮存。
*对于体积较少的 RNase A, 瞬时离心至管底, 吸取一定体积 Buffer S1 至 RNase A 管中混匀再加入 Buffer S1 中。
- 准备无核酸和核酸酶污染的 Tip 头、离心管。
- 第一次使用前, Buffer W2 concentrate 中加入指定体积的无水乙醇混匀备用, 做好标记。

四、操作步骤

菌液体积 ($OD_{600}=1-1.5$)	Buffer S1	Buffer S2	Buffer S3
1-4 ml	250 μ l	250 μ l	350 μ l
4-10 ml	500 μ l	500 μ l	700 μ l

- 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。
- 加 250 μ l Buffer S1 悬浮细菌沉淀, 悬浮需均匀, 不应留有小的菌块。
- 加 250 μ l Buffer S2, 温和并充分地上下翻转 6-8 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。

- 加 350 μ l Buffer S3, 温和并充分地上下翻转混合 6-8 次, 充分混匀, 出现白色絮状沉淀。12,000 rpm 离心 10 min。

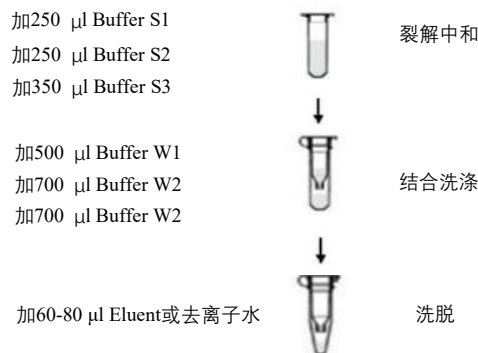
*离心完成后, 应出现白色絮状沉淀, 如果出现白色沉淀凝块漂浮, 表明菌体量过多, 减少菌体量或者适当按比例增加各 Buffer 体积。

- 将步骤 4 中的上清液转移到吸附柱 A3 中 (吸附柱放入收集管中), 12,000 rpm 离心 1 min, 弃滤液。
- 将吸附柱 A3 放回收集管中, 加 500 μ l Buffer W1, 12,000 rpm 离心 1 min, 弃滤液。
- 将吸附柱 A3 放回收集管中, 加 700 μ l Buffer W2, 12,000 rpm 离心 1 min, 弃滤液; 以同样的方法再用 700 μ l Buffer W2 洗涤一次, 弃滤液。
- 将吸附柱 A3 放回收集管中, 12,000 rpm 离心 1 min。
- 将吸附柱移入干净离心管中, 在吸附柱膜中央加 60-80 μ l Eluent 或去离子水, 室温静置 2 min。12,000 rpm 离心 2 min。

*将 Eluent 或去离子水加热至 65℃将提高洗脱效率。

*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、流程图



参考步骤 (菌液体积在 4-10 ml) :

- 分多次离心将菌体收集到一个离心管中。
- 加 500 μ l Buffer S1 漩涡振荡使细菌完全分散, 不应留有小的菌块。
- 加 500 μ l Buffer S2, 温和并充分地上下翻转 10-12 次混合均匀使菌体充分裂解, 直至形成透亮的溶液。如有必要, 可把裂解液室温放置 2-3 min, 期间再颠倒混匀数次, 总裂解时间不应超过 5 min。
- 加 700 μ l Buffer S3, 温和并充分地上下翻转混合 10-12 次, 12,000 rpm 离心 10 min。
- 将步骤 4 中的上清液分 2 次转移至吸附柱 A3 中 (吸附柱放入收集管中), 12,000 rpm 离心 1 min, 弃滤液。
- 将吸附柱 A3 放回收集管中, 加 500 μ l Buffer W1, 12,000 rpm 离心 1 min, 弃滤液。
- 将吸附柱 A3 放回收集管中, 加 700 μ l Buffer W2, 12,000 rpm 离心 1 min, 弃滤液; 以同样的方法再用 700 μ l Buffer W2 洗涤一次, 弃滤液。
- 将吸附柱 A3 放回收集管中, 12,000 rpm 离心 1 min。
- 将吸附柱移入干净离心管中, 在吸附柱膜中央加 100-150 μ l Eluent 或去离子水, 室温静置 2 min。12,000 rpm 离心 2 min。

*将 Eluent 或去离子水加热至 65℃将提高洗脱效率。

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

六、常见问题分析

主要问题	原因	建议
------	----	----

得率低或纯化不到质粒	1.质粒丢失	在含有新鲜抗生素的平板上重新划甘油菌培养。若当前使用的是氨苄青霉素，可以考虑试用羧苄青霉素。如果有必要，可重新转化质粒或使用不同的宿主菌。	琼脂糖凝胶电泳出现多个条带	正常质粒电泳会出现多条带。清晰的主带是质粒的超螺旋结构。在超螺旋主带的上方通常有 1-3 条电泳更慢的条带，一般认为是开环质粒和质粒二聚体（或者不同的交联形式）。偶尔也会有在超螺旋条带前面出现微弱的称为“不可逆变性质粒”条带，这个是碱裂解的副产品。大多数酶对这种质粒不起作用，包括限制性酶和测序的酶。如果在 S2 环境中时间过长，会使得不可逆变性的质粒含量增加。	Buffer S2 裂解不要超过 5 min.
	2.细菌裂解不完全	将菌量减少为原先的一半（实际操作中可按实验情况相应调整）。			
	1) 菌量过多				
	2) Buffer S2 过期	Buffer S2 中的 NaOH 被空气中的 CO ₂ 中和。使用完要立即拧紧瓶盖。			
	3.细菌重悬不完全	在加入 Buffer S1 后注意观察细菌是否完全悬浮、是否有菌块残留。			
DNA 纯度低 高纯度的质粒 A _{260/280} 比值通常在 1.7-1.9 之间。低于 1.7 考虑蛋白质污染，高于 1.9 考虑 RNA 污染。	4.质粒过早的被洗脱	确保 Buffer W2 中已经加入正确体积的 95-100%无水乙醇。	基因 DNA 污染	1.培养时间过长，大量细菌死亡和产生大量菌体碎片 2.收集的细菌保存/处理时间过长 3.保存收集细菌的方法不对 4.菌量过多 5.加入 Buffer S2 后裂解不完全 6.加入 Buffer S3 后中和不完全	琼脂糖凝胶电泳背景底色亮 细菌碎片、基因组和 RNA 污染都显现高亮电泳背景
	5.洗脱效率低	洗脱液或者去离子水 65°C 预热以及增加洗脱时间至 5 min 都可提高洗脱效率。			
	1) 膜过干				
	1.A _{260/280} 比值过低	表现为琼脂糖凝胶电泳的背景底色亮和酶切效率低			
	1) 菌量过多				
蛋白质污染，高于 1.9 考虑 RNA 污染。	2) 加入 Buffer S1 后菌体未完全悬起		RNA 污染 少量 RNA 污染对于一般实验来说是没有影响的。	参见“A _{260/280} 比值过高”	琼脂糖凝胶电泳背景底色亮 细菌碎片、基因组和 RNA 污染都显现高亮电泳背景
	3) 加入 Buffer S2 后裂解不完全				
	4) 加入 Buffer S3 后中和不完全				
	2.A _{260/280} 比值过高	表现为电泳时会出现 RNA 条带			
	1) Buffer S1 中未加入 RNase A				
琼脂糖凝胶中质粒条带模糊 通常质粒条带模糊是由于降解影响，而此降解可能是宿主菌自身引起的，也可能是纯化过程中造成	2) Buffer S1 保存不当，或者已经过期，RNase A 活性下降		DNA 酶切效果不好 酶切效果不好可能是有抑制剂的污染（比如盐和乙醇）或者质粒修饰。偶尔，质粒在传代几次后会产生缺失。在排除其他原因的情况下，要通过测序才能确定。	1.盐污染 2.乙醇污染 3.Buffer S2 作用时间过长 4.核酸酶污染引起的质粒降解 5.质粒序列缺失	确保用 Buffer W2 洗涤 2 次。 在最后一次 Buffer W2 洗涤后可将吸附柱离心时间由原来 1 min 增加至 2 min。
	3) 菌量过多				
	4) 加入 Buffer S1 后菌体没有完全悬起				
	5) 加入 Buffer S2 后裂解不完全				
	1.使用 endA+宿主菌	endA+是宿主菌中含有 endA 基因型，表达 Endonuclease I 内源核酸酶			
琼脂糖凝胶中质粒条带模糊 通常质粒条带模糊是由于降解影响，而此降解可能是宿主菌自身引起的，也可能是纯化过程中造成	部分 endA+宿主菌列表见下	尽量使用 endA-宿主菌。确保 Buffer W1 洗涤 1 次。	琼脂糖凝胶电泳背景底色亮 细菌碎片、基因组和 RNA 污染都显现高亮电泳背景	参见“A _{260/280} 比值过高”	琼脂糖凝胶电泳背景底色亮 细菌碎片、基因组和 RNA 污染都显现高亮电泳背景
	BL21(DE3)	MC1061			
	BMH71-18	NM522 (NM 系列宿主菌都是 EndA+)			
	CJ236	P2392			
	ES1301	PR700 (PR 系列宿主菌都是 EndA+)			
琼脂糖凝胶中质粒条带模糊 通常质粒条带模糊是由于降解影响，而此降解可能是宿主菌自身引起的，也可能是纯化过程中造成	HB101	Q358	DNA 酶切效果不好 酶切效果不好可能是有抑制剂的污染（比如盐和乙醇）或者质粒修饰。偶尔，质粒在传代几次后会产生缺失。在排除其他原因的情况下，要通过测序才能确定。	1.盐污染 2.乙醇污染 3.Buffer S2 作用时间过长 4.核酸酶污染引起的质粒降解 5.质粒序列缺失	确保用 Buffer W2 洗涤 2 次。 在最后一次 Buffer W2 洗涤后可将吸附柱离心时间由原来 1 min 增加至 2 min。
	JM83	RR1			
	JM101	TB1			
	JM110	TG1			
	LE392	Y1088 (Y10 系列宿主菌都是 EndA+)			
琼脂糖凝胶中质粒条带模糊 通常质粒条带模糊是由于降解影响，而此降解可能是宿主菌自身引起的，也可能是纯化过程中造成	2.菌培养时间过长	不要超过 16 小时	DNA 酶切效果不好 酶切效果不好可能是有抑制剂的污染（比如盐和乙醇）或者质粒修饰。偶尔，质粒在传代几次后会产生缺失。在排除其他原因的情况下，要通过测序才能确定。	1.盐污染 2.乙醇污染 3.Buffer S2 作用时间过长 4.核酸酶污染引起的质粒降解 5.质粒序列缺失	确保用 Buffer W2 洗涤 2 次。 在最后一次 Buffer W2 洗涤后可将吸附柱离心时间由原来 1 min 增加至 2 min。
	3.存放/处理收集菌时间过长	存放 3 个月以内			
	4.存放收集菌的方式不对	请于-20°C以下存放			
	5.加入 Buffer S2 后裂解不完全				
	6.加入 Buffer S3 后中和不完全				