

UE 质粒小量制备试剂盒（快速法）

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 4ml (OD₆₀₀=3.0) 或者 8ml (OD₆₀₀=1.5) 以内细菌培养物中提取多至 40 µg 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-FP-10	UE-MN-FP-50	UE-MN-FP-250	UE-MN-FP-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	12 µl	60 µl	300 µl	600 µl
Buffer S1A	3 ml	15 ml	75 ml	150 ml
Buffer S2A	3 ml	15 ml	75 ml	150 ml
Buffer S3K	5 ml	21 ml	105 ml	210 ml
Buffer W2B concentrate	4 ml	16 ml	2×48 ml	2×80 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℃。

Buffer S1A: 细菌悬浮液, 加入 RNase A 后, 混合均匀, 4℃贮存。

Buffer S2A: 细菌裂解液 (含 SDS/NaOH), 室温密封贮存。

Buffer S3K: 中和液, 室温密封贮存。

Buffer W2B 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, 室温密封贮存。

Eluent: 洗脱液, 室温密封贮存。

二、注意事项

- 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。但混合必须充分, 否则影响得率。
- Buffer S2A 使用后应立即盖紧瓶盖, 以免空气中的 CO₂ 中和 Buffer S2A 中的 NaOH, 降低裂解效率; 裂解时间不宜超过 5 min。
- Buffer S2A、Buffer S3K 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 S1A 中, 4℃贮存。
*对于小体积的 RNase A, 瞬时离心至管底, 吸取一定体积 Buffer S1A 至 RNase A 管中混匀再加入 Buffer S1A 中。
- Buffer S2A 中含有 SDS, 低温容易析出, 使用前若有沉淀, 请置于 37℃水浴中加热溶解至溶液变澄清方可使用。
- 准备无核酸和核酸酶污染的 Tip 头、离心管。
- 第一次使用前, Buffer W2B concentrate 中加入指定体积的无水乙醇混匀备用, 做好标记。

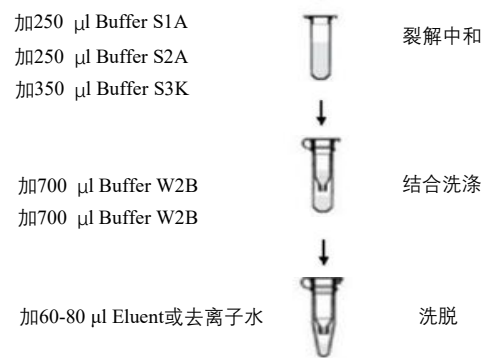
四、操作步骤

高拷贝质粒最大使用菌液量及推荐 Buffer 量			
OD ₆₀₀ =3.0	Buffer S1A	Buffer S2A	Buffer S3K
4 ml	250 µl	250 µl	350 µl
8 ml	500 µl	500 µl	700 µl

- 取 1-4 ml 在 LB 培养基中培养过夜的菌液, 12,000 rpm 离心 1 min, 弃尽上清。
- 加 250 µl Buffer S1A 悬浮细菌沉淀, 悬浮需均匀, 不应留有小的菌块, 混匀后的溶液为浑浊的红色。

- 加 250 µl 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, 直至形成透亮的紫红色溶液。此步骤不宜超过 5 min。
- 加 350 µl Buffer S3K, 温和并充分地上下翻转混合 12-20 次, 充分混匀, 出现白色絮状沉淀, 直至溶液全部变成黄色。12,000 rpm 离心 3 min。
*中和完成后, 絮状沉淀中混有紫红色说明复性不充分, 应继续混匀直至絮状沉淀全部为白色, 溶液全部变为澄清的黄色。
- 将步骤 4 中的上清液倒入或者移液器吸取转移到吸附柱 A3 中 (吸附柱置于收集管中), 12,000 rpm 离心 1 min, 弃滤液。
*上清液体积 > 800 µl, 可以分多次过柱。
- 将吸附柱 A3 放回收集管中, 加 700 µl Buffer W2B, 12,000 rpm 离心 30 s, 弃滤液; 以同样的方法再用 700 µl Buffer W2B 洗涤一次, 弃滤液。
- 将吸附柱 A3 置回收集管中, 12,000 rpm 离心空转 1 min。
- 将吸附柱置回干净离心管中, 在吸附柱膜中央加 60-80 µl Eluent 或去离子水, 室温静置 1 min。12,000 rpm 离心 1 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



六、裂解中和参考图例:



①Buffer S1A 250µl 重悬



②Buffer S2A 250µl 裂解



③Buffer S3K 350µl 中和



④12000rpm/3min 离心