

## 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

1. 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。
2. 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。
3. 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

1. 第一次使用前, RNase A 全部加入 Buffer S1 中, 4°C 贮存。
2. 第一次使用前, Buffer W2 concentrate 中加入指定体积的无水乙醇。
3. 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。
4. Eluent A 在 65°C 预热后使用, 能提高质粒得率。
5. Buffer ETR 使用前放到 4°C 预冷。
6. 准备无核酸和核酸酶污染的 Tip 头、离心管。
7. 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。

1. 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×g 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。

2. 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 RNaseA。
3. 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。
4. 加 350 µl Buffer S3, 温和并充分地上下翻转混合 6-8 次, 12,000 ×g 离心 10 min。  
\*避免剧烈摇晃, 否则将导致基因组 DNA 污染。

步骤 5~8 可以选择负压法或离心法纯化质粒 DNA。

#### A. 负压法

- 5A. 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。
- 6A. 加 500 µl Buffer W1, 吸尽管中溶液。
- 7A. 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。
- 8A. 将 Miniprep column-T 置于 Uncapped 2 ml Microfuge tube (试剂盒内提供) 中, 12,000×g 离心 1 min。

#### B. 离心法

- 5B. 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×g 离心 1 min, 弃滤液。
- 6B. 将 Miniprep column-T 置回 Uncapped 2 ml Microfuge tube 中, 加 500 µl Buffer W1, 12,000 ×g 离心 1 min, 弃滤液。
- 7B. 将 Miniprep column-T 置回 Uncapped 2 ml Microfuge tube 中, 加 700 µl Buffer W2, 12,000×g 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。
- 8B. 将 Miniprep column-T 置回 Uncapped 2 ml Microfuge tube 中, 12,000×g 离心 1 min。
9. 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×g 离心 1 min。
10. 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。
11. 置于 42°C 孵育 2 min。室温 12,000×g 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。
12. 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。

13. 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×g 离心 1 min, 弃滤液。

\*若混合液过多, 则可分两次过柱。

14. 将 Miniprep column-T 置回离心管, 加 700 μl Buffer W2, 12,000 ×g 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。

15. 将 Miniprep column-T 置回离心管中, 12,000×g 离心 1 min。

\*管壁上残留液体可短暂离心后吸弃。

16. 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 1 min。12,000×g 离心 1 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×g 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

分相

洗涤

洗脱