

UE 无内毒素质粒大量试剂盒 V2

本试剂盒采用 SDS 碱裂解法，结合 DNA 制备膜选择性吸附 DNA。同时采用内毒素去除柱有效去除内毒素，可从 80~200 ml 细菌培养物中提取出多至 500 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-MX-EP-V2-5	UE-MX-EP-V2-25
Kit size	5 preps	25 preps
Maxiprep column	5	25
Endotoxin-Removal column	5	25
RNase A	135µl	700µl
Buffer S1	70ml	285ml
Buffer S2	70ml	285ml
Buffer S3K	70ml	285ml
Buffer B	70ml	285ml
Buffer W1	80ml	350ml
Buffer W2 concentrate	33ml	150ml
Eluent A	15ml	70ml
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 RNaseA 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 (可用无水乙醇或 95% 乙醇)。混合均匀，室温密闭贮存。

Eluent A: 洗脱液。室温密闭贮存。

二、注意事项

- 细菌过量将影响细菌裂解和质粒 DNA 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集。
- 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。若沾染到皮肤或眼睛，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。
- 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 和 Buffer B 使用前置于 4°C 预冷。
- 准备无核酸和核酸酶污染的 Tip 头、50ml 离心管。
- 水平离心机 (转速可达到 4,000×g) 及冷冻离心机 (转速可达到 8,000×g)。

- 准备 56°C 水浴。

四、操作步骤

- 取 80~200ml 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 8min，弃尽上清。
*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 10 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 10 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 5min。
*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。
*此步骤不宜超过 5min。
- 加 10 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 5min，8,000×g 离心 (4°C) 10min。
*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。
- 将步骤 4 中的上清转入内毒素去除柱中，然后过滤到新的 50ml 离心管 (自备) 中，向过滤后的上清中加入 10 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 可以选择离心法或负压法。

A. 离心法:

- 先将大量制备管放入 50 ml 离心管中。吸取步骤 5 中的混合液，转移到大量制备管中。
- ≥6,000×g 离心 5min。
- 弃滤液，加 12ml Buffer W1 至制备管中，≥6,000×g 离心 5min。
- 弃滤液，加 14ml Buffer W2 至制备管中，≥6,000×g 离心 5min。
*确认在 Buffer W2 concentrate 中已按试剂瓶上的指定体积加入无水乙醇。

B. 负压法:

- 正确连接负压装置，将大量制备管插到负压装置的插口上。
- 吸取步骤 5 中的混合液，转移到转移到大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。
- 保持负压，加 12ml Buffer W1，吸尽管中溶液。
- 保持负压，加 14ml 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。
- 将大量制备管中放入 50ml 离心管中，加 4ml Buffer W2，≥6,000×g 离心 5min。
- 将制备管置于另一洁净 50ml 离心管中，在制备管膜中央加 2ml Eluent A，室温静置 5min，≥6,000×g 离心 5min 收集质粒 DNA。
*将 Eluent A 加热至 65°C 将提高洗脱效率。

五、流程图

