

UE 无内毒素质粒小量试剂盒

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 和 Buffer PF) 有效去除内毒素，可从 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-EP-50	UE-MN-EP-150
Kit size	50 preps	150 preps
Miniprep column	50	150
2 ml Microfuge tube	50	150
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	90 ml
Buffer W2 concentrate	24 ml	72 ml
ET-free water (70%Ethanol)	18 ml	54 ml
Eluent A	12 ml	36 ml
Buffer ETR	9 ml	27 ml
Buffer PF	2.5 ml	7.5 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。

ET-free water (70% Ethanol): 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 A: 洗脱液。室温密闭贮存。

Buffer ETR: 内毒素去除液。室温密闭贮存。

Buffer PF: 分相缓冲液。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。
- 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。
- 第一次使用前, ET-free water (70%Ethanol) 中加入指定体积的无水乙醇。使用前置于 -20°C 预冷。
- 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 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。
- 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 CO₂ 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到制备管 (置于 2 ml 离心管 (试剂盒内提供) 中) 12,000 rpm 离心 1 min, 弃滤液。
- 7A. 将制备管置回离心管, 加 500 µl Buffer W1, 12,000 rpm 离心 1 min, 弃滤液。
- 8A. 将制备管置回离心管, 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。
- 9A. 将制备管置回 2 ml 离心管中, 12,000 rpm 离心 1 min。

B. 负压法

- 6B. 将质粒 DNA 制备管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。
- 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. 将制备管置于 2 ml 离心管 (试剂盒内提供) 中, 12,000 rpm 离心 1 min。
10. 将制备管移入新的 1.5 ml 离心管 (试剂盒内提供) 中, 在制备管膜中央加 150 µl Eluent A, 室温静置 2 min, 12,000 rpm 离心 2 min。
11. 弃制备管。在滤液中加入 150 µl 预冷的 Buffer ETR, 剧烈混合 1 min。
 - * 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素后质粒断裂, 将 ETR 试剂瓶 65°C 加热 2h, 4°C 预冷后使用。
12. 加入 38 µl Buffer PF, 混合均匀。
13. 置于 42°C 孵育 2 min, 12,000 rpm 离心 2 min。

*孵育后溶液为浑浊。

14. 取无色上相至 1.5 ml 离心管（试剂盒内提供）中，加入 0.8 倍体积异丙醇（如：取得 350 μ l 无色上相，则加入 280 μ l 异丙醇），混合均匀。室温静置 10 min。12,000 rpm 离心 10 min。

*质粒含量较少时，会影响对沉淀的观察，此时需要在离心管上标记离心方向，以便观察和后续处理。

15. 尽可能弃尽上清。加入 1 ml 预冷的 ET-free water（70% Ethanol），12,000 rpm 离心 5 min。

*ET-free water（70%Ethanol）使用前确定已加入指定体积的无水乙醇。

16. 尽可能弃尽上清。在超净台中干燥 5-10 min。

*管壁上残留液体可短暂离心后吸弃。

17. 加入 60 μ l Eluent A 溶解质粒 DNA。

五、流程图

加 250 μ l uffer S1
加 250 μ l uffer S2
加 350 μ l uffer S3

裂解
中和

加 500 μ l Buffer W1
加 700 μ l Buffer W2
加 700 μ l Buffer W2

结合
洗涤

加 150 μ l Eluent A

洗脱

加 150 μ l Buffer ETR
加 38 μ l Buffer PF
42 $^{\circ}$ C 孵育 2 min

内毒素去除

12,000 rpm 离心 2 min

分相

加 0.8 体积异丙醇至上相
加 1 ml 预冷的 ET-free water（70% Ethanol）

沉淀质粒

加 60 μ l Eluent A

溶解质粒

