

UE 质粒小量制备试剂盒

本试剂盒采用改进的 SDS 碱裂解法，结合 DNA 制备膜选择性地吸附 DNA 的方法达到快速纯化质粒 DNA 的目的。适合于从 1-4 ml 细菌培养物中提取多至 20 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-P-10	UE-MN-P-50	UE-MN-P-250	UE-MN-P-500
Kit size	10 preps	50 preps	250 preps	500 preps
Miniprep column	10	50	250	500
2 ml Microfuge tube	10	50	250	500
1.5 ml Microfuge tube	10	50	250	---
Buffer A	6 ml	28 ml	145 ml	280 ml
RNase A	6 µl	30 µl	150 µl	300 µl
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	6 ml	24 ml	2×72 ml	2×120 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 A: 制备管平衡液，室温密闭贮存。

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

- 使用前，检查 Buffer S2 是否出现沉淀，如出现沉淀，应于 37℃温浴加热溶解并冷却至室温后使用。
- 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。
- 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。
- 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。

四、操作步骤

- 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 Buffer A, 12,000 rpm 离心 1 min, 弃除滤液。
(请使用当天处理过的制备管)
***使用前需对制备管进行平衡，激活膜以提高产量。制备管需在平衡后立即使用。**
- 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 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 的污染。**

***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 的污染。**

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 5 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 5 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。**

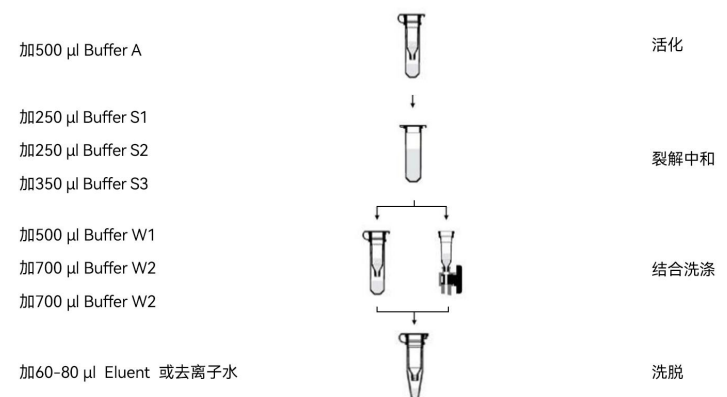
***两次使用 Buffer W2 冲洗能确保盐份被完全清除，消除对酶切反应的影响。**

- 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 离心管中，在制备管膜中央加 60-80 µl 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。**

五、流程图



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。
	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。
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。
	5.洗脱效率低	制备管在负压装置上抽干时间不宜过长。
1) 膜过干		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。
DNA 纯度低	1.A _{260/280} 比值过低	
高纯度的质粒	表现为琼脂糖凝胶电泳的背景底色亮和酶切效率低	
A _{260/280} 比值	1) 菌量过多	
通常在	2) 加入 Buffer S1 后菌体未完全悬起	
1.7-1.9 之间。	3) 加入 Buffer S2 后裂解不完全	
低于 1.7 考虑	4) 加入 Buffer S3 后中和不完全	
蛋白质污染，	2.A _{260/280} 比值过高	
高于 1.9 考虑	表现为电泳时会出现 RNA 条带	
RNA 污染。	1) Buffer S1 中未加入 RNase A	
	2) Buffer S1 保存不当，或者已经过期，RNase A 活性下降	
	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	
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	1.使用 endA+ 宿主菌	尽量使用 endA- 宿主菌。 确保 Buffer W1 洗涤 1 次。 不要超过 16 小时
	endA+ 是宿主菌中含有 endA 基因型，表达 Endonuclease I 内源核酸酶	
	部分 endA+ 宿主菌列表见下	
	BL21(DE3)	MC1061
	BMIH71-18	NM522 (NM 系列宿主菌都是 EndA+)
	CJ236	P2392
	ES1301	PR700 (PR 系列宿主菌都是 EndA+)
	HB101	Q358
	JM83	RR1
	JM101	TB1
2.菌培养时间过长	JM110	TG1
	LE392	Y1088 (Y10 系列宿主菌都是 EndA+)

	3.存放/处理收集菌时间过长 4.存放收集菌的方式不对 5.加入 Buffer S2 后裂解不完全 6.加入 Buffer S3 后中和不完全	存放 3 个月以内 请于 -20°C 以下存放
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.
琼脂糖凝胶电泳背景底色亮	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	
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.菌量过多 3.加入 Buffer S2 后震荡剧烈/裂解不完全/作用时间太长 4.加入 Buffer S3 后剧烈震荡/中和不完全	
RNA 污染	参见“A _{260/280} 比值过高”	
DNA 酶切效果不好	1.盐污染	确保用 Buffer W2 洗涤 2 次。
酶切效果不好	2.乙醇污染	在最后一次 Buffer W2 洗涤后可将制备管离心时间由原来 1 min 增加至 2 min。
可能是有抑制剂的污染（比如盐和乙醇）或者质粒修饰。	3.Buffer S2 作用时间过长	
偶尔，质粒在传代几次后会产生缺失。	4.核酸酶污染引起的质粒降解	
在排除其他原因的情况下，要通过测序才能确定。	5.质粒序列缺失	