

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 (OD₆₀₀ 为 1-1.5) 过夜培养的大肠杆菌中提取多至 30 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	5 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°C, 使用前瞬时离心至管底。

Buffer A: 制备管活化液, 室温密封贮存。

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), 室温密封贮存。

Buffer S3: 中和液, 室温密封贮存。

Buffer W1: 洗涤液, 室温密封贮存。

Buffer W2 concentrate: 去盐液。使用前, 按试剂盒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、实验准备及注意事项

- 第一次使用前, RNase A 全部加入 Buffer S1 中, 4°C 贮存。
*对于体积较少的 RNase A, 瞬时离心至管底, 吸取一定体积 Buffer S1 至 RNase A 管中混合均匀再加入 Buffer S1 中。
- 使用前确认 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。
- 第一次使用前, Buffer W2 concentrate 中加入指定体积的无水乙醇。
- 加入 Buffer S2 和 Buffer S3 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。
- 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, 谨防吸入口罩。

三、操作步骤

- 制备管活化: 向置于 2 ml 离心管中的制备管里添加 500 μl Buffer A, 12,000 rpm 离心 1 min, 弃除滤液。
*制备管活化处理过程能够改善制备管的均一性和稳定性, 减少批间差异, 消除高温/潮湿或者环境其它不良因素对制备管造成的影响。请使用当天处理过的制备管。
- 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, 降低裂解效率。
*避免剧烈摇晃, 否则将导致基因组 DNA 的污染。

- 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。

*离心完成后如果上清液浑浊, 考虑菌体过多或者杂菌污染。

*离心完成后, 应出现白色紧致沉淀, 如果出现白色沉淀凝胶状漂浮, 表明菌体量过多, 减少菌体量或者按比例适当增加各 Buffer 体积。

步骤 6-9 可以选择离心法或负压法

A. 离心法

- 将制备管置于 2 ml 离心管 (试剂盒内提供), 吸取步骤 5 中的离心上清并转移到制备管中, 12,000 rpm 离心 1 min, 弃滤液。

- (可选) 将制备管置回离心管, 加 500 μl Buffer W1, 12,000 rpm 离心 1 min, 弃滤液。

*宿主菌是 end A⁺ (BL21, HB101, JM 系列等) 会含有大量的核酸酶, 易降解质粒 DNA, 建议采用此步骤。

*宿主菌是 end A⁻ (DH5α, TOP10 等) 此步可省略。

- 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 中已按试剂盒上的指定体积加入无水乙醇。

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

- 将制备管置回 2 ml 离心管中, 12,000 rpm 离心 1 min。

B. 负压法

- 将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, 开启负压装置, 缓慢吸走管中溶液。

- (可选) 加 500 μl Buffer W1, 吸尽管中溶液。

- 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 中已按试剂盒上的指定体积加入无水乙醇。

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

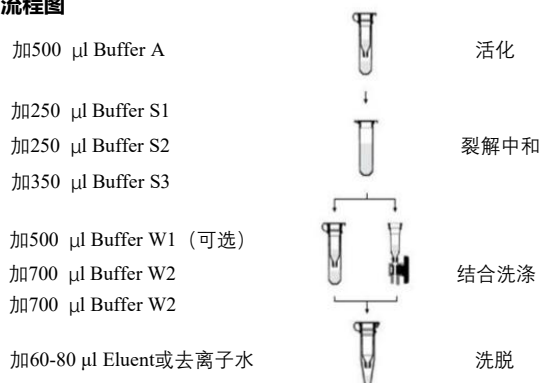
- 将制备管置于 2 ml 离心管 (试剂盒内提供) 中, 12,000 rpm 离心 1 min。

- 将制备管移入新的 1.5 ml 离心管中 (500T 规格自备), 在制备管膜中央加 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°C 将提高洗脱效率。

*如果需要较大的质粒 DNA 浓度, 可以适当减少洗脱液的体积, 2 次重复洗脱。

四、流程图



五、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。
DNA 纯度低	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。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。
高纯度的质粒 A _{260/280} 比值通常在 1.7-1.9 之间。低于 1.7 考虑蛋白质污染，高于 1.9 考虑 RNA 污染。	1.A _{260/280} 比值过低 表现为琼脂糖凝胶电泳的背景底色亮和酶切效率低	
	1) 菌量过多 2) 加入 Buffer S1 后菌体未完全悬起 3) 加入 Buffer S2 后裂解不完全 4) 加入 Buffer S3 后中和不完全	
	2.A _{260/280} 比值过高 表现为电泳时会出现 RNA 条带	
	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	
	BMH71-18 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	
JM110 TG1		
LE392 Y1088 (Y10 系列宿主菌都是 EndA+)		
2.菌培养时间过长		

	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 细菌碎片、基因组和 RNA 污染都显现高亮电泳背景	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 少量 RNA 污染对于一般实验来说是没有影响的。	参见“A _{260/280} 比值过高”	
DNA 酶切效果不好 酶切效果不好可能是有抑制剂的污染（比如盐和乙醇）或者质粒修饰。偶尔，质粒在传代几次后会产生缺失。在排除其他原因的情况下，要通过测序才能确定。	1.盐污染 2.乙醇污染 3.Buffer S2 作用时间过长 4.核酸酶污染引起的质粒降解 5.质粒序列缺失	确保用 Buffer W2 洗涤 2 次。 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。