

UE 无内毒素质粒大量试剂盒

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 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-5	UE-MX-EP-10	UE-MX-EP-25
Kit size	5 preps	10 preps	25 preps
Maxiprep column	5	10	25
RNase A	135 µl	270 µl	700 µl
Buffer S1	70 ml	115 ml	285 ml
Buffer S2	70 ml	115 ml	285 ml
Buffer S3K	70 ml	115 ml	285 ml
Buffer B	70 ml	115 ml	285 ml
Buffer W1	80 ml	160 ml	350 ml
Buffer W2 concentrate	33 ml	66 ml	150 ml
ET-free water (70%Ethanol)	4 ml	7.5 ml	18 ml
Eluent A	15 ml	30 ml	70 ml
Buffer ETR	25 ml	50 ml	120 ml
Buffer PF	7 ml	13 ml	30 ml
Protocol manual	1	1	1

RNase A: 50 mg/ml, 室温可贮存 6 个月, 长期贮存于 -20℃。

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 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。

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。

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。
- 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。若沾染皮肤、眼睛时, 要立即用大量清水或生盐水冲洗, 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。
- 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℃预冷。
- 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。

- Eluent A 在 65℃预热后使用, 有利于提高质粒得率。
- Buffer S3K、Buffer B 和 Buffer ETR 使用前置于 4℃预冷。
- 准备无核酸和核酸酶污染的 Tip 头、50 ml 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℃水浴。

四、操作步骤

- 取 80-200 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), 3,000×g 离心 8 min, 弃上清。将离心管倒置于纸巾上 1 min, 除尽上清。
*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 RNaseA。
- 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 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 污染。
*此步骤不宜超过 5 min。
- 加 10 ml 4℃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 5 min, 8,000×g 离心 (4℃) 10 min
*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 中的上清转入新的 50 ml 离心管 (自备) 中, 向上清中加入 10 ml 4℃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:

- 6A. 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。
- 7A. ≥6,000×g 离心 5 min。
- 8A. 弃滤液, 加 12 ml Buffer W1 至制备管中, ≥6,000×g 离心 5 min。
- 9A. 弃滤液, 加 14 ml Buffer W2 至制备管中, ≥6,000×g 离心 5 min。
*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:

- 6B. 正确连接负压装置, 将大量制备管插到负压装置的插口上。
- 7B. 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。
- 8B. 保持负压, 加 12 ml Buffer W1, 吸尽管中溶液。
- 9B. 保持负压, 加 14 ml 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。
10. 再在大量制备管中加 4 ml Buffer W2, ≥6,000×g 离心 5 min。
11. 将制备管置于另一洁净 50 ml 离心管中, 在制备管膜中央加 2 ml Eluent A, 室温静置 5 min, ≥6,000×g 离心 5 min 收集质粒 DNA。
*将 Eluent A 加热至 65℃将提高洗脱效率。
12. 弃制备管。在滤液中加入 4 ml 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℃加热 2h, 4℃预冷后使用。
13. 加入 1 ml Buffer PF, 混合均匀。

*溶液可能会出现微弱的浑浊现象，此为正常现象。

14. 置于 56°C 孵育 8 min。室温 4,000×g 离心 5 min。

*孵育后溶液将出现大量乳白色沉淀，否则延长孵育时间。

*孵育后溶液有可能出现分层现象，此为正常现象。

*此步骤的离心必须使用吊篮式 (swing-out rotor) 离心机或其他水平离心机

15. 取无色上相至 50 ml 离心管中，加入 0.8 倍体积异丙醇 (如：取得 6 ml 无色上相，则加入 4.8 ml 异丙醇)，混合均匀。室温静置 10 min。
8,000×g 离心 10 min。

16. 尽可能弃尽上清。加入 2 ml 预冷的 ET-free water (70%Ethanol)，洗涤沉淀，8,000×g 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。

17. 尽可能弃尽上清。在超净台中干燥 10-15 min。

*管壁上残留液体可短暂离心后吸弃。

18. 加入 500 µl Eluent A 或无内毒素水溶解质粒 DNA。

*溶解质粒 DNA 时需用吸头上下吹打直至沉淀完全溶解。

五、流程图

加 10 ml Buffer S1
加 10 ml Buffer S2
加 10 ml Buffer S3K

裂解
中和

离心 8,000×g (4 °C), 10min
加 10ml Buffer B

加 12 ml Buffer W1
加 14 ml Buffer W2
加 4 ml Buffer W2
离心 6,000×g, 5 min

结合
洗涤

加 2 ml Eluent A

洗脱

加 4 ml Buffer ETR
加 1 ml Buffer PF
56°C 孵育 8 min

内毒素去除

4,000×g 离心 5 min

分相

加 0.8 倍体积异丙醇至上相
加 2 ml 预冷的 ET-free water (70%
Ethanol)

沉淀质粒

干燥后，加 500 µl Eluent A 或无内
毒素水

溶解质粒