

UE 无内毒素质粒小量试剂盒（快速法）

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) 有效去除内毒素，可 20 min 内从 1-4 ml 细菌培养物中提取出多至 30 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-FEP-50	UE-MN-FEP-150
Kit size	50 preps	150 preps
Miniprep column	100	300
2 ml Collection tube	100	300
RNase A	30 µl	90 µl
Buffer S1A	15 ml	45 ml
Buffer S2A	15 ml	45 ml
Buffer S3K	21 ml	63 ml
Buffer W2B concentrate	32 ml	2×48 ml
Buffer B	55 ml	160 ml
Eluent A	12 ml	36 ml
Buffer ETR	9 ml	27 ml
Protocol manual	1	1

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

Buffer S1A: 细菌悬浮液。加入 RNase A 后，混合均匀，4℃贮存。

Buffer S2A: 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 W2B 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。

Buffer B: DNA 结合溶液，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。

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 S2A 是否出现沉淀，如出现沉淀，应于 37℃ 温水浴加热溶解并冷却至室温后使用。
- Buffer S2A、Buffer S3K 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 S1A 中，4℃贮存。
- 第一次使用前，Buffer W2B concentrate 中加入指定体积的无水乙醇。
- Eluent A 在 65℃ 预热后使用，能提高质粒得率。
- Buffer ETR 使用前放到 4℃ 预冷。
- 准备无核酸和核酸酶污染的 Tip 头、离心管。
- 准备 42℃ 水浴。

四、操作步骤

高拷贝质粒最大使用菌液量及推荐 Buffer 量			
OD ₆₀₀ =3.0	Buffer S1A	Buffer S2A	Buffer S3K
4 ml	250 µl	250 µl	350 µl
8 ml	500 µl	500 µl	700 µl

- 取 1-4 ml 在 LB 培养基中培养过夜的菌液，12,000 rpm 离心 1 min，弃尽上清。
- 加 250 µl Buffer S1A 悬浮细菌沉淀，悬浮需均匀，不应留有小的菌块，混匀后的溶液为浑浊的红色。
- 加 250 µl Buffer S2A，温和并充分地上下翻转 8-10 次混合均匀使菌体充分裂解，直至形成透亮的紫红色溶液。此步骤不宜超过 5 min。
- 加 350 µl Buffer S3K，温和并充分地上下翻转混合 12-20 次，充分混匀，出现白色絮状沉淀，直至溶液全部变成黄色。12,000 rpm 离心 3 min。

*中和完成后，絮状沉淀中混有紫红色说明复性不充分，应继续混匀直至絮状沉淀全部为白色，溶液全部变为澄清的黄色。

- 将步骤 4 中的上清液倒入或者移液器吸取转移到吸附柱 A3 中 (吸附柱置于收集管中)，12,000 rpm 离心 1 min，弃滤液。

*上清液体积 > 800 µl，可以分多次过往。

- 将吸附柱放回收集管中，加 700 µl Buffer W2B，12,000 rpm 离心 1 min，弃滤液；以同样的方法再用 700 µl Buffer W2B 洗涤一次，弃滤液。

- 将吸附柱置回收集管中，12,000 rpm 离心空转 1 min。

- 将吸附柱移入新的 1.5 ml 离心管 (自备) 中，在膜中央加 150 µl Eluent A，室温静置 1 min。12,000 rpm 离心 1 min。

- 弃吸附柱，在滤液中加入 150 µl 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。

- 置于 42℃ 孵育 2 min。室温 12,000 rpm 离心 2 min。

*孵育后溶液将变浑浊，否则延长孵育时间直至溶液变浑浊。

*孵育后溶液有可能出现分层现象，此为正常现象。

- 取无色上相至 1.5 ml 离心管 (自备) 中，加入 2 倍体积 Buffer B (如：300 µl 无色上相，则加入 600 µl Buffer B)，混合均匀。

- 将步骤 11 中的混合液转移至吸附柱 (置于收集管内)，12,000 rpm 离心 1 min，弃滤液。

*若混合液过多，则可分两次过往。

- 将吸附柱置回离心管，加 700 µl Buffer W2B，12,000 rpm 离心 1 min，弃滤液。以同样的方法再用 700 µl Buffer W2B 洗涤一次，弃滤液。

*确认在 Buffer W2B concentrate 中已按试剂瓶上的指定体积加入无水乙醇。

*两次使用 Buffer W2B 冲洗能确保盐份被完全清除，消除对酶切反应的影响。

- 将吸附柱置回离心管中，12,000 rpm 空转离心 1 min。

- 将吸附柱移入新的 1.5 ml 离心管 (自备) 中，在膜中央加 60-80 µl Eluent A 或无内毒素水，室温静置 1 min。12,000 rpm 离心 1 min 洗脱质粒 DNA。

五、流程图

