

UE 无内毒素质粒大量试剂盒（柱法）

本试剂盒对 UE 无内毒素质粒大量制备试剂盒进行了优化, 采用内毒素去除柱有效去除内毒素, 适合于从 100-300 ml 细菌培养物中提取多至 2.0 mg 转染级别的质粒 DNA, 整个提取过程 50 min 以内, 方便快捷。

一、试剂盒组成、贮存、稳定性

Cat. No.	UE-MX-EP-V2-5	UE-MX-EP-V2-25
Kit size	5 preps	25 preps
Maxiprep column C05	5	25
Endotoxin-Removal column	5	25
UERed (可选)	375 µl	1.75 ml
RNase A	750 µl	2×1.8 ml
Buffer S1	75 ml	350 ml
Buffer S2A	75 ml	350 ml
Buffer S3K	75 ml	350 ml
Buffer W1	80 ml	350 ml
Buffer W2B concentrate	24 ml	100 ml
Eluent A	15 ml	60 ml
Protocol manual	1	1

二、运输和保存

试剂盒室温 (15-30℃) 干燥保存。RNase A 室温可贮存 6 个月, 长期贮存于 -20℃。

三、实验准备及注意事项

- 使用前, RNase A 和 UERed (可选) 全部加入 Buffer S1 中, 4℃ 贮存。
- 使用前确认 Buffer S2A 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。
- 使用前, Buffer W2B concentrate 中加入指定体积的无水乙醇。
- 加入 Buffer S2A 和 Buffer S3K 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。
- 需要自备无水乙醇、异丙醇和 50 ml 干净离心管。
- 提取质粒 DNA 的产量与菌液浓度、菌株种类、质粒拷贝数、质粒大小等因素有关。

四、操作步骤

- 取 100-300 ml 过夜培养的菌液, 8,000×g 离心 4 分钟, 弃上清。

高拷贝质粒菌液最大推荐量		
OD 600×ml 菌液	OD600=1.5	OD600=3.0
450	300 ml	150 ml

*菌体量太多会影响裂解效果导致得率降低, RNA 残留多异丙醇沉淀会堵柱。

- 加 12 ml Buffer S1 悬浮细菌沉淀, 旋涡震荡 30 s-1 min, 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。

*确认 Buffer S1 中已加入 RNase A。

- 加 12 ml 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, 室温放置 2-3 min, 此时菌液呈现透亮的紫红色溶液。

此步骤不宜超过 5min, 避免质粒 DNA 受到破坏。

- 加 12 ml Buffer S3K, 温和并充分地上下翻转 10-12 次混合均匀, 出现白色絮状沉淀, 直至溶液全部变成黄色。室温放置 5 min, 8,000×g 离心 (4℃) 10 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。以上步骤 2-4 为添加 UERed 指示剂参考步骤。

*加入 Buffer S3K 后应立即温和颠倒混匀, 避免产生局部沉淀。

- 将步骤 4 中的上清液转入内毒素去除柱中, 过滤到新的 50 ml 离心管 (自备) 中, 向过滤后的上清液加入 0.3 倍体积的异丙醇 (约 10 ml), 上下颠倒混匀。

*低拷贝质粒, 建议加 0.2 倍体积的异丙醇避免 RNA 污染。

步骤 6~9 可选择负压法或者离心法

A. 负压法

- 6A. 正确连接负压装置, 将大量制备管插到负压装置的插口上。吸取步骤 5 中的混合液, 分 2 次转移到大量制备管中, 开启并调节负压至 -25-30 英寸汞柱, 缓慢吸尽管中溶液。

- 7A. 保持负压, 加 12 ml Buffer W1, 吸尽管中溶液。

- 8A. 加 14 ml Buffer W2B, 吸尽管中溶液。

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

- 9A. 将大量制备管置于 50 ml 离心管中, 加 4 ml Buffer W2B 溶液, ≥ 7,000×g 离心 2 min。再加 3 ml 无水乙醇至吸附柱中, ≥ 7,000×g 离心 5 min, 弃滤液。

*低拷贝质粒, 建议再加 3ml 无水乙醇≥ 7,000×g 离心 5 min 洗涤 1 次提高 260/230 值。

B. 离心法

- 6B. 大量制备管放入 50 ml 离心管中, 将步骤 5 中的混合液分 2-3 次转移至制备管中, 每次≥ 7,000×g 离心 2 min。

*混合液加入大量制备柱体积尽量不要超过刻度线。

*如果存在离心管与制备柱不匹配, 推荐百赛耗材 50 ml 离心管 (BL2012500)。

- 7B. 弃滤液, 加 12 ml Buffer W1, ≥ 7,000×g 离心 2 min。

- 8B. 弃滤液, 加 14 ml Buffer W2B, ≥ 7,000×g 离心 2 min。

- 9B. 将大量制备管置于 50 ml 离心管中, 加 4 ml Buffer W2B 溶液, ≥ 7,000×g 离心 5 min。

10. 将大量制备管置于另一洁净的 50 ml 离心管中, 在制备管的膜中央上加 1.5 ml Eluent A, 室温静置 2-5 min, ≥ 6,000×g 离心 5 min 收集质粒 DNA, -20℃ 保存。

*负压法无水乙醇晾干后膜表面极度缺水, 若用去离子水 (pH7.5-8.0) 洗脱, 需要克服较大的表面张力浸润膜表面, 导致质粒 DNA 洗脱效率差, 要进行洗脱液二次重复过柱洗脱。

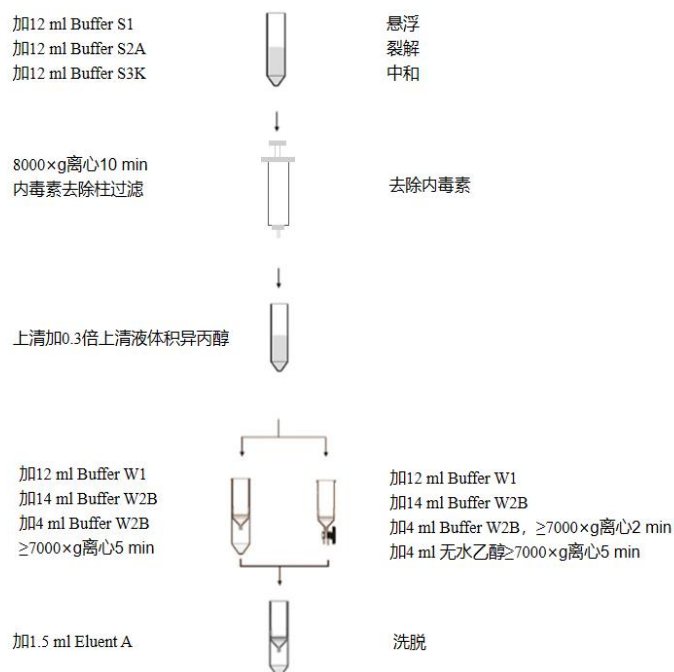
*洗脱液体积不建议少于 1 ml, 最适合洗脱体积为 1.5 ml, 首次洗脱可获得 65%-80% 的质粒 DNA, 建议用第一次洗出的洗脱液进行二次重复洗脱。

*低拷贝或者大片段质粒 DNA 将 Eluent A 加热至 65℃ 将提高洗脱效率。

五、(可选) 质粒 DNA 浓缩

- 1 ml 质粒 DNA 加入 0.1 ml (0.1 倍样本体积) 3 M 醋酸钠 (pH 5.2) 和 0.7 ml (0.7 倍样本体积) 异丙醇, 上下颠倒混匀。
- 15000×g 离心 20 min, 小心弃除上清保留沉淀。
- 用 1 ml 70% 乙醇洗涤质粒 DNA 沉淀, 15000×g 离心 10 min, 小心弃除上清。
- 空气干燥质粒 DNA 5-10 min, 加入 100-500 µl Eluent A 或者去离子水溶解质粒 DNA。

六、流程图



七、添加指示剂参考图例



① Buffer S1 12 ml 重悬



② Buffer S2A 12 ml 裂解



③ Buffer S3K 12 ml 中和



④ 8000g/10min