

UE质粒大量制备试剂盒

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 120-300 ml 细菌培养物中提取多至 500 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-MX-P-10	UE-MX-P-25
Kit size	10 preps	25 preps
Maxiprep column	10	25
RNase A	270 µl	700 µl
Buffer S1	115 ml	285 ml
Buffer S2	115 ml	285 ml
Buffer S3K	115 ml	285 ml
Buffer B	115 ml	285 ml
Buffer W1	160 ml	350 ml
Buffer W2 concentrate	2×36 ml	150 ml
Eluent	25 ml	60 ml
Protocol manual	1	1

RNase A: 50 mg/ml，室温贮存6个月；长期贮存于-20°C。

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（用100%乙醇或95%乙醇），混合均匀，室温密闭贮存。

Eluent: 2.5 mM Tris-HCl, pH 8.5。室温密闭贮存。

二、注意事项

1. 细菌过量将影响溶菌及质粒DNA的释放。
2. 在步骤3和步骤4中操作必须温和。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。
3. 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结。
4. DNA分子呈酸性，建议在2.5 mM Tris-HCl, pH 8.5洗脱液中保存。



三、实验准备

1. 第一次使用时，在 **Buffer W2 concentrate** 中按试剂瓶上指定的体积加入无水乙醇。
2. 准备无核酸和核酸酶污染的 Tip 头、离心管。
3. 4°C 预冷 **Buffer S3K** 和 **Buffer B**。
4. 将洗脱液或去离子水加热至 65°C，有利于提高洗脱效率。
5. 使用前检验 **Buffer S2** 是否出现沉淀，若出现沉淀，应于 37°C 温浴溶解并冷却至室温后再使用。

四、操作步骤

第一次使用时，将 **RNase A** 全部加入 **Buffer S1** 中，混合均匀，4°C 贮存。

1. 取 120 ml 在 LB 培养基中培养过夜的高拷贝数质粒菌液，或 250 ml 过夜培养的低拷贝质粒/Cosmid 菌液（若使用丰富培养基，菌液体积应减半或更少）， $\geq 3,000 \times g$ 离心 10 min，弃上清。将离心管倒置于纸巾上数分钟，除尽上清。
2. 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 **RNase A**。
3. 加 10 ml **Buffer S2**，温和并充分地上下翻转 8-10 次混合均匀使菌体充分裂解，直至形成透亮的溶液。
 - * **Buffer S2** 使用后应立即盖紧瓶盖，以免空气中的 CO_2 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。
4. 加 10 ml 4°C 预冷的 **Buffer S3K**，温和并充分地上下翻转 10-12 次混合均匀，直至形成紧实的凝集块，室温放置 5 min。 $8,000 \times g$ 离心（4°C）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 的污染。
5. 将步骤4中的上清转入新的50ml离心管（自备）中，向上清中加 10 ml 4°C 预冷的 **Buffer B**，温和并充分地上下翻转 10-12 次混合均匀。
6. 正确连接负压装置，将大量制备管插到负压装置的插口上。
7. 吸取步骤5中的混合液，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。
8. 保持负压，加 12 ml **Buffer W1**，吸尽管中溶液。
9. 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. 将大量制备管置于 50 ml 离心管中，加 4 ml **Buffer W2** 溶液， $\geq 6,000 \times g$ 离心 5 min。
 - * 可选步骤：将大量制备管插到负压装置的插口上，最大负压吸 10 min 以确保除尽残留的 **Buffer W2**。
11. 将大量制备管置于洁净的 50 ml 离心管中，在制备管的膜中央上加 1.5 ml **Eluent** 或去离子水，室温静置 5 min。 $\geq 6,000 \times g$ 离心 5 min 收集质粒 DNA。
12. 可选步骤：同样方法，在制备管的膜中央上加 0.75 ml **Eluent** 或去离子水，室温静置 1 min。 $\geq 6,000 \times g$ 离心 5 min 收集质粒 DNA。



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 $8,000 \times g$ (4°C), 10 min
加 10 ml Buffer B



加 12 ml Buffer W1
加 14 ml Buffer W2
加 4 ml Buffer W2,
 $\geq 6,000 \times g$ 离心 5 min



结合
洗涤



加 1.5 ml Eluent 或去离子水
可选步骤: 再加 0.75 ml Eluent
或去离子水



洗脱



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	1) 菌量过多	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）。
		2) Buffer S2 过期	Buffer S2 中的 NaOH 易被空气中的 CO ₂ 中和。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	1) 膜过干	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 预热以及增加洗脱前静置时间至 5min 都可提高洗脱效率。	
DNA 纯度低 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	
2. A _{260/280} 比值过高 表现为电泳时会出现 RNA 条带	3) 加入 Buffer S2 后裂解不完全	4) 加入 Buffer S3K 后中和不完全	
		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			



主要问题	原因	建议																		
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 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 <table border="1" data-bbox="402 533 952 920"> <tr> <td>BL21(DE3)</td> <td>MC1061</td> </tr> <tr> <td>BMH71-18</td> <td>NM522 (NM 系列宿主菌都是 End A+)</td> </tr> <tr> <td>CJ236</td> <td>P2392</td> </tr> <tr> <td>ES1301</td> <td>PR700 (PR 系列宿主菌都是 End A+)</td> </tr> <tr> <td>HB101</td> <td>Q358</td> </tr> <tr> <td>JM83</td> <td>RR1</td> </tr> <tr> <td>JM101</td> <td>TB1</td> </tr> <tr> <td>JM110</td> <td>TG1</td> </tr> <tr> <td>LE392</td> <td>Y1088 (Y10 系列宿主菌都是 End A+)</td> </tr> </table>	BL21(DE3)	MC1061	BMH71-18	NM522 (NM 系列宿主菌都是 End A+)	CJ236	P2392	ES1301	PR700 (PR 系列宿主菌都是 End A+)	HB101	Q358	JM83	RR1	JM101	TB1	JM110	TG1	LE392	Y1088 (Y10 系列宿主菌都是 End A+)	尽量使用 endA- 宿主菌。 确保 Buffer W1 洗涤 1 次。
	BL21(DE3)	MC1061																		
BMH71-18	NM522 (NM 系列宿主菌都是 End A+)																			
CJ236	P2392																			
ES1301	PR700 (PR 系列宿主菌都是 End A+)																			
HB101	Q358																			
JM83	RR1																			
JM101	TB1																			
JM110	TG1																			
LE392	Y1088 (Y10 系列宿主菌都是 End A+)																			
	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 S3K 后中和不完全	不要超过 16 小时 存放 3 个月以内 请于-20℃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 5min.																		



主要问题	原因	建议
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	<ol style="list-style-type: none"> 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 S3K 后中和不完全 	
基因组 DNA 污染	<ol style="list-style-type: none"> 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 S3K 后剧烈震荡/中和不完全 	
RNA 污染 少量的 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。	<ol style="list-style-type: none"> 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 	<p>确保用 Buffer W2 洗涤 2 次。</p> <p>在最后一次 Buffer W2 洗涤后可将制备管离心时间由原来 1min 增加至 2min。</p>

