

彩色质粒小量提取试剂盒(柱式) Plasmid Extraction Mini Kit

产品编号: C6201

保存条件: 室温干燥可保存一年, 4℃保存可更长时间。

产品介绍: 产品简介

本试剂盒利用多彩的颜色变化, 监控质粒提取的每步过程, 让实验变得高效并轻松有趣。本试剂盒用于高纯度质粒 DNA 的小量制备。菌体经碱裂解、高盐、低 pH 处理, 质粒可从菌体中释放出来, 并特异、高效地被离心吸附柱吸附。通过清洗液的洗涤可去除杂质, 在低盐、高 pH 条件下洗脱, 最后得到高达 20 ug 纯度较高的质粒 DNA。使用本试剂盒每次可处理 1-5 ml 过夜培养的菌液, 可在 30 min 之内完成提取任务。所得质粒可直接用于酶切、转化、PCR、测序等各种分子生物学实验。

产品优势

1. 操作简易、快捷、高效(得率高)。
2. 纯度高: 沉淀致密, 去杂干净。
3. 含有指示剂, 可直观判断操作过程中样本裂解程度。

注意事项

1. 细菌培养时间一般为15小时左右, 如接种量大则应减少培养时间, 过度培养会降低质粒质量甚至导致质粒 DNA 突变。
2. 使用前应将全部RNase A溶液加到Solution I中混合均匀, 2-8℃可稳定保存6个月; 若溶液II、III 产生沉淀, 应在使用前置于37℃下溶解沉淀; 同时并注意溶液 I, II 和 III 的用量比例, 若细菌量增大, 需按比例放大这些溶液的使用量。
3. 随菌体增多应延长 Solution II 的作用时间, 直至溶液成粘稠透明状, 但时间过长会导致质粒 DNA 变性。
4. 质粒的产量跟细菌量、质粒拷贝数、质粒大小和操作规范程度密切相关。
5. 纯化的质粒在电泳中表现为2-3条带有时甚至为4-6条带均属正常, 未分开的环套质粒, 易被误判为基因组 DNA。

操作步骤

1. 柱平衡: 向离心吸附柱中加入 400 µl Buffer BL, 静止 1 min, 室温下 12,000 rpm 离心 1 min, 弃除收集管中的废液, 将离心吸附柱重新放回收集管中。注意: 请使用当天处理过的吸附柱。
2. 取 1-5 ml (如果是低拷贝质粒可以收集更多菌液) 过夜培养的菌液, 室温 12,000 rpm 离心 1 min, 尽量将上清去除干净。注意: 根据菌液的浓度决定取液量, 浓度高

时取 1.5 ml 菌液离心即可，浓度低时可多收集一次。

3. 加入 250 ul Solution I，旋涡震荡或用移液器充分吹打使菌体重悬均匀，呈现出均匀浑浊的棕红色。注意：菌体沉淀一定要悬浮均匀，如有未彻底悬浮的菌块会影响裂解，导致提取的质粒浓度及纯度降低。

4. 加入 250 ul Solution II，温和颠倒混匀使菌体完全裂解，直到溶液变成清亮、粘稠的紫红色。注意：不可剧烈震荡，以免造成基因组 DNA 片段的污染，所用时间不要超过 5 min，以免质粒受到破坏，如未完全变得清亮，可能是菌体太多，可增加 Solution II 的用量，在后续的操作中 Solution III 的用量也要相应增加。

5. 加入 350 ul Solution III，立即温和颠倒混匀，可见红黄相间的沉淀物产生，继续混匀直到完全变为黄色，室温静置 2 min，然后 12,000 rpm 离心 5 min。注意：Solution III 加入后应立即混合，避免产生局部沉淀，如果上清中还有紫色漂浮物，说明复性不充分，继续混匀至溶液颜色完全变为澄清的黄色。

6. 小心将上清液转移到离心吸附柱中，静置 2 min，让质粒 DNA 与吸附柱中的硅胶膜充分结合。12,000 rpm 离心 30 sec，弃收集管中滤液。

7. 可选步骤：向吸附柱中加入 500 ul Buffer WB1，12,000 rpm 离心 30 sec，弃收集管中滤液。注意：如果宿主菌是 endA⁻，如 DH5 α 或 TOP10，此步骤可省略。如果宿主菌是 endA⁺，如 TG1、BL21、HB101、JM101 等，此步骤不可省略，因这些宿主菌含有大量的核酸酶，易降解质粒。如果提取低拷贝质粒也推荐采用此步骤。

8. 加入 500 ul Buffer WB2，室温 12,000 rpm 离心 30 sec，弃收集管中滤液。注意：Buffer WB 2 为浓缩液，初次使用按要求加入无水乙醇，用后应立即盖紧瓶盖，以防酒精挥发。

9. 重复步骤 8 一次。

10. 室温 12,000 rpm 离心 2 min，甩干残留液体。注意：此步不能省略，否则残留乙醇会影响质粒的后续使用。

11. 将离心吸附柱置于一个新的 1.5 ml 塑料离心管（自备）中，加入 50 ~ 100 ul 的洗脱液 Buffer EB，室温放置 2 min。12,000 rpm 离心 1 min，离心管底溶液即质粒 DNA。注意：为增加洗脱效率，可将洗脱液在 60℃ 预热。如需使用去离子水洗脱，可用 NaOH 调整其 pH 值在 7.0 - 8.5 之间，为了增加质粒回收率，可将得到的溶液重新加入到离心管中，室温放置 2 min，再次离心收集。

低拷贝或大质粒 (>10 kb) 提取

如果所提质粒为低拷贝质粒，或大于 10 kb 的大质粒，或提取农杆菌质粒，或提取革兰氏阳性菌质粒，应加大菌体使用量，使用 5-10 ml 过夜培养物，同时按照比例增加 Solution I、II、III 的用量，洗脱液 Buffer EB 应在 60℃ 水浴预热，在吸附和洗脱时可以适当延长时间，以增加提取效率。其它步骤相同。