

高纯度质粒小量快速提取试剂盒(离心柱型)

HiPure Plasmid MiniPrep Kit

目录号: SP0112

产品内容

产品组成	SP0112-50
Buffer BL	25ml
Solution I	15ml
Solution II	15ml
Solution III	20ml
Buffer WB1 (concentrate)	13ml
Buffer WB2 (concentrate)	15ml
Buffer EB	10ml
RNase A (10 mg/ml)	150ul
Spin Column With Collection Tubes	50 套

(注意: 使用前将全部 RNase A 溶液加到 Solution I 中混合均匀, 2 - 8°C 保存; 按要求在 Buffer WB1 加入无水乙醇 17ml, WB2 中加入无水乙醇 45ml)。

保存条件

在室温(15 ~ 25°C)干燥条件下, 可保存 12 个月; 更长时间保存可置于 2 ~ 8°C。若溶液产生沉淀, 应在使用前置于 37°C 下溶解沉淀。加入 RNase A 后的 Solution I 应置于 2 ~ 8°C 保存, 可稳定保存 6 个月。

产品简介

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、测序及转染等各种分子生物学实验。

产品特点

1. 快捷、高效: 操作简便, 得率高, 节约时间;
2. 纯度高: 杂质去除干净, 相当于零杂质。

注意事项

1. 细菌培养时间一般为 12 ~ 16 小时, 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. 每次使用时都要注意 Solution II 和 III 是否形成沉淀, 如有沉淀, 37°C 溶解后再用;
3. 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;
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, 一般 1.5 ml 过夜培养菌体可收获约 10 ug 高拷贝质粒。

操作步骤

柱平衡: 向吸附柱中(吸附柱放入收集管中)加入 400 μ l 的平衡液 BL, 12,000 rpm (-13,400 \times g) 离心 1 min, 弃收集管中滤液, 将吸附柱重新放回收集管中。(请使用当天处理过的柱子)

1. 取 1 ~ 5 ml 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)

2. 加入 250 μ l Solution I, 旋涡震荡或用移液器充分吹打使菌体重悬均匀。

(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)

3. 加入 250 μ l 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。

(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)



4. 加入 350 ul Solution III, 立即温和颠倒混匀, 可见白色絮状物产生, 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)

5. 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 0.5min, 弃收集管中滤液。

6. 【可选步骤】向吸附柱中加入 500 ul Buffer WB1, 12,000 rpm 离心 0.5 min, 弃收集管中滤液。

(注意: Buffer WB 1 为浓缩液, 按要求加入无水乙醇, 用后应立即盖紧瓶盖, 以防酒精挥发。如果宿主菌是核酸内切酶缺失 (endA-), 如 DH5 α 或 TOP10, 此步骤可省略。如果宿主菌是核酸内切酶没有缺失 (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)

7. 加入 600 ul Buffer WB2, 室温 12,000 rpm 离心 0.5 min, 弃收集管中滤液。

(注意: Buffer WB 2 为浓缩液, 按要求加入无水乙醇, 用后应立即盖紧瓶盖, 以防酒精挥发)

8. 加入 500 ul Buffer WB2, 室温 12,000 rpm 离心 2 min, 弃收集管中滤液。

(注意: 此步不能省略, 否则残留乙醇会影响质粒的后续使用)

9. 将吸附柱置于一新的无菌 1.5 ml 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溶液。

(注意: 为增加洗脱效率, 可将洗脱液在 60°C 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, 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°C 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。