

Trelief® Plasmid Mini Kit Plus

高纯度质粒小提试剂盒

目录号

TSP502-200

产品简介

本产品采用改良的SDS-碱裂解法,结合先进的硅胶膜吸附技术,可达到快速纯化质粒DNA的目的。适用于从1~4 mL的细菌培养物中提取多至20 μg高纯度的质粒DNA。配备独特的颜色指示剂,通过其颜色的变化,指示重悬、裂解、中和是否完全,从而保证质粒提取的质量,实现可视化的操作流程。提取的质粒DNA可直接用于测序、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。

产品组成

组分	TSP502-200 (200次)	保存条件及稳定性
RNase A (10 mg/mL)	600 μL	-15~-25°C保存1年
TSINGRed	300 μL	15~25°C保存1年
Buffer BL	60 mL	15~25°C保存1年
Buffer PA	60 mL	15~25°C保存1年

01

本产品仅供研究使用,不用于临床诊断。

Buffer PB	60 mL	15~25°C保存1年
Buffer PC	80 mL	15~25°C保存1年
Buffer PWA	120 mL	15~25°C保存1年
Buffer PWB	50 mL	15~25°C保存1年, 加入无水乙醇后可保存6个月
Eluent	25 mL	15~25°C保存1年
Spin Columns T1 (吸附柱)	200 个	15~25°C保存1年
Collection Tubes (2 mL收集管)	200 个	15~25°C保存1年

产品特点

- 操作简便:在30 min内可完成多个样品的质粒DNA提取;
- 纯度高:提取的质粒可直接用于测序、酶切等实验;
- 操作可视化:独特的颜色指示剂指示操作过程,保证质粒提取质量。

注意事项及准备

- 第一次使用前,将RNase A和TSINGRed全部加入至Buffer PA中,混匀后置置于2~8°C保存;
- TSINGRed是一种指示剂,用来指示操作的正确性,对人体无害,建议选择使用;
- 第一次使用前,向Buffer PWB中加入200 mL无水乙醇,混匀后方可使用;
- 当环境温度低时,Buffer PB中的SDS可能出现浑浊或析出沉淀,将其37°C水浴加热几分钟即可恢复澄清,请勿剧烈摇晃,以

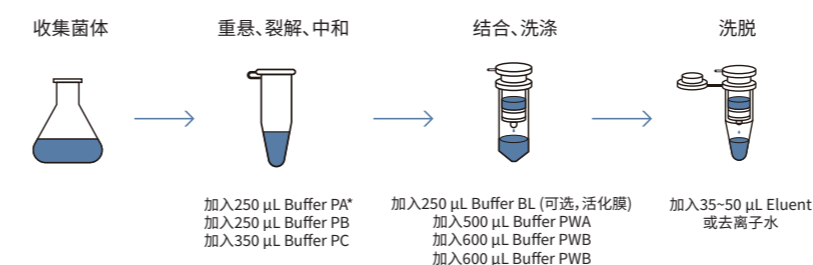
02

本产品仅供研究使用,不用于临床诊断。

免形成泡沫;

- 请勿直接接触Buffer PB、Buffer PC和Buffer PWA,操作时需戴乳胶手套、口罩和眼镜。若沾染皮肤、眼睛应立即用大量清水或生理盐水冲洗,必要时及时就医;
- 各溶液使用后请及时将盖子拧紧;
- 实验前准备
设备:小型台式离心机、移液器、水浴锅;
耗材:1.5 mL或2 mL离心管。

操作流程



*若Buffer PA中加入TSINGRed,则重悬、裂解、中和过程中存在颜色指示变化,如下图所示。



03

本产品仅供研究使用,不用于临床诊断。

操作步骤 (实验前请先阅读注意事项)

1. (可选) 活化硅胶膜:将吸附柱置于收集管中,加入250 μL Buffer BL, 12,000 rpm (13,400 × g) 离心1 min, 弃废液;
 - 2.取1~4 mL过夜培养的菌液, 12,000 rpm (13,400 × g) 离心1 min, 收集菌体, 尽量吸除上清;
 - 3.加入250 μL Buffer PA (请先检查是否已加入RNase A和TSINGRed) 重悬菌体沉淀, 涡旋震荡至无明显菌块为止;
- 注:若菌体沉淀未彻底悬浮均匀会影响裂解效果,导致提取得率和纯度偏低。**

TSINGRed溶液的加入对后续PCR扩增、酶切和测序都没有影响。使用时按照TSINGRed:Buffer PA=1:200的比例混匀,混匀后的溶液为澄清的红色。与菌体混匀后呈现浑浊的粉红色。

- 4.加入250 μL Buffer PB, 温和地上下翻转6~8次,使菌体充分裂解;

注:此步需要温和翻转,不能剧烈震荡,以免打断基因组DNA,使提取的质粒中含有基因组DNA片段。混合后菌体应变得清亮粘稠,若未变得清亮,可能是由于菌体量过多,裂解不充分导致,应减少菌体量。

使用TSINGRed后,若菌体裂解充分,则溶液应由浑浊的粉红色彻底转变为澄清的紫色;若裂解不充分,则紫色溶液中混有浑浊的粉红色。此时,应继续上下翻转混匀,直至溶液彻底变成澄清的紫色。

- 5.加入350 μL Buffer PC, 温和地上下翻转6~8次,充分混匀, 12,000 rpm (13,400 × g) 离心10 min;

注:使用TSINGRed后,若菌体中和复性充分,则溶液应由澄清的紫

04

本产品仅供研究使用,不用于临床诊断。

色彻底转变为浅黄色,且伴随白色絮状沉淀的产生;若中和复性不充分,则黄色溶液中混有紫色。此时,应继续上下翻转混匀,直至溶液彻底变成浅黄色。

6.小心吸取上清,将上清转入吸附柱中(注意不要吸出沉淀),12,000 rpm (13,400 × g) 离心1 min,弃废液,将吸附柱放回空收集管;

7.加入500 μL Buffer PWA至吸附柱中,12,000 rpm (13,400 × g) 离心1 min,弃废液;

8.在吸附柱中加入600 μL Buffer PWB(请先检查是否已加入指定体积的无水乙醇)12,000 rpm (13,400 × g) 离心1 min,弃废液;

9.重复步骤8;

10.将吸附柱放回空收集管中,12,000 rpm (13,400 × g) 离心2 min;

11.取出吸附柱,放入干净的1.5 mL离心管中,20~25°C静置2 min,使残留的乙醇挥发。在吸附膜的中间部位加入35~50 μL Eluent (60~65°C预热Eluent效果更好),室温静置2 min,12,000 rpm (13,400 × g) 离心2 min。如需较多量DNA,可将得到的溶液重新转入吸附柱中,离心2 min。

注:洗脱体积越大,洗脱得率越高,如需得到较高浓度的DNA,可以适当减少洗脱体积,但最小体积不应少于25 μL,体积过小会降低DNA洗脱得率,降低产量。

▪ 常见问题及解决方案

1.低拷贝质粒或大质粒(>10 kb)提取

如果提取的质粒为低拷贝或大质粒(>10 kb),应加大菌液量的使用,使用6~8 mL过夜培养的菌液,同时按比例增加Buffer PA、Buffer PB和Buffer PC的用量,并在吸附和洗脱时适当延长时,从而增加提取效率,其它步骤相同。

2.质粒DNA产量低

(1)与质粒拷贝数相关。载体因拷贝数差异会造成质粒产量明显的波动。高拷贝数的载体常有2~3倍的产量波动,(每毫升培养过夜的菌液,高拷贝数的质粒载体产量为3~16 μg)。而大质粒和表达型载体常以中低拷贝数为主,每毫升菌液的产量仅约为0.5~2 μg。

(2)菌种异常。菌种保存过程中存在质粒丢失现象,养菌前最好先划线活化,以稳定产量。

(3)菌体重悬和裂解不充分。菌体须在 Buffer PA(含RNase A)中充分重悬,成团的菌体因无法充分裂解而导致产量降低。

(4)试剂准备有误。Buffer PB若有沉淀析出需加热溶解。Buffer PWB加入乙醇体积不准确(乙醇浓度需控制在80%)。

3.基因组污染

(1)培养时间太长:菌液培养时间需控制在12~16 h。

(2)裂解问题:加入Buffer PB时,必须轻柔颠倒混匀;处理多个样品时,从加入Buffer PB时算起,总时间请勿超过5 min。

▪ 保存条件

保质期1年,试剂盒各组分保存条件见产品组成。

▪ 技术支持

本公司产品使用过程中如有任何疑问与建议,欢迎随时与我们联系:

product@tsingke.com.cn。

