

Western blot protocol _ Abcam

Monday, July 25, 2022 3:03 PM



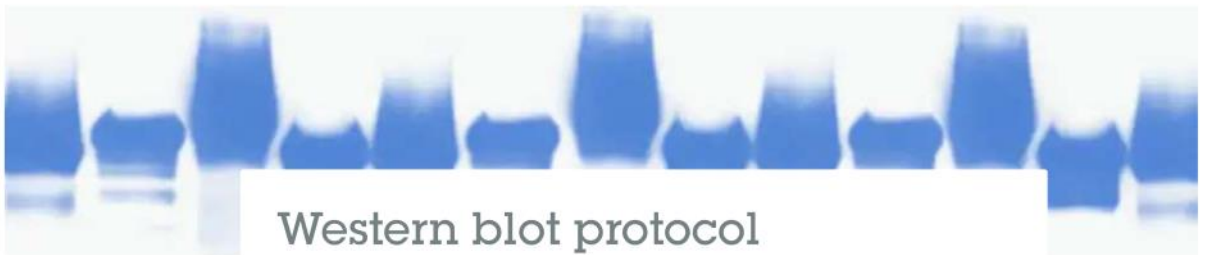
Western blot protocol _ Abcam



United States ▾

Call (888) 77-ABCAM (22226) or [contact us](#)[Sign in or Register](#)[My basket](#)[Quick order ▾](#)**abcam**

enter keyword e.g. p53, western blot or abID product code

[Research Products](#)[Customized Products & Partnerships](#)[Support](#)[Events](#)[Pathways](#)[Explore the power of knock-out cell lines for your research >](#)

Western blot protocol



Our western blot protocol includes solutions and reagents, procedures, and useful links to guide you through your experiment.

RELATED

Western blot resources

[Buffer and stock solutions](#)[Recommended controls](#)[Western blot sample prep](#)[Transfer and staining](#)[Membrane stripping](#)[Troubleshooting tips](#)[Primary antibodies for western blot](#)[Loading controls for WB](#)[Anti-beta Actin \(ab8227\) loading control](#)**Reviewed December 14 2020**

Western blotting is a technique that uses [specific antibodies](#) to identify proteins that have been separated based on size by gel electrophoresis. The immunoassay uses a membrane made of nitrocellulose or PVDF (polyvinylidene fluoride). The gel is placed next to the membrane and the application of an electrical current induces the proteins to migrate from the gel to the membrane. The membrane can then be further processed with antibodies specific for the target of interest and visualized using secondary antibodies and detection reagents.

Contents

[Solutions and reagents: lysis buffers](#)[Solutions and reagents: running, transfer, and blocking buffers](#)[Sample lysis](#)[Sample preparation](#)[Loading and running the gel](#)[Transferring the protein](#)[Antibody staining](#)

Recombinant
antibodies - the
benefits

Secondary antibodies for western blot

Anti-Rabbit IgG (HRP)
(ab205718)

1.00

Anti-Mouse IgG (HRP)
(ab205719)

IRDye® secondary
antibodies

Primary antibodies for
western blot

Find the right HRP
secondary antibodies

Guide for fluorescent
WB

Western blot training

Useful links

Webinar transcript

View our western blot protocol video below.

For other video protocols, please visit our video protocols library [here](#).

>> [Print the full western blot protocol](#)

 >> [View our western blot protocol diagram](#)

If you are looking to build up your skills in western blot analysis, check out [our free on-demand western blot training](#).

Solutions and reagents: lysis buffers

These buffers may be stored at 4°C for several weeks or aliquoted and stored at -20°C for up to a year.

NP-40 buffer

- 150 mM NaCl
- 1.0% NP-40 (possible to substitute with 0.1% Triton X-100)
- 50 mM Tris-HCl, pH 8.0
- Protease inhibitors

RIPA buffer (radioimmunoprecipitation assay buffer)

- 150 mM NaCl
- 1% IGEPAL CA-630
- 0.5% sodium deoxycholate
- 0.1% SDS (sodium dodecyl sulphate)
- 50 mM Tris-HCl, pH 8.0
- Protease inhibitors

Tris-HCl

- 20 mM Tris-HCl
- Protease inhibitors

Solutions and reagents: running, transfer, and blocking buffers**Laemmli 2X buffer/loading buffer**

- 4% SDS
- 10% 2-mercaptoethanol
- 20% glycerol
- 0.004% bromophenol blue
- 0.125 M Tris-HCl

Check the pH and adjust to 6.8

Running buffer (Tris-Glycine/SDS)

- 25 mM Tris base
- 190 mM glycine
- 0.1% SDS

Check the pH and adjust to 8.3

Transfer buffer (wet)

- 25 mM Tris base
- 190 mM glycine
- 20% methanol
- Check the pH and adjust to 8.3

For proteins larger than 80 kDa, we recommend that SDS is included at a final concentration of 0.1%.

Transfer buffer (semi-dry)

- 48 mM Tris
- 39 mM glycine
- 20% methanol
- 0.04% SDS

Blocking buffer

3–5% milk or BSA (bovine serum albumin)

Add to TBST buffer. Mix well and filter. Failure to filter can lead to spotting, where tiny dark grains will contaminate the blot during color development.

Sample lysis**Preparation of lysate from cell culture**

- 1** Place the cell culture dish on ice and wash the cells with ice-cold PBS.
- 2** Aspirate the PBS, then add ice-cold lysis buffer (1 mL per 10^7 cells/100 mm dish/150 cm² flask; 0.5 mL per 5×10^6 cells/60 mm dish/75 cm² flask).
- 3** Scrape adherent cells off the dish using a cold plastic cell scraper, then gently transfer the cell suspension into a pre-cooled microcentrifuge tube. Alternatively, cells can be trypsinized and washed with PBS prior to resuspension in lysis buffer in a microcentrifuge tube.
- 4** Maintain constant agitation for 30 min at 4°C.
- 5** Centrifuge in a microcentrifuge at 4°C. You may have to vary the centrifugation force and time depending on the cell type; a guideline is 20 min at 12,000 rpm but this must be determined for your experiment (leukocytes need very light centrifugation).
- 6** Gently remove the tubes from the centrifuge and place on ice, aspirate the supernatant and place in a fresh tube kept on ice, and discard the pellet.

Preparation of lysate from tissues

- 1** Dissect the tissue of interest with clean tools, on ice preferably, and as quickly as possible to prevent degradation by proteases.

- 2** Place the tissue in round-bottom microcentrifuge tubes or Eppendorf tubes and immerse in liquid nitrogen to snap freeze. Store samples at -80°C for later use or keep on ice for immediate homogenization. For a ~5 mg piece of tissue, add ~300 µL of ice-cold lysis buffer rapidly to the tube, homogenize with an electric homogenizer, rinse the blade twice with another 2 x 200 µL lysis buffer, then maintain constant agitation for 2 h at 4°C (eg place on an orbital shaker in the fridge). Volumes of lysis buffer must be determined in relation to the amount of tissue present; protein extract should not be too dilute to avoid loss of protein and large volumes of samples to be loaded onto gels. The minimum concentration is 0.1 mg/mL, optimal concentration is 1–5 mg/mL.
- 3** Centrifuge for 20 min at 12,000 rpm at 4°C in a microcentrifuge. Gently remove the tubes from the centrifuge and place on ice, aspirate the supernatant, and place in a fresh tube kept on ice; discard the pellet.

Sample preparation

- 1** Remove a small volume of lysate to perform a protein quantification assay. Determine the protein concentration for each cell lysate.
- 2** Determine how much protein to load and add an equal volume 2X Laemmli sample buffer.

We recommend reducing and denaturing the samples using the following method unless the online antibody datasheet indicates that non-reducing and non-denaturing conditions should be used.

- 3** *To reduce and denature your samples, boil each cell lysate in sample buffer at 100°C for 5 min. Lysates can be aliquoted and stored at -20°C for future use.*

Loading and running the gel

- 3.1** Load equal amounts of protein into the wells of the SDS-PAGE gel, along with a molecular weight marker. Load 20–30 µg of total protein from cell lysate or tissue homogenate, or 10–100 ng of purified protein.
- 3.2** Run the gel for 1–2 h at 100 V.

The time and voltage may require optimization. We recommend following the manufacturer's instructions. A reducing gel should be used unless non-reducing conditions are recommended on the antibody datasheet.

The gel percentage required is dependent on the size of your protein of interest:

Protein size

Gel percentage

4–40 kDa	20%
12–45 kDa	15%
10–70 kDa	12.5%
15–100 kDa	10%
25–100 kDa	8%

Gradient gels can also be used.

Transferring the protein from the gel to the membrane

The membrane can be either nitrocellulose or PVDF. Activate PVDF with methanol for 1 min and rinse with transfer buffer before preparing the stack. The time and voltage of transfer may require some optimization. We recommend following the manufacturer's instructions. Transfer of proteins to the membrane can be checked using Ponceau S staining before the blocking step.

Prepare the stack as follows:



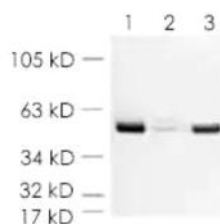
Figure 1. Example of prepared stack.

Antibody staining

- 1** Block the membrane for 1 h at room temperature or overnight at 4°C using blocking buffer.
- 2** Incubate the membrane with appropriate dilutions of primary antibody in blocking buffer. We recommend overnight incubation at 4°C; other conditions can be optimized.
- 3** Wash the membrane in three washes of TBST, 5 min each.
- 4** Incubate the membrane with the recommended dilution of conjugated secondary antibody in blocking buffer at room temperature for 1 h.
- 5** Wash the membrane in three washes of TBST, 5 min each.
- 6** For signal development, follow the kit manufacturer's recommendations. Remove excess reagent and cover the membrane in transparent plastic wrap.
- 7** Acquire image using darkroom development techniques for chemiluminescence, or normal image scanning methods for colorimetric detection.

Useful links

- ▶ [View more western blot protocols](#)
- ▶ View all [Abcam loading controls](#).
- ▶ Example loading control: [ab8227 beta actin](#)



All lanes: beta Actin antibody - loading control (ab8227) at 1/5000 dilution

Lane 1: HeLa whole cell extract

Lane 2: Yeast cell extract

Lane 3: Mouse brain tissue lysate

- ▶ View our list of available [positive control lysates](#), [blocking peptides](#), and [positive control proteins](#).
- ▶ View [AbExcel secondary antibodies](#) for exceptional western blots.

► [Watch our easy-to-follow video protocols.](#)

Protocols are provided by Abcam "AS-IS" based on experimentation in Abcam's labs using Abcam's reagents and products; your results from using protocols outside of these conditions may vary.

Webinar transcript

The purpose of western blotting is to separate proteins on a gel according to the molecular weight. The proteins are then transferred onto a membrane where they can be detected using antibodies. Heat the samples and 95 degrees C for five to 10 minutes in a sample buffer containing a reducing agent such as beta-mercaptoethanol. This results in linearized proteins with a negative charge proportional to their size.

Place a gel into the electrophoresis tank and add in buffer, ensuring the tops of the wells are covered. Acrylamide percentage of the gel being used depends on the molecular weight of the target protein. Load a molecular weight marker into the first lane then load the samples into adjacent wells. All the samples contain equal amounts of protein. Once all the samples are loaded, add running buffer, place the lid onto the electrophoresis tank. Turn on the power supply and set the voltage recommended by the manufacturer of the gels in the gel tank. You should be able to see bubbles rising through the tank. Run the gel until the dye front has moved sufficiently down the gel.

The next stage is to transfer the proteins from the gel onto a membrane. Membranes are usually made from nitrocellulose or PVDF. Remove the gel from the tank and carefully release it from its plastic case. Cut off the wells and the gel foot and place the gel into transfer buffer. Prepare the transfer stack by sandwiching the membrane and gel between filter paper and sponges. The membrane should be closest to the positive electrode and the gel closest to the negative electrode. Use a small roller to remove any bubbles between the gel and the membrane. Clamp the transfer case closed and submerge it into a transfer tank containing transfer buffer. Add water to the outer chamber to keep the system cool and put on the lid. Turn on the power supply to begin protein transfer. Time and voltage require optimization, so check the manufacturer's instructions for guidance.

Now that the proteins have migrated from the gel onto the nitrocellulose membrane, the protein of interest can be detected with an antibody. The membrane can be removed from the cassette and the molecular weight marker should now be visible. If required, the transfer of proteins can be confirmed by staining the membrane with ponceau S solution. To prevent nonspecific binding of the antibody, the membrane needs to be blocked. Pour blocking buffer onto the membrane and agitate gently on a rocker. Typically, this is done using a solution of five percent milk or bovine serum albumin, BSA, for two hours at room temperature or overnight at four degrees. The time and type of blocking buffer should be optimized, so check the datasheet of the primary antibody you intend to use for details.

After the membrane is blocked, remove the blocking buffer and add the diluted primary antibody in the same solution. Incubate on the rocker as before. Typically primary antibody incubations are for one hour at room temperature or overnight at four degrees C. Antibody concentration and incubation time will need to be optimized. Refer to the antibody datasheet for guidance. Pour off the primary antibody and rinse the membrane twice in wash buffer. Follow with one 15-minute wash and three 10 minute washes on a rocker. The wash buffer is usually tris buffered saline, TBS, or phosphate-buffered, saline, PBS, with 0.1 percent tween 20.

Pour off the wash buffer and incubate the membrane in conjugating secondary antibody which has been diluted in blocking buffer. Usually, this is done for one hour at room temperature, but antibody concentration and incubation time will need to be optimized. Pour off the secondary antibody and wash the membrane as shown previously.

There are several different systems for detection. If the secondary antibodies conjugate into an enzyme, incubate the membrane in the appropriate substrate before imaging. If the secondary antibodies are fluorescent conjugates then you can move directly onto the imaging step. Imaging can be carried out with X-ray film or with a digital imaging system. Place the membrane into an imaging tray. Place the imaging tray into the imaging system. Exposure times will most likely need to be optimized in order to clearly detect the bands relating to the proteins of interest.

Get resources and offers direct to your inbox

[Sign up](#)

A-Z by research area

[Cancer](#)
[Cardiovascular](#)
[Cell biology](#)
[Developmental biology](#)
[Epigenetics & Nuclear signaling](#)
[Immunology](#)
[Metabolism](#)
[Microbiology](#)
[Neuroscience](#)
[Signal transduction](#)
[Stem cells](#)

A-Z by product type

[Primary antibodies](#)
[Secondary antibodies](#)
[Biochemicals](#)
[Isotype controls](#)
[Flow cytometry multi-color selector](#)
[Kits](#)
[Loading controls](#)
[Lysates](#)
[Peptides](#)
[Proteins](#)
[Slides](#)
[Tags and cell markers](#)
[Tools & Reagents](#)

Help & support

[Support](#)
[Make an Inquiry](#)
[Protocols & troubleshooting](#)
[Placing an order](#)
[RabMAb products](#)
[Biochemical product FAQs](#)
[Training](#)
[Browse by Target](#)
[Company](#)
[Corporate site](#)
[Investor relations](#)
[Company news](#)
[Careers](#)
[About us](#)

Events

[Tradeshows](#)
[Conferences](#)

International websites

[abcam.cn](#)
[abcam.co.jp](#)

abcam

[Blog](#)



[Terms of sale](#) [Website terms of use](#) [Cookie policy](#) [Privacy policy](#) [Legal](#) [Modern slavery statement](#)

© 1998-2022 Abcam plc. All rights reserved.

One Step Competent Cell Preparation

2022年7月27日 19:19



D0301 一步
法感受态...



碧云天生物技术/Beyotime Biotechnology
订货热线: 400-168-3301或800-8283301
订货e-mail: order@beyotime.com
技术咨询: info@beyotime.com
网址: <http://www.beyotime.com>

一步法感受态细菌制备试剂盒

产品编号	产品名称	包装
D0301	一步法感受态细菌制备试剂盒	200次

产品简介:

- ▶ 碧云天生产的一步法感受态细菌制备试剂盒 (One Step Competent Cell Preparation Kit) 是一种用于大肠杆菌感受态细菌快速制备的试剂盒。一步法感受态细菌制备试剂盒是在经典的TSS法的基础上进行适当改良而成,既继承了TSS法的快速和简便,又在此基础上提高了感受态细菌的转化效率和易操作性。使用本试剂盒可以使感受态效率达到 10^6 以上。不仅可以转化质粒,而且可以转化普通的连接产物。另外,对细菌的培养条件要求比较宽松,培养的细菌只要处于对数期内就可以使用本试剂盒制备感受态细菌。
- ▶ 使用本试剂盒操作非常简单,细菌培养好后仅需十几分钟就可以完成感受态细菌的制备。
- ▶ 本试剂盒适用于绝大部分常见的大肠杆菌,包括DH5 α 、JM109、TG1、HB101和XL-1等。对于一些用于蛋白表达或病毒质粒构建的特殊大肠杆菌也适用,制备出来的感受态菌转化质粒肯定没有问题,但如果转化连接产物有时效果不如DH5 α 等其它常见的细菌。
- ▶ 本试剂盒提供了DH5 α 甘油菌作为菌种,可以用于制备感受态细菌。
- ▶ 本试剂盒可以分多次使用,共可以制备足够进行200-400次转化的感受态细菌。

包装清单:

产品编号	产品名称	包装
D0301-1	感受态制备试剂	10ml
D0301-2	DH5 α 甘油菌	200 μ l
—	说明书	1份

保存条件:

-20°C保存,一年有效。

注意事项:

- ▶ 需自行配制LB液体培养基和LB平板以用于细菌的培养和感受态效率的检测。
- ▶ 尽管经过我们的测试凡是处于对数期内的细菌都可以用于感受态细菌的制备,但如果细菌生长的OD₆₀₀的值达到0.3-0.5左右时,制备出来的感受态效果最佳。
- ▶ 在制备感受态细菌的过程中均使用不含抗生素的LB。在使用感受态菌的过程中热休克后的37°C培养时也必须使用无抗生素的LB,即便转入的质粒是有抗性的。
- ▶ 本产品仅限于专业人员的科学研究用,不得用于临床诊断或治疗,不得用于食品或药品,不得存放于普通住宅内。
- ▶ 为了您的安全和健康,请穿实验服并戴一次性手套操作。

使用说明:

1. 涂平板:

为取得最佳的感受态效率,必须先把甘油菌或其它形式保存的菌种涂LB平板,并培养过夜。

使用说明:

1. 涂平板:

为取得最佳的感受态效率, 必须先把甘油菌或其它形式保存的菌种涂LB平板, 并培养过夜。

2. 接种:

取一有新鲜培养的菌种的LB平板, 后续操作均在超净台内进行。把镊子的顶端在70%酒精中蘸一下, 并在酒精灯上略略烧一下, 使镊子的顶端处于无菌状态。用镊子夹取一个无菌的塑料枪头或牙签, 从平板上挑取一个单克隆, 然后把蘸有菌种的塑料枪头或牙签放到装有3毫升LB的细菌培养试管内。上述操作也可以使用接种环等进行操作。

3. 培养:

37°C约200rpm培养过夜, 通常培养时间控制在16小时左右为宜。绝对不宜超过18小时。

4. 再接种培养:

根据需要制备的感受态细菌的量, 按照1:100的比例用新鲜培养的过夜菌接种培养。例如取500微升的新鲜过夜菌到50毫升的LB中继续37°C约200rpm培养。通常在大约培养2-2.5小时后OD₆₀₀可以达到0.3-0.5。

5. 制备感受态细菌:

在培养的细菌OD₆₀₀达到0.3-0.5时, 4°C2000g离心5分钟收集细菌。如果离心沉淀前的菌量为50毫升, 按后续操作进行, 如果是其它体积则按比例换算后进行后续操作。用5毫升预冷的LB重新悬浮起细菌沉淀, 加入5毫升在冰浴或冰水浴上融解的感受态制备试剂, 混匀, 冰浴放置5分钟。然后再轻轻混匀, 根据实验需要适当分装到1.5毫升或0.5毫升的离心管内后-70°C

保存。

注: 如果以后会只做单管的转化, 可以分装成每管最少50微升或100微升, 如果以后一次性做多个转化, 可以每管分装500微升或更大体积。-70°C保存后, 感受态的效率会随时间的推移逐渐下降, 但通常在半年内使用转化效率下降不会太多。总的来说, 新鲜制备的感受态要比冻存的感受态转化效率更高一些。

6. 感受态细菌的使用:

a. 对于感受态细菌效率的测定或连接产物的转化(其它如基因突变产物的转化等参考连接产物进行):

- (a) 在冰上缓慢融解感受态细菌(对于新鲜制备的感受态就可以直接使用了), 如果检测感受态细菌的效率, 加入100pg-10ng质粒, 但质粒的体积不宜超过感受态细菌量的10%。如果转化连接产物, 每100微升感受态细菌加入10微升连接产物。
- (b) 轻轻用手指弹动离心管, 以混匀细菌和质粒或连接产物。冰浴或冰水浴放置30分钟。
- (c) 42°C水浴, 热休克2分钟。
- (d) 热休克后立即置于冰水浴中, 2分钟。
- (e) 加入900微升LB, 37°C200rpm培养1小时。
- (f) 如果检测感受态效率, 取100微升涂布到含有相应抗生素的LB平板上。如果转化的是连接产物, 2000-3000g离心1分钟或更长时间使细菌充分沉淀下来。去除约900-950微升LB培养液。细菌沉淀用余下的LB培养液重悬, 然后全部涂布到含有适当抗生素的LB平板上。37°C培养过夜。

b. 对于质粒的转化:

- (a) 融解感受态细菌, 加入不少于50ng质粒到50或100微升感受态细菌中。质粒的量可以是1微克或更多, 但体积不宜超过感受态细菌量的10%。
- (b) 轻轻用手指弹动离心管, 以混匀细菌和质粒。冰浴或冰水浴放置10分钟。
- (c) 取全部菌液直接涂布到含有适当抗生素的LB平板上, 37°C培养过夜。

Version 2016.11.11

2 / 2 **D0301 一步法感受态细菌制备试剂盒**

400-1683301/800-8283301 碧云天/Beyotime

2022年8月16日 12:26



产品编号	产品名称	包装
D0007S	质粒小量抽提试剂盒(通用型)	50次
D0007M	质粒小量抽提试剂盒(通用型)	200次

- 碧云天的质粒小量抽提试剂盒(通用型) (Plasmid Mini Preparation Kit for All Purpose, Plasmid Miniprep Kit for All Purpose)是一种用于从大肠杆菌中进行小量质粒快速抽提的通用型离心柱式试剂盒。
- 本试剂盒不仅适用于常用的 *EndA* 菌株 DH5A、JM109 和 XL1 blue 等，也适用于 *EndA* 菌株如 JM110、BL21(DE3)、TGI 和 HB101 等，能有效避免 *EndA* 菌株中高丰度核酸酶的污染，并适用于从糖类修饰水平高的野生菌株中提取质粒。
- 野生型大肠杆菌中表达 *Endonuclease I*，能切割并降解双链 DNA。编码 *Endonuclease I* 的基因是 *endA*，如果 *endA* 突变失活，其基因型会被标注为 *endA1*，相应的突变菌株被称为 *EndA* 菌株，而野生型菌株则被称为 *EndA* 菌株。常见的 *EndA* 菌株和 *EndA* 菌株参见附表 1。为 *EndA* 菌株中抽提的质粒，微量核酸酶和质粒结合而容易被共纯化，导致容易降解，而本试剂盒增加了特殊的洗涤步骤(核酸酶洗涤液溶液 PB 洗涤)，可以有效避免 *EndA* 菌株中抽提获得的质粒容易降解的问题(参考图 1)。

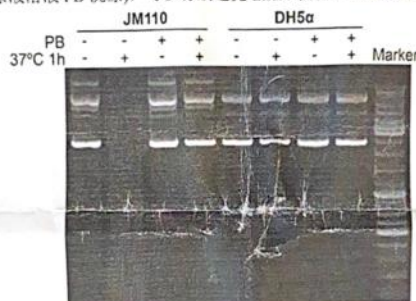


图 1. 使用溶液 PB 可以使从 EndA⁻菌株 JM110 中抽提的质粒不易降解, 而对于 EndA⁻菌株 DH5a 中抽提的质粒没有影响。使用本试剂盒时, 如上图所示, 在使用和不使用溶液 PB 时的质粒得率一致。但对于 EndA⁻菌株 JM110, 不使用溶液 PB 时从其中抽提获得的质粒在内切酶缓冲液 Buffer Y 中 37°C 孵育 1 小时后会全部降解, 而使用溶液 PB 时同样孵育 1 小时就不会降解。对于 EndA⁻菌株 DH5a 无论是否使用溶液 PB, 抽提获得的质粒的都很稳定。

- 本试剂盒采用了一种新型的离子交换柱。在特定条件下,使质粒能在离心过柱的瞬间,结合到质粒纯化柱上,在一定条件下又能将质粒充分洗脱,从而实现质粒的快速纯化。无需酚氯仿抽提,无需酒精沉淀,12个样品只需不足30分钟即可完成。每个质粒纯化柱可以结合的质粒量的上限约为20微克。每个纯化柱可用于抽提1.5毫升LB培养过致的大肠杆菌。抽提所得质粒的OD260和OD280比值一般在1.80左右。抽提获得的质粒量受质粒拷贝数等因素影响。抽提获得的质粒DNA的OD260和OD280比值也会因菌株不同等原因而略有波动。
- 本试剂盒抽提所得到的质粒可直接用于转染细菌, DNA测序, PCR, 基于PCR的突变, 体外转录, 转化细菌, 内切酶消化等。本试剂盒在使用溶液PB的情况下, 获得的质粒的纯度更高, 内毒素含量低, 总体上转染细胞的效率会显著提高。

产品编号	产品名称	包装
D0007S-1	溶液I (悬浮液)	15ml
D0007S-2	溶液II (裂解液)	15ml
D0007S-3	溶液III (结合液)	20ml
D0007S-4	溶液PB (核酸酶洗涤液)	30ml
D0007S-5	溶液IV (洗涤液)	18ml (第一次使用前加入27ml无水乙醇)
D0007S-6	溶液V (洗脱液)	3ml
D0007S-7	RNase A (100mg/ml)	15μl
D0007S-8	小抽质粒纯化柱及废液收集管	50套

产品编号	产品名称	包装
D0007S-6	溶液V (洗脱液)	3ml
D0007S-7	RNase A (100mg/ml)	15μl
D0007S-8	小抽质粒纯化柱及废液收集管	50套
—	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
D0007M-1	溶液I (悬浮液)	55ml
D0007M-2	溶液II (裂解液)	55ml
D0007M-3	溶液III (结合液)	80ml
D0007M-4	溶液PB (核酸酶洗涤液)	110ml
D0007M-5	溶液IV (洗涤液)	36ml×2 (第一次使用前每瓶加入54ml无水乙醇)
D0007M-6	溶液V (洗脱液)	12ml
D0007M-7	RNase A (100mg/ml)	55μl
D0007M-8	小抽质粒纯化柱及废液收集管	200套
—	说明书	1份

保存条件:

室温保存, 一年有效。

注意事项:

- 第一次使用前把试剂盒提供的RNase A全部加到溶液I (悬浮液)中, 混匀, 并在瓶上做好标记。加入RNase A后4°C存放。
- 第一次使用前请根据说明书和瓶上的标示, 在溶液IV (洗涤液)中加入相应体积的无水乙醇, 混匀, 并在瓶上做好标记。
- 温度较低时, 溶液II和溶液III可能会有沉淀产生。使用前必须检查一遍。如有沉淀, 37°C水浴加热溶解, 混匀后使用。溶液II请勿过分剧烈混匀, 否则会产生大量气泡。
- 溶液II使用完后, 一定要盖紧瓶盖, 防止被空气中二氧化碳酸化。
- 溶液II有强碱性, 溶液II、溶液III、溶液PB和溶液IV对人体有刺激性, 操作时请小心, 并注意适当防护以避免直接接触人体或吸入体内。
- 本试剂盒所有操作均在室温进行, 操作时无需冰浴, 所有离心也均在室温进行。
- 废液收集管在一次抽提中需多次使用, 切勿中途丢弃。
- 本产品仅限于专业人员的科学研究用, 不得用于临床诊断或治疗, 不得用于食品或药品, 不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

使用说明:

1. 取过夜菌1.5毫升, 5000g离心1分钟收集细菌沉淀, 弃上清, 再重复一次, 每管共收集3毫升过夜菌沉淀。
通常大肠杆菌宜用LB培养过夜(16小时左右)至OD值为2-4。建议5000g(通常为5000rpm左右)室温离心1分钟, 如沉淀不充分则适当延长离心时间。时间过长或离心速度过快会使沉淀过于紧密, 不利于加入溶液I后散开沉淀。直接倒掉上清, 再倒入约1.5毫升菌液并重复上述操作, 然后倒置于吸水纸上(可用普通草纸), 使液体流尽。如果细菌密度明显偏低, 可考虑使用更多菌液, 再重复上述操作1-2次。对于高拷贝质粒所用菌量一般不能超过5毫升, 对于低拷贝质粒所用菌量一般不能超过10毫升。过量的细菌会导致后续的裂解不充分。
2. 每管加入250微升溶液I, 重悬细菌沉淀。确保沉淀完全散开, 无可见细菌团块。
确认溶液I中已经添加了RNase A。最高速度vortex 5-10秒或更长时间, 悬起沉淀。一定要充分混匀, 对着光亮处观察应呈均匀的悬浊液, 无明显细菌团块或絮块。如果没有vortex, 可以用枪吹打沉淀使沉淀逐渐散开或用手指把沉淀弹开。
3. 每管加入250微升溶液II, 轻轻颠倒离心管4-6次, 使细菌完全裂解, 溶液透明。
切勿vortex! vortex或其它剧烈操作会导致基因组DNA断裂, 易导致最终所得质粒被基因组DNA污染。颠倒4-6次后, 溶液应变得透明, 无团块或絮状物。如果加入溶液I后细菌没有完全散开, 那么颠倒4-6次后, 可能还会有团块或絮状物。遇到有少量团块或絮状物产生的情况, 可以增加颠倒次数3-5次, 再室温放置2-3分钟, 但总裂解时间不可超过5分钟。
4. 每管加入350微升溶液III, 随即颠倒离心管4-6次混匀, 可见白色絮状物产生。
切勿vortex! 颠倒次数也不宜过多, 否则易导致最终所得质粒的质量下降。
5. 最高速(13,000rpm左右)室温离心10分钟。
离心后会产生白色沉淀。离心时准备好下一步需使用的质粒纯化柱, 废液收集管, 并在纯化柱上做好标记。
6. 将上一步骤离心后的上清倒入或吸入到质粒纯化柱内。最高速离心30-60秒, 倒弃收集管内液体。

切勿vortex! 颠倒次数也不宜过多, 否则易导致最终所得质粒的质量下降。

5. 最高速(13,000rpm左右)室温离心10分钟。

离心后会产生白色沉淀。离心时准备好下一步需使用的质粒纯化柱, 废液收集管, 并在纯化柱上做好标记。

6. 将上一步骤离心后的上清倒入或吸入到质粒纯化柱内。最高速离心30-60秒, 倒弃收集管内液体。

质粒倒入质粒纯化柱后, 可以不用等待, 直接离心。倒弃收集管内的液体后, 保留收集管继续使用。

7. (可选做)在质粒纯化柱内加入 500 微升溶液 PB, 最高速离心 30-60 秒, 洗去核酸酶污染等杂质, 倒弃收集管内液体。

本步骤对于从EndA⁻菌株如JM110、BL21(DE3)、TG1和HB101等中提取质粒并去除核酸酶污染是必须的, 对于从其它任何具有较高核酸酶表达水平和糖类修饰水平的菌株中提取质粒也是非常必须的。参考图1, 对于一些常用的EndA⁻菌株如DH5α和XL-1 blue等如果后续仅用于酶切、PCR、反转录等常规分子生物学操作, 并不需要本步骤。如果抽提获得的质粒用于细胞转染, 宜增加本步骤。

8. 在质粒纯化柱内加入750微升溶液IV, 最高速离心30-60秒, 洗去杂质, 倒弃收集管内液体。

加入溶液IV后可以不用等待, 直接离心。倒弃收集管内的液体后, 保留收集管继续使用。

9. 再最高速离心1分钟, 除去残留液体并使痕量乙醇完全挥发。

注意: 倒弃收集管内液体后再离心, 才能彻底去除微量的溶液IV。微量的溶液IV会影响质粒的质量。

2 / 3 D0007 质粒小量抽提试剂盒(通用型)

400-1683301/800-8283301 碧云天/Beyotime

10. 将质粒纯化柱置于洁净1.5毫升离心管上, 加入50微升溶液V至管内柱面上, 放置1分钟。

溶液V需要直接加至管内柱面中央, 使液体被纯化柱吸收。如果不慎将溶液V沾在管壁上, 一定要震动离心管, 使液体滑落到管底, 以便被纯化柱吸收。也可以用重蒸水或 Milli-Q级纯水替代溶液V, 但是水的pH应不小于6.5。溶液V加入后放置时间稍长, 对于增加质粒产量会略有帮助。如想得到较高浓度的质粒, 可以加入35微升溶液V洗脱。

11. 最高速离心1分钟, 所得液体即为高纯度质粒。

通常所得质粒浓度为0.1-0.3mg/ml左右。如果想得到高浓度的质粒, 可以采用常规的乙醇沉淀方法浓缩质粒。

附表1. EndA⁻ and EndA⁺ strains of *E. coli*.

EndA ⁻	EndA ⁺
BJ5183	BL21 (DE3)
DH1	CJ236
DH20	HB101
DH21	JM101
DH5α	JM110
JM103	LE392
JM105	MC1061
JM106	NM522 (all NM series are EndA ⁺)
JM107	NM554
JM108	P2392
JM109	PR700 (all PR series are EndA ⁺)
MM294	Q358
SK1590	RR1
SK1592	TB1
SK2267	TG1
SRB	Y1088 (all Y10 series are EndA ⁺)
TOP10	BMH 71-18
XL1-Blue	ES1301
XLO	

相关产品:

产品编号	产品名称	包装
D0003	质粒小量抽提试剂盒	200次
D0005	质粒小量抽提试剂盒	50次

18 / 00:

产品编号	产品名称	包装
D0003	质粒小量抽提试剂盒	200次
D0005	质粒小量抽提试剂盒	50次
D0007S	质粒小量抽提试剂盒(通用型)	50次
D0007M	质粒小量抽提试剂盒(通用型)	200次
D0018	质粒中量抽提试剂盒	50次
D0020	质粒中量抽提试剂盒(通用型)	50次
D0026	质粒大量抽提试剂盒	20次
D0028	质粒大量抽提试剂盒(通用型)	20次

Version 2017.04.25

碧云天/Beyotime 400-1683301/800-8283301

D0007 质粒小量抽提试剂盒(通用型) 3 / 3

Double Digestion

2022年8月16日 16:22

[NEB Enzyme Digestion Protocol](#)

Step 1: make a 50uL reaction system in 1.5 mL microcentrifuge tube (prepare this *on ice*)

**add enzymes at last!*

- Enzyme 1: 1uL
- Enzyme 2: 1uL
- rCutSmart (NEB): 5uL
- DNA: 1ug (measured by Nanodrop in IB3079)
- Add ddH₂O to make the reaction system 50 uL in total

Mix well by pipetting up and down, then **spin down** the solution by tabletop microcentrifuge

Step 2: incubate on 37°C dry bath for 60 min (overnight if digesting PCR product)

Step 3: heat inactivation: incubate the solution at [recommended temperature](#) for 20 min

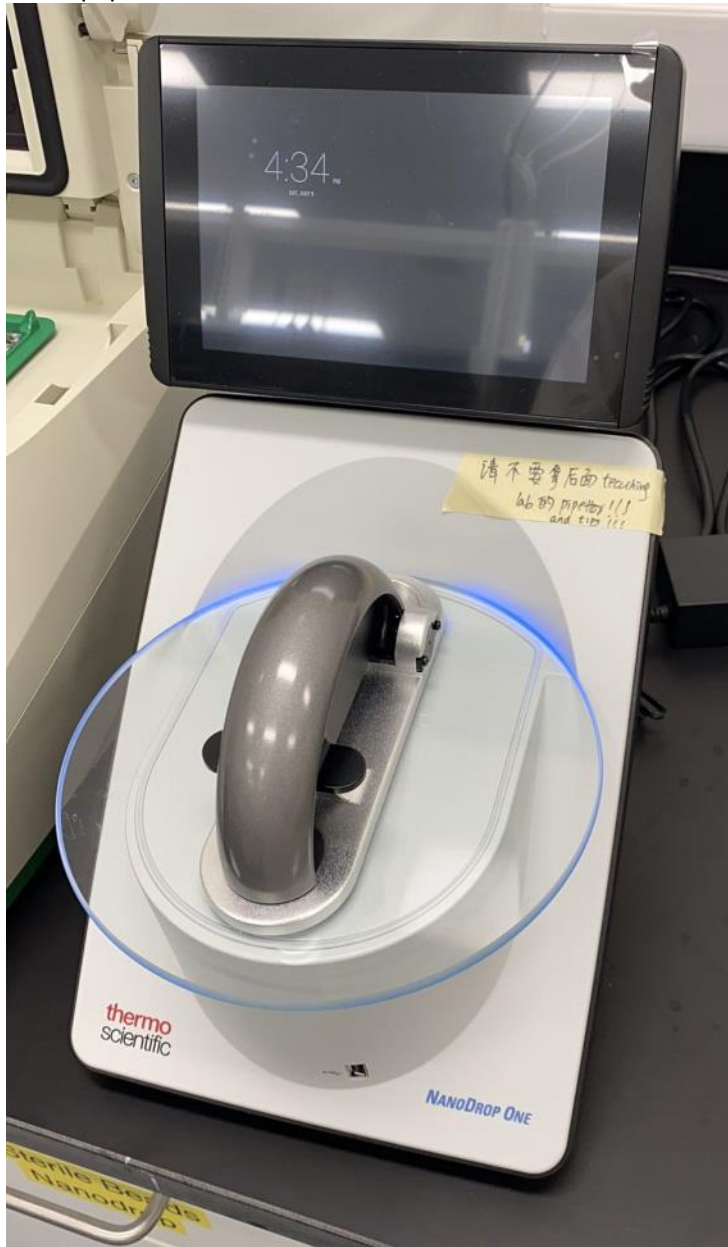
- BamHI: cannot be inactivated by heat, if inactivation is needed, please run it in gel and extract

Step 4: run an agarose gel electrophoresis to visualize the result

Nanodrop One

2022年8月16日 23:40

The equipment is in IB 3079 and it looks like this:



[Official Webpage](#)

Choose your sample type (e.g., dsDNA)

Step 1: Blanking

- Use 75% ethanol to clean both pedestals
- Add 1-2 μL buffer to the lower pedestal
 - Buffer: the buffer you used to dissolve your sample, e.g., the elution buffer for DNA extraction
- Click 'Blank'

Step 2: Measure the concentration of the sample(s)

- Use 75% ethanol to clean both pedestals
- Add 1-2 uL sample to the lower pedestal
- Click 'Measure'
- Record your data

**if multiple samples are present, only one blank is needed.*

**remember to clean both pedestals every time you load a new sample*

Step 3: Clean-up

- Use 75% ethanol to clean both pedestals

Gel Electrophoresis

2022年8月22日 14:16

1xTAE buffer

Gel (1%): 0.5g agarose + 50mL 1xTAE + 5uL Adamas Life Gel Red Nucleic Acid Stain (10000x)

Ladder: 5uL

Sample: 5:1 sample:loading dye mixture, 15uL

Run at 120V/appropriate current level

Gel Purification

2022年8月22日 15:57

[Beyotime Gel Extraction Kit](#)
[Addgene protocol for gel purification](#)

1. Run agarose gel
2. Cut the gel of the target band under blue light using a sterilized razor.
3. Move the gel into a sterilized 1.5mL tube using a sterilized tweezer.
4. Weigh the gel (x mg), cut it up into small pieces.
5. Add x uL solution I, mix by inverting or vortex.
6. 50-60°C dry bath for 10 mins (invert/vortex the mixture for 3-4 times) until the gel is fully melted.
After melted, dry bath for another 2 minutes.
7. Transfer the solution into purification columns and let it stand at RT for 1 min.
8. Centrifuge at 12000-14000 rpm (16000g) for 1 min, discard the flow-through.
9. Add 700 uL solution 2 into purification columns, let it stand at RT for 1 min.
10. Centrifuge at 12000-14000 rpm (16000g) for 1 min, discard the flow-through.
11. Add 500 uL solution 2 into purification columns.
12. Centrifuge at 12000-14000 rpm (16000g) for 1 min, discard the flow-through.
13. Again, centrifuge at 12000-14000 rpm (16000g) for 1 min, discard the flow-through.
14. Put columns on 1.5 mL centrifuge tubes, add 30 uL solution III, let it stand at RT for 1 min (for higher concentration, add 20 uL solution III and let it stand for 3-5 mins).
15. Centrifuge at 12000-14000 rpm (16000g) for 1 min. Collect the liquid.
16. Again, run gel electrophoresis for a small aliquot to confirm the results.

Transformation

2022年9月2日 13:00

From Jiani

1. 100 uL competent cells + 10uL plasmid, put it on ice for 10 min
2. 42 °C heat shock for 45s
3. Put in on ice, rest for 3-5 min
4. Add 1 mL LB, recover (200rpm, 37°C) for
 - a. Amp: immediately, or 20 min
 - b. Kan: 1 hr
 - c. Or overnight
5. Coat plate
 - a. 5mL LB (with antibiotics) + 50uL suspension culture
 - b. Centrifuge at 4000 rpm for 2 min, remove supernatant, resuspend, 50uL coat plateOr directly take 50uL to coat plate

产品简介

本试剂盒采用碱裂解法裂解细胞，再通过离心吸附柱在高盐状态下特异性地结合溶液中的DNA。离心吸附柱中采用的硅基质材料为本公司新型材料，高效、专一吸附DNA。以下操作步骤适用于提取1-5 ml过夜培养的大肠杆菌，质粒提取得率和质量与宿主菌的种类和培养条件，细胞的裂解，质粒拷贝数，质粒的稳定性，抗生素等因素有关。

使用本试剂盒提取的质粒DNA适用于各种常规操作，包括酶切、PCR、测序、连接、转化、文库筛选、体外翻译、转染一些常规的传代细胞等。

提取得率

质粒类型	菌液量	得率	质粒
低拷贝	1-5 ml	3-12 µg	pBR322, pACYC及其衍生载体 pSC101及其衍生载体, SuperCos, pWE15
高拷贝	1-5 ml	6-30 µg	pTZ, pUC, pBS, pGM-T

注意事项 请务必在使用本试剂盒之前阅读此注意事项。

1. 溶液P1在使用前加入RNase A (将试剂盒中提供的RNase A全部加入)，混匀，置于2-8℃保存。
2. 使用前请先检查平衡液BL、溶液P2和P3是否出现浑浊，如有混浊现象，可在37℃水浴中加热几分钟，即可恢复澄清。
3. 注意不要直接接触溶液P2和P3，使用后应立即盖紧盖子。
4. 所有离心步骤均为使用常规台式离心机室温下进行离心，速度为12,000 rpm(~13,400×g)。
5. 提取的质粒量与细菌培养浓度、质粒拷贝数等因素有关。
6. 实验前使用平衡液BL处理过的柱子最好当天使用，放置时间过长会影响效果。
7. 用平衡液BL处理过的柱子最好当天使用，放置时间过长会影响效果。
8. 去蛋白液PD可以有效去除残留的蛋白污染，当宿主菌为endA⁻ (TG1、BL21、HB101、ET12567、JM系列)等核酸酶含量较高的菌株时，强烈推荐使用去蛋白液PD。

操作步骤

使用前请先在漂洗液PW中加入无水乙醇，加入体积请参照瓶上的标签。

1. 柱平衡步骤：向吸附柱CP3中 (吸附柱放入收集管中) 加入500 µl的平衡液BL，12,000 rpm (~13,400×g) 离心1 min，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。 (请使用当天处理过的柱子)
2. 取1-5 ml过夜培养的菌液，加入离心管中，使用常规台式离心机，12,000 rpm (~13,400×g) 离心1 min，尽量吸除上清 (菌液较多时可以通过多次离心将菌体沉淀收集到一个离心管中)。
3. 向留有菌体沉淀的离心管中加入250 µl溶液P1 (请先检查是否已加入RNase A)，使用移液器或涡旋振荡器彻底悬浮细菌沉淀。
注意：如果有未彻底混匀的菌块，会影响裂解，导致提取量和纯度偏低。
4. 向离心管中加入250 µl溶液P2，温和地上下翻转6-8次使菌体充分裂解。
注意：温和地混合，不要剧烈震荡，以免打断基因组DNA，造成提取的质粒中混有基因组DNA片段。此时菌液应变得明亮粘稠，所用时间不应超过5 min，以免质粒受到破坏。如果未变得明亮，可能由于菌体过多，裂解不彻底，应减少菌体量。
5. 向离心管中加入350 µl溶液P3，立即温和地上下翻转6-8次，充分混匀，此时将出现白色絮状沉淀。12,000 rpm (~13,400×g)离心10 min。
注意：P3加入后应立即混合，避免产生局部沉淀。如果上清中还有微小白色沉淀，可再次离心后取上清。
6. 将上一步收集的上清液用移液器转移到吸附柱CP3中 (吸附柱放入收集管中)，注意尽量不要吸出沉淀。12,000 rpm (~13,400×g)离心30-60 sec，倒掉收集管中的废液，将吸附柱CP3放入收集管中。
7. 可选步骤：向吸附柱CP3中加入500 µl去蛋白液PD，12,000 rpm (~13,400×g)离心30-60 sec，倒掉收集管中的废液，将吸附柱CP3重新放回收集管中。
如果宿主菌是end A⁻宿主菌 (TG1, BL21, HB101, JM系列, ET12567等)，这些宿主菌含有大量的核酸酶，易降解质粒DNA，推荐采用此步。
如果宿主菌是end A⁺宿主菌 (DH5a, TOP10等)，这步可省略。



TIANGEN 官方微信，专业服务助力科研：

- 可视化操作指南
- 技术公开课合辑
- 全线产品查询
- 在线专家客服
- 微信直播课堂
- 最新优惠活动



Order: 010-59822688
Toll-free: 800-990-6057 / 400-810-6057
TIANGEN BIOTECH (BEIJING) CO., LTD

版本号: DP201101X

8. 向吸附柱CP3中加入600 μ l漂洗液PW (请先检查是否已加入无水乙醇)，12,000 rpm (~13,400 \times g)离心30-60 sec，倒掉收集管中的废液，将吸附柱CP3放入收集管中。

9. 重复操作步骤8。

10. 将吸附柱CP3放入收集管中，12,000 rpm (~13,400 \times g)离心2 min，目的是将吸附柱中残余的漂洗液去除。

注意：漂洗液中乙醇的残留会影响后续的酶反应（酶切、PCR等）实验。为确保下游实验不受残留乙醇的影响，建议将吸附柱CP3开盖，置于室温放置数分钟，以彻底晾干吸附材料中残余的漂洗液。

11. 将吸附柱CP3置于一个干净的离心管中，向吸附膜的中间部位滴加50-100 μ l洗脱缓冲液EB，室温放置2 min，12,000 rpm (~13,400 \times g)离心2 min将质粒溶液收集到离心管中。

注意：洗脱缓冲液体积不应少于50 μ l，体积过小影响回收效率。洗脱液的pH值对于洗脱效率有很大影响。若后续做测序，需使用ddH₂O做洗脱液，并保证其pH值在7.0-8.5范围内，pH值低于7.0会降低洗脱效率。且DNA产物应保存在-20 $^{\circ}$ C，以防DNA降解。为了增加质粒的回收率，可将得到的溶液重新加入吸附柱中，室温放置2 min，12,000 rpm (~13,400 \times g)离心2 min，将质粒溶液收集到离心管中。

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P1、P2、P3的用量，洗脱缓冲液EB应在65-70 $^{\circ}$ C水浴预热，在吸附和洗脱时可以适当的延长时间，以增加提取效率。其它步骤相同。

TIANprep Mini Plasmid Kit

质粒小提试剂盒

(离心柱型)

目录号：DP103

产品内容

产品组成	DP103-02 (50 preps)	DP103-03 (200 preps)
平衡液BL (Buffer BL)	30 ml	120 ml
溶液P1 (Buffer P1)	15 ml	60 ml
溶液P2 (Buffer P2)	15 ml	60 ml
溶液P3 (Buffer P3)	20 ml	80 ml
去蛋白液PD (Buffer PD)	30 ml	120ml
漂洗液PW (Buffer PW)	15 ml	50 ml
洗脱缓冲液EB (Buffer EB)	15 ml	30 ml
RNase A (10 mg/ml)	150 μ l	600 μ l
吸附柱CP3 (Spin Columns CP3)	50个	200个
收集管(2 ml) (Collection Tubes 2 ml)	50个	200个

储存条件

该试剂盒置于室温(15-25 $^{\circ}$ C)干燥条件下，可保存12个月，更长时间的保存可置于2-8 $^{\circ}$ C。2-8 $^{\circ}$ C保存条件下，若溶液产生沉淀，使用前应将试剂盒内的溶液在室温放置一段时间，必要时可在37 $^{\circ}$ C水浴中预热10 min，以溶解沉淀。第一次使用前将RNase A加入溶液P1中，混匀后置于2-8 $^{\circ}$ C保存，可稳定保存12个月以上。单独包装的RNase A在室温可稳定保存12个月以上。

本产品仅供科研使用。请勿用于医药、临床治疗、食品及化妆品等用途。

LB Medium (Agar Plates)

2022年9月5日 16:04

1000mL MilliQ + 25g LB broth + 15g Agar

Mix well

Sterilize at 120°C for 0.5 hour

Cool down to ~55°C, add antibiotics (e.g., Kan/Amp) to final concentration 10-50mg/L, make agar plates in PCR hood

1L LB ~ 10mg Amp

1mL LB ~ 10ug Amp

5mL LB ~ 50ug Amp -> 100ug/uL stock solution * 0.5uL

500mL LB ~ 5000ug Amp -> 100ug/uL stock solution * 50uL

For liquid medium: 1000mL MilliQ + 25g LB broth

T4 DNA Ligase

2022年9月9日 12:43

使用说明：

1. PCR产物或酶切片段和普通载体的连接：

1. 取1-2μg载体酶切过夜，或至少酶切3-5小时以上。尽量确保酶切充分，否则后续会导致产生很多自连的克隆。
2. 载体酶切完毕后，可以使用试剂盒进行纯化，例如碧云天的[PCR纯化试剂盒/DNA纯化试剂盒\(D0033\)](#)。也可以采用常规的酚氯仿抽提乙醇沉淀方法纯化载体。对于酶切产生较大片段(大于50-60bp)的情况推荐采用切胶回收的方式。
3. 对于PCR产物：PCR产物凝胶电泳后，切胶回收预期大小的DNA片段。凝胶中DNA片段的回收可以使用试剂盒进行操作，例如碧云天的[DNA凝胶回收试剂盒\(D0056\)](#)。也可以采用反复冻融等方法回收DNA片段。
4. 对于回收的PCR产物或其它需酶切的质粒或DNA片段，用适当内切酶酶切，随后纯化酶切产物。

注：这一步的酶切不必酶切特别充分，通常酶切效率能达到80-90%以上即可。即本步骤的酶切通常酶切1-2小时即可。酶切产物可以使用试剂盒进行纯化，例如碧云天的[PCR纯化试剂盒/DNA纯化试剂盒\(D0033\)](#)。也可以采用常规的酚氯仿抽提乙醇沉淀方法纯化载体。

5. 取约25-100ng经过酶切和纯化的载体，加入3倍摩尔数的待插入片段。参考下表设置连接反应体系。

注1：很多时候由于载体量和待插入片段的量都比较少，在回收后很难定量。此时可根据回收前电泳条带的亮度进行大致的估计。通常以DNA分子量标准的某一条带为参考，估计或通过灰度半定量您的目的条带和该参考条带的亮度的比例关系。然后再按照预计的纯化或凝胶回收时的得率计算出最终得到的载体量和待插入片段量的比例关系。

注2：通常每个反应使用0.2-0.5μl连接酶已经足够，如果希望进一步提高连接效率，可以把连接酶的用量提高至1μl。

载体	约50-100ng
待插入片段	约载体摩尔数的3倍
10X Ligation Buffer	2μl
双蒸水或Milli-Q水	至20μl
T4 DNA ligase	0.2-0.5μl
总体积	20μl

1. 用移液器轻轻吹打混匀或轻微Vortex混匀，室温离心数秒，使液体聚于管底。
2. 20-25℃孵育连接1-2小时，**或16℃孵育连接过夜。<-这个效率最高，以后都过夜连好了**

注1：对于双平端连接必须连接过夜。对于双平端连接，直接使用T4 DNA Ligase连接效率较低，推荐使用碧云天的快速DNA连接试剂盒(D7002或D7003)。

注2：为快速获得预期克隆可以参考如下方法：对于20μl的粘端连接反应，在连接1-2小时后可以取10μl直接转化大肠杆菌，其余10μl可以16℃孵育连接过夜。如果第二天顺利获得克隆，即可进入下一步实验；如果第二天转化的大肠杆菌未获得预期的克隆，则可以取连接过夜的剩余连接产物再次转化大肠杆菌。

3. 随后即可直接取连接产物用于转化感受态细菌。

2. PCR产物和T载体的连接：

- a. PCR产物凝胶电泳后，切胶回收预期大小的DNA片段。凝胶中DNA片段的回收可以使用试剂盒进行操作，例如碧云天的[DNA凝胶回收试剂盒\(D0056\)](#)。也可以采用反复冻融等方法回收DNA片段。
- b. 按照T载体的说明书取适量T载体，加入3倍摩尔数的待插入片段。参考下表设置连接反应体系。

注1：很多时候由于载体量和PCR产物的量都比较少，在回收后很难定量。此时可以根据回收前电泳条带的亮度进行大致的估计。通常以DNA分子量标准的某一条带为参考，估计或通过灰度半定量您的目的条带和该参考条带的亮度的比例关系。然后再按照预计的纯化或凝

胶回收时的得率计算出最终得到的载体量和PCR产物的量的比例关系。

注2: 通常每个反应使用0.2-0.5 μ l连接酶已经足够, 如果希望进一步提高连接效率, 可以把连接酶的用量提高至1 μ l。

T载体	适量
待插入片段	约载体摩尔数的3倍
10X Ligation Buffer	2 μ l
双蒸水或Milli-Q水	至20 μ l
T4 DNA ligase	0.2-0.5 μ l
总体积	约20 μ l

c. 用移液器轻轻吹打混匀或轻微Vortex混匀, 室温离心数秒, 使液体积聚于管底。

d. 20-25 $^{\circ}$ C孵育连接1-2小时, 或16 $^{\circ}$ C孵育连接过夜。注: 为快速获得预期克隆可以参考如下方法: 对于20 μ l的粘端连接反应, 在连接1-2小时后可以取10 μ l直接转化大肠杆菌, 其余10 μ l可以16 $^{\circ}$ C孵育连接过夜。如果第二天顺利获得克隆, 即可进入下一步实验; 如果第二天转化的大肠杆菌未获得预期的克隆, 则可以取连接过夜的剩余连接产物再次转化大肠杆菌。

e. 随后即可直接取连接产物用于转化感受态细菌。

3. Linker或RNAi片段和载体的连接:

a. 载体的酶切和纯化同步步骤1a和1b。

b. Linker或RNAi片段的退火可以选择适当的DNA退火缓冲液, 例如碧云天的

[Annealing Buffer for DNA Oligos\(5X\)\(D0251\)](#), 进行退火反应。

c. 长度大于8bp的Linker或退火的RNAi片段, 可以按照5:1至10:1的比例和载体进行连接反应。例如载体为0.03pmol, 则插入片段可以为0.15至0.3pmol。长度小于8bp的linker, 比例需调整为10:1以上。

d. 除插入片段的用量外, 随后按照步骤1e-1h进行。

4. DNA自身环化的连接:

参考步骤1e, 待插入片段换成适量的水即可。其余步骤按照步骤1f-1h进行。

5. 其它类型的DNA片段连接参考上述方法进行。

常见问题:

1. 连接反应后转化效率很低或阳性克隆非常少:

a. 可能感受态细菌转化效率太低, 用质粒作为阳性对照同时检测感受态的转化效率。

b. 可以尝试提高载体或插入片段的纯度。对于平端连接需注意适当延长连接时间。

c. 可能载体酶切不够充分, 用未经连接的载体转化作为阴性对照。

d. 用存放DNA的溶液进行转化, 作为阴性对照, 检测感受态细菌是否存在问题。

PCR

2022年9月14日 16:41

TIANGEN 2x Taq Master Mix

[Protocol](#)

25uL reaction system

- 95°C for 3 min
- 98°C for 20 sec -
- (Tm-5)°C for 15 sec | *35
- 72°C for 15 sec -
- 72°C for 15 sec
- 4°C hold