

# 高纯度质粒小提试剂盒

修改日期: 2020.06.16

Cat Number: KGA1550/KGA15100/KGA15200

Store at RT/-20°C for 24 months

For Research Use Only (科研专用)

## 一、试剂盒说明

凯基质粒小提试剂盒是将硅胶薄膜的优点与经典的强碱-SDS 裂解细菌细胞法结合起来, 可在 30 min 获取高质量的质粒 DNA, 利用特制的纯化柱简化了结合、洗涤和洗脱步骤, 可同时处理多个样品。纯化质粒为高纯度级别, 适合于酶切、PCR、测序、转化、体外转录等要求。

## 二、试剂盒组分

组分	KGA1550 50 assays	KGA15100 100 assays	KGA15200 200 assays	保存温度
RNase A	160 $\mu$ L	320 $\mu$ L	640 $\mu$ L	-20°C, 长期保存
Solution I	15 mL	30 mL	60 mL	25°C, 长期保存
Solution II	15 mL	30 mL	60 mL	25°C, 长期保存
Solution III	20 mL	40 mL	80 mL	25°C, 长期保存
Buffer PS	25 mL	45 mL	90 mL	25°C, 长期保存
Washing buffer	20 mL	40 mL	80 mL	25°C, 长期保存
TE	10 mL	20 mL	20 mL	25°C, 长期保存
离心吸附柱	50 个	100 个	200 个	25°C, 长期保存

## 三、操作步骤

使用前请先在 Washing buffer 加入 3 倍体积的无水乙醇, 加入体积请参照瓶上的标签。溶液 Solution I 在使用前先加入 RNase A (将试剂盒中提供的 RNaseA 全部加入), 混匀, 置于 4°C 保存。如非指明, 所有离心步骤均为使用台式离心机在室温下离心。

1. 接种新鲜的单个菌落到 LB 培养基 (含适量抗生素), 37°C 震荡培养 14-16 小时。收集菌液, 13000 rpm 离心 1min, 尽量吸除上清。

注意: 残留的液体培养基容易导致菌液裂解不充分, 第 5 步离心后沉淀较松, 不能有效吸取上清。

2. 向留有菌体沉淀的离心管中加入 250 $\mu$ L Solution I (确保已加入 RNaseA), 使用移液器或涡旋振荡器彻底悬浮细菌细胞沉淀。注意: 如果菌块未彻底混匀, 会影响菌体裂解, 导致质粒提取量和纯度偏低。

3. 向离心管中加入 250 $\mu$ L Solution II, 温和地上下翻转多次使菌体充分裂解至溶液粘稠而澄清。

注意: 混匀一定要温和, 以免污染细菌基因组 DNA, 此时菌液应变得清亮粘稠, 作用时间不要超过 5 min, 以免质粒受到破坏。

4. 向离心管中加入 350 $\mu$ L Solution III, 立即温和地上下翻转多次, 充分混匀, 此时会出现白色絮状沉淀。

5. 13000 rpm 离心 10 min, 用移液器小心地将上清转移到干净离心管中, 尽量不要吸出沉淀。(若上清中还有白色沉淀, 可再次离心后取上清)

6. 向离心管中加入 420 $\mu$ L Buffer PS, 温和翻转数次使溶液混匀, 将混合溶液转到吸附柱中, 13000 rpm 离心 1 分钟, 倒掉收集管中的废液。

7. 向离心吸附柱中加入 700 $\mu$ L Washing buffer (使用前请先检查是否已加入无水乙醇), 13000 rpm 离心 1 分钟, 弃废液, 将吸附柱放入收集管中。重复此步骤一次。

8. 将离心吸附柱放回高速离心机中, 13000 rpm 离心 2 分钟, 以彻底去除残留的乙醇, 室温放置 2-5 min。

9. 将吸附柱放入一个干净的离心管中, 向吸附膜中央悬空滴加入 50-80 $\mu$ L TE, 室温放置 2-5 min, 13000 rpm 离心 1min。-20°C 保存。

注意：为了增加质粒的回收效率，可将得到的洗脱液重新加入吸附柱中，室温放置 2min，13000 rpm 离心 1min。

#### 四、注意事项

1. 使用前请先检查溶液 Solution II、Solution III 是否出现混浊，如有混浊现象可在 37℃水浴中加热几分钟，待溶液恢复澄清后再使用。
2. Solution I 使用前将 RNase A 全部加入，然后置于 4℃保存；Washing buffer 使用前加入 60 mL 无水乙醇。
3. 洗脱缓冲液体积不应少于 50ul，体积过小影响回收效率；洗脱液的 pH 值对洗脱效率也有影响，若需要用水做洗脱液应保证其 pH 值在 8.0 左右；DNA 产物应保存在 -20℃，以防 DNA 降解。
4. 加入 Washing buffer 漂洗后，离心柱要尽量甩干，避免残余乙醇干扰后续实验。
5. 若菌体较多，可按比列适当增加 Solution I、Solution II、Solution III 的用量。