

# 凯基质粒大提试剂盒

说明书修改日期：20200706

**Cat Number: KGA1710**

**Store at RT/-20°C for 12 months**

**For Research Use Only**

## 一、产品简介

凯基质粒大提试剂盒是将硅胶薄膜的优点与经典的强碱-SDS 裂解细菌法结合，可在 1h 获取高质量的质粒 DNA。本试剂盒利用特制的纯化柱简化了结合、洗涤和洗脱步骤，可同时处理多种样品。获得的纯化质粒为高纯度级别，适用于酶切、PCR、测序及转化等要求。

## 二、产品组分

组分	10 assays	保存温度
RNase A	1.2 mL	-20°C，长期保存
Solution I	120 mL	25°C，长期保存
Solution II	120 mL	25°C，长期保存
Solution III	150 mL	25°C，长期保存
Buffer PS	190 mL	25°C，长期保存
Washing buffer	30 mL	25°C，长期保存
TE	20 mL	25°C，长期保存
离心吸附柱	10 个	25°C，长期保存

## 三、操作步骤

使用前请先在 Washing buffer 加入 90 mL 无水乙醇（10 assays），其余规格加入无水乙醇的体积请参照瓶身标签。Solution I 在使用前请将提供的全部 RNase A 加入，混匀，置于 4°C 保存。如非特别指明，所有离心步骤均在室温下操作。

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，10000 rpm 离心 3min，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 10 mL 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 10 mL Solution II, 温和地上下翻转 5-10 次室温放置 2-4min。

**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 14 mL Solution III, 温和地上下翻转 5-10 次, 室温放置 3-5min, 此时会出现白色絮状沉淀。

5. 12000 rpm 离心 15 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 18mL Buffer PS, 温和翻转数次使溶液混匀, 将混合溶液转到吸附柱中, 室温静置 3-5min, 8000rpm 离心 2min。倒掉收集管中的废液。

7. 向离心吸附柱中加入 5mL Washing buffer (使用前请先检查是否已加入无水乙醇), 室温放置 2min, 8000rpm 离心 2min, 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, 10000 rpm 离心 2 分钟, 以彻底去除残留的乙醇, 室温放置 10 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 1-1.5mL 预热至 60°的 TE, 室温放置 10 min, 10000 rpm 离心 2min。-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 30min, 10000 rpm 离心 2min。

#### 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°C 水浴中加热几分钟, 待溶液恢复澄清后再使用。

2. 洗脱缓冲液体积不应少于 1ml, 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°C, 以防 DNA 降解。

3. 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。