

超纯质粒小提试剂盒

说明书修订日期：2018.09.29

Cat Number: KGA1850/KGA18100

Store at RT for one year (其中溶液 A 需 4°C, RNaseA 溶液需-20°C保存)

For Research Use Only

一、试剂盒说明

凯基超纯质粒小提试剂盒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 30min 内释放高质量的 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。本试剂盒采用的硅胶膜吸附材料, 经机械化切割与装填, 均一性强; 结合液提供质粒吸附条件; 过滤离心柱可吸附 Genomic DNA 和部分非超螺旋质粒; 纯化质粒为超纯度级别, 适合于酶切、PCR、测序、转染等要求; 处理菌液 1-5ml, 柱吸附量可高达 20 μg。

与经典质粒提取方法相比较, 本试剂盒具有以下特点:

质量可靠——提取所得的质粒纯度好, 回收率高;

操作简便——在 30min 内即可从样品中提取到所需质粒;

价格便宜——价格优惠, 质量可与同类进口产品媲美, 性价比高;

使用安全——这是一个完全没有有机溶剂污染的操作过程。

二、试剂盒组份

组 份	KGA1850 (50T)	KGA-18100 (100T)	储存
离心吸附柱	50 个	100 个	RT
溶液 A	13 ml	26 ml	4°C
溶液 B	13 ml	26 ml	RT
溶液 C	18 ml	36 ml	RT
RNase A 溶液, 10 mg/mL	0.3 ml	0.6 ml	-20°C
通用洗柱液	50 ml	100 ml	RT
DNA 洗脱液 2.0	5 ml	10 ml	RT
离心吸附柱套管	50 个	100 个	RT

三、操作步骤

1. 先将全部 RNase A 溶液全部加入到溶液 A 中, 摇匀后再取用, 未用完的溶液 A 最好在 2-8°C 保存。
2. 从筛选平板上挑取单菌落至含抗生素的培养基中, 37°C 震荡培养 12-16 小时 (摇床转速 200-300 rpm)。注意: 建议使用 LB 培养基, 营养更丰富的培养基会使菌体浓度过高, 超过纯化系统处理能力而降低 DNA 质量。另外, 延长培养时间有利于提高质粒 DNA 浓度, 但是菌液培养过长时间会因细胞死亡, 裂解而造成质粒 DNA 浓度降低。
3. 用 1.5 ml 离心管收集 1-4 ml 过夜培养饱和菌液, 室温 12000rpm 离心 1 分钟, 弃上清, 再短暂离心, 吸弃残留液体。
4. 加入 250 ul 溶液 A, 用枪头充分吹打使菌体重悬 (此步在冰上操作效果更佳)。注意: 细胞未充分悬浮会影响后续操作, 可以使用涡流振荡器帮助混匀或使用 Tip 吸头吹打沉淀至完全混匀。
5. 加入 250 ul 溶液 B (如果溶液 B 有沉淀, 用前须 37°C 加热溶解后冷却到室温方可使用), 温和反复颠倒混匀 4-6 次, 看到溶液变粘即可, 然后冰上放置不超过 4-5 分钟。注意: 此步处理不能超过 5 分钟, 否则 DNA 的碱损伤比较严

重。同时千万不要剧烈震荡，否则基因组 DNA 断裂产生的片段非常容易污染质粒 DNA。溶液 B 用后需要将盖拧紧存放，否则空气中的二氧化碳会进入溶液，形成碳酸，中和溶液 B 中的 NaOH, 降低其效率。

6. 加入 350uL 冰上预冷的溶液 C, 反复颠倒混匀 4-6 次, 可见白色沉淀物产生, 然后冰上放置至少 5 分钟。
7. 最高转速 (12000rpm 以上) 4℃离心 5 分钟, 小心将上清液转移到离心吸附柱中。由于此时的溶液比重较大, 有时候会出现沉淀漂浮是正常现象, 取上清时避开漂浮的沉淀即可。如果此步的离心在室温进行, 更容易出现沉淀漂浮的现象。
8. 静置 2 分钟以让质粒 DNA 与吸附柱充分结合, 此步十分重要。
9. 室温 12000rpm 离心 1 分钟, 弃收集管中的废液。
10. 加入 500uL 的通用洗柱液, 室温 12000rpm 离心 1 分钟, 弃收集管中的废液。注意: 通用洗柱液中含乙醇, 用后需要将盖拧紧存放, 否则乙醇会挥发。
11. 重复上步 1 次。
12. 室温 12000rpm 离心 1 分钟, 甩干残留液体。此步不能省略, 否则残留乙醇会影响 DNA 的后续使用 (如 DNA 上样时不能沉淀到加样孔中)。
13. 将离心吸附柱置于一个新的 1.5mL 塑料离心管 (自备) 中, 加入 30-100uL 65-80℃预热的 DNA 洗脱液 2.0, 室温放置 2 分钟。常温的 DNA 洗脱液 2.0 也可以用于洗脱, 但产量稍微有所降低。
14. 室温 12000rpm 离心 1 分钟, 离心管底溶液即质粒 DNA。
15. 由于凯基的吸附柱结合 DNA 能力较强, 如果再加入适量 DNA 洗脱液 2.0 到离心吸附柱中, 往往还能洗脱下很多质粒 DNA (相当于第一次洗脱的 20-30%), 但注意不要使用上步得到的 DNA 洗脱液 2.0 来洗脱。

四、常见问题分析及解决方案

可能出现的问题	可能原因	建议解决方法
DNA 产量低	细胞裂解率低	<ol style="list-style-type: none"> 1. 在加入溶液 A 后菌泥没有充分混匀, 可涡旋振荡悬浮液使之充分混匀。 2. 加入溶液 B 后, 延长孵育时间可获得清晰的裂解液。 3. 如果溶液 B 没有盖紧, 可能需要重配。可按以下准备: 0.2N NaOH, 1% SDS。
	细菌培养物生长过度或不新鲜	不要于 37℃培养超过 16 小时, 分离质粒前长时间存放培养物是不利的。
没有 DNA 被洗脱出来	没有用乙醇稀释漂洗液	按前面指导的方法准备漂洗液。
产量中有大分子量的 DNA 污染	加入溶液 B 后过分混和细胞裂解液	加入溶液 B 后不要猛烈振荡或摇晃, 可轻轻颠倒离心管几次使充分混匀
在琼脂糖凝胶上点样时, 质粒漂出点样孔	乙醇没有完全从柱子上去除	在操作过程中的确保完全离心甩干离心吸附柱。

五、凯基相关产品 (详见凯基网站 <http://www.keygentec.com.cn>)

1. 核酸提取纯化试剂
2. PCR/RT-PCR 实验相关产品
3. 基因克隆产品以及生化酶制剂

