

产品名称& 产品编号

产品名称: 高产量质粒小提试剂盒
产品编号: KTN055-100rxn

试剂盒组成

反应次数	100次
Buffer BL	20 ml
Buffer P1	25 ml
Buffer P2	25 ml
Buffer P4	25 ml
Buffer WB1	50 ml
Buffer WB2	25 ml
Buffer TE	15 ml
RNase A(10 mg/mL)	300 μ l
Spin Columns AC with Collection Tubes	100

*使用前, 请在Buffer WB2中加入100 ml 无水乙醇。

简明步骤

I. 实验前准备

RNase A: 室温下可稳定贮藏半年, 长期贮藏请置于4°C保存。使用前将提供的所有RNase A瞬时离心后加入Buffer P1, 混匀后置于4°C保存。

Buffer P2: 环境温度低时先检查Buffer P2是否出现浑浊, 如有浑浊现象, 请于42°C左右水浴加热至沉淀完全溶解, 溶液澄清, 使用后保证Buffer P2瓶盖旋紧。

准备无水乙醇。

在室温下(22-25°C)进行所有离心操作。

II. 注意事项

质粒拷贝数: 纯化低拷贝质粒或大于10kb的大质粒, 应加大菌体使用量, 使用5-10ml过夜培养物, 同时按比例增加P1、P2、P4的用量, Buffer EB应在65-70°C水浴预热, 适当延长吸附和洗脱时间, 增加提取效率。

转化菌: 若为-70°C甘油冻存的菌, 请先涂布平板培养后, 再重新挑选新的单个菌落进行培养。切勿直接取冻存在4°C的菌进行培养。

III. 操作步骤

1. 柱平衡步骤: 向吸附柱 AC 中(吸附柱放入收集管内)加入 200 μ l Buffer BL, 12,000 rpm (~13,400 \times 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, 12,000 rpm (~13,400 \times g) 离心 30s, 尽可能的吸弃上清, 收集菌体。

注意: 菌液超过 1.5 ml 时, 可以离心弃上清后, 在同一个离心管内加入更多的菌液, 重复步骤 2, 直到收集到足够的菌体。

3. 向菌体沉淀中加入 250 μ l Buffer 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 μ l Buffer 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 片断。此时菌液应变得清亮粘稠, 所用时间不应超过 5 min, 以免质粒受到破坏。如果未变得清亮, 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 250 μ l Buffer P4, 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 \times g) 离心 10 min, 小心取上清至新的离心管。

注意: Buffer P4 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. 向上清中加入 0.5 倍体积异丙醇 (~335 μ l), 充分颠倒混匀, 分两次 (每次不超过 700 μ l) 转移到已装入收集管的吸附柱中, 12,000 rpm (~13,400 \times g) 离心 30 s, 弃废液。

7. 向吸附柱 AC 中加入 500 μ l Buffer WB1, 12,000 rpm (~13,400 \times g) 离心 30 s, 弃废液。

8. 向吸附柱 AC 中加入 600 μ l Buffer WB2 (请先检查是否已加入无水乙醇), 12,000 rpm (~13,400 \times g) 离心 30 s, 弃废液。

9. 重复操作步骤 8。

10. 将吸附柱 AC 放回空收集管中, 12,000 rpm 离心 2 min, 弃收集管和废液。

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。

11. 将吸附柱 AC 置于一个干净的离心管中, 向吸附膜的中间部位悬空滴加 50-100 μ l Buffer TE (TE 提前在 65 $^{\circ}$ C 预热可增加产量), 室温放置 2-5 min, 12,000 rpm (~13,400 \times g) 离心 1 min 收集质粒溶液。注意: 为了增加质粒的回收效率, 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 1 min 收集质粒溶液。

注: 为了增加质粒的回收效率, 可将得到的溶液重新加入吸附柱中, 室温放置 2min, 12,000 rpm (~13,400 \times g) 离心 1 min 收集质粒溶液。如果需要质粒浓度较高, 可适当减少洗脱体积, 但最小体积不应小于 50 μ l。若用 ddH₂O 做洗脱液应确保其 PH 值在 7.0-8.5 范围内, PH 值低于 7.0 会降低洗脱效率。

儲存

室温保存

