**质粒DNA小量纯化试剂盒**

**（离心柱型）**

**货号：KTSM2701**

**■ 产品简介：**

本试剂盒是用于质粒（Plasmid）DNA小量纯化的试剂盒。试剂盒采用了碱裂解法裂解细胞，结合硅基质膜技术，具有高效、快速、方便之特点；使用本试剂盒可最大限度去除杂质蛋白及细胞中其他有机化合物，可从1～5 ml LB 培养基过夜培养的菌液中纯化得到高纯度质粒DNA，制备过程无需苯酚抽提、乙醇沉淀等步骤，纯度较高，可直接用于转化、DNA序列分析、限制酶切、连接等各种酶促反应。

**■主要成分**：

|  |  |
| --- | --- |
| **产品组成** | **KTSM2701（50次）** |
| RnaseA(10 mg/ml) | 150 μl |
| 平衡液LB | 30 ml |
| 溶液PB1 | 15 ml |
| 溶液PB2 | 15 ml |
| 溶液PB3 | 20 ml |
| 去蛋白液PD | 12 ml |
| 漂洗液PW | 15 ml |
| 洗脱液EB | 15 ml |
| 吸附柱C1（含2 ml收集管） | 50个 |

**■保存条件**：

本试剂盒可以在室温下（15-25℃）保存，当温度较低时，溶液PB2会出现沉淀，使用前需37℃加热至沉淀消失。溶液PB1中加入Rnase A后可置于4℃保存约12个月。Rnase A可于室温下（15-25℃）保存6个月，长期保存需存放于-20℃。

**■提取得率**：

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 质粒类型 | 质粒 | 菌液量 | 得率 |
| 低拷贝 | pBR322，pACYC，pSC101，superCos，pWE15 | 1～5 ml | 3～12 μg |
| 高拷贝 | pUC，pBluescript，pGEM，pTZ | 1～5 ml | 6～30 μg |

**■ 注意事项：**

（1）初次使用本试剂盒时，请将Rnase A全部加入到溶液PB1 中，均匀混合后4℃保存；

（2）使用前，向去蛋白液PD和漂洗液PW中各添加相应的无水乙醇；

（3）使用前检查溶液PB2和溶液PB3中是否有沉淀，如果有沉淀请将试剂置于37℃温浴直至沉淀全部消失，不可剧烈振荡溶液PB2，以免产生大量气泡；

（4）溶液PB2使用后，应立即盖紧盖子，避免试剂长时间与空气接触；

（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）试剂中含有强碱及变性剂，操作时应佩戴手套等防护用具；

（7）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；

（8）如果所提质粒为低拷贝或大于10 kb的大质粒，应加大菌液使用量，同时按照比例增加PB1、PB2、PB3的用量，洗脱缓冲液EB应在65-70℃水浴预热，在吸附和洗脱时适当延长试剂，已增加提取效率。其它步骤相同。

**■ 操作步骤：**

（1）向吸附柱中加入500 μl平衡液LB，12,000 rpm离心1 min，弃滤液；

（2）收集1-3 ml过夜培养的菌液于离心管中，12,000 rpm离心1 min，弃上清。（尽可能的倒干上清，菌液较多时可多次离心收集）

（3）加入250 μl溶液PB1（请先检查是否已加入Rnase A）。彻底重悬菌体沉淀；

（4）加入250 μl的溶液PB2，温和地上下翻转8-10次使菌体充分裂解，此时菌液应变得清亮粘稠；

（5）加入350 μl溶液PB3，立即温和地上下翻转8-10次，此时出现白色絮状沉淀。室温12,000 rpm离心10 min；

（6）小心吸取上清转入已平衡的吸附柱中，12,000 rpm离心1 min，弃滤液；

（7）可选步骤：向吸附柱中加入500 μl去蛋白液PD（请先检查是否已加入无水乙醇），12,000 rpm离心1 min，弃滤液；

**注：如果宿主菌是end A+宿主菌（BL21，TG1，HB101，JM系列，ET12567等），推荐采用此步。如果宿主菌是end A-宿主菌（DH5α，TOP10等），此步可省略。**

（8）加入600 μl漂洗液PW（请先检查是否已加入无水乙醇），12,000 rpm离心30-60 s，弃滤液；

（9）重复操作步骤（8）；

（10）空柱12,000 rpm离心2 min。室温放置3-5 min，除去残留乙醇。（漂洗液中的乙醇会影响后续酶促反映，此处应尽量晾干残留的漂洗液）

（11）将吸附柱放入一个干净的离心管中，在吸附膜的中间部位滴加50-100 μl洗脱缓EB，室温放置1 min，12,000 rpm离心2 min洗脱DNA，可立即用于下游分子生物学实验或-20℃保存。（洗脱体积越大，洗脱效率越高，如果需要质粒浓度较高，可以适当减少洗脱体积，但是最小体积不应少于50 μl，体积过小会减少质粒产量。将洗脱得到的溶液重新加入吸附柱中，重复步骤（11）可增加质粒的回收率。若后续做测序，酶切等实验需使用ddH2O做洗脱液。）

**■ 注意事项：**

（1）收集菌液量应控制在1~5 ml，菌量太多会影响溶菌及质粒DNA的释放，纯化时会影响质粒DNA的纯度。菌体的培养时间不要超过16 h，否则难以裂解；

（2）加入PB1和PB2后，颠倒混匀要轻柔，剧烈混合会导致基因组DNA 的污染；

（3）加入PB3后，应充分混合使蛋白质、基因组DNA等形成白色沉淀，离心后沉降于离心管底部。若离心后沉淀仍悬浮于溶液中时，请将离心管上下翻转混合数次后高速离心3～5 min。