**质粒DNA小量纯化试剂盒**

**（磁珠法）**

**货号：KTSM2705**

**■ 产品简介：**

本试剂盒是用于质粒DNA小量纯化的试剂盒。试剂盒将磁性纳米分离技术与碱裂解法裂解细胞相结合，可从菌体中提取高质量质粒DNA；磁珠能很好的吸附质粒DNA，杂质蛋白及细胞中其他有机化合物能被洗涤除去，可从1～4 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** | **KTSM2705（50次）** |
| Rnase A(10 mg/ml) | 150 μl |
| 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 |
| 磁珠悬浮液 | 1.1 ml |

**■ 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Rnse 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℃。

**■ 自备试剂**：

无水乙醇，磁力架。

**■ 注意事项：**

（1）收集菌液量应控制在1~ 4 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。

**■ 使用前准备事项：**

（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。

**■ 操作步骤：**

（1）收集1.5-3 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）

（2）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；

（3）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；

（4）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；

（5）小心吸取上清于新的离心管中，加入等体积的无水乙醇，20 μl磁珠悬浮液，涡旋振荡2-5 min；

（6）将离心管放在磁力架上吸磁1 min，弃上清；

（7）可选步骤：加入500 μl去蛋白液PD，振荡10 s，将离心管置于磁力架吸磁1 min，待磁珠悬浮液完全吸附至管壁后，吸弃上清；

**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，振荡10 s，将离心管置于磁力架吸磁1 min，待磁珠悬浮液完全吸附至管壁后，吸弃上清；

（9）重复步骤（8）一次；

（10）将离心管开盖室温干燥或放入洁净台风吹10 min，至离心管壁无液体残留；

**注意：干燥前尽量吸弃管内残余液体。**

（11）加入50-100 μl洗脱液EB，65℃水浴5-10 min，其间混匀数次；

**注意：请将管壁上的所有磁珠完全悬浮在洗脱液EB中，洗脱液EB加入量不要少于50 μl，否则影响洗脱效率。**

（12）将离心管短暂离心后，置于磁力架上吸磁1 min，待磁珠悬浮液完全吸附至管壁后，小心的吸取上清至新的离心管内，即得质粒DNA。

**注意：吸取上清时，请确保磁珠完全吸附于管壁，否则可能带出磁珠，影响产物纯度。**