

## 革兰氏阳性菌质粒大量提取试剂盒

产品货号：26227

产品规格：10T

产品组成：

试剂名称	10T
RNase A	1ml
溶菌酶	10ml
溶液 I	60ml
溶液 II	60ml
溶液 III	80ml
漂洗液	15ml×2
洗脱液	30ml
吸附柱	10 个
收集管	20 个

**注意：**使用前请先在漂洗液中加入无水乙醇，加入体积请参照瓶体上的标签。溶液 I 在使用前先加入 RNaseA（将试剂盒中提供的 RNaseA 全部加入），混匀，置于 2-8℃ 保存。如非指明，所有离心步骤均为使用台式离心机在室温下离心。

### 操作步骤：

1. 取 50-200ml 细菌培养物，11000rpm 离心 5min，尽量吸除上清（菌液较多时可以通过多次离心将菌体沉淀收集到一个离心管中）。
2. 向留有菌体沉淀的离心管中加入 5ml 溶液 I 和 1ml 溶菌酶，混匀。37℃ 水浴 30min 以上（根据菌液量可适当加长水浴时间，请先检查溶液 I 是否已加入 RNaseA），使用移液器或旋涡振荡器彻底悬浮细菌细胞沉淀。注意：如果菌块未彻底混匀，会影响裂解导致质粒提取量和纯度偏低。
3. 向离心管中加入 5ml 溶液 II，温和地上下翻转 6-8 次使菌体充分裂解。注意：混匀一定要温和以免污染基因组 DNA，此时菌液应变得清亮粘稠，作用时间不要超过 5min，以免质粒受到破坏。
4. 向离心管中加入 7ml 溶液 III，立即温和地上下翻转 6-8 次，充分混匀，此时会出现白色絮状沉淀。11000rpm 离心 10 min，用移液器小心地将上清转移到另一个干净的离心管中，尽量不要吸出沉淀。注意：溶液 III 加入后应立即混匀，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。
5. 将上一步所得上清液加入吸附柱中（吸附柱加入收集管中），室温放置 2min，11000rpm 离心 2min，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中（如果一次加不完，可分两次吸附）。
6. 向吸附柱中加入 7ml 漂洗液（使用前请先检查是否已加入无水乙醇），11000rpm 离心 2min，弃废液，将吸附柱放入收集管中。
7. 向吸附柱中加入 7ml 漂洗液，11000rpm 离心 2min，弃废液，将吸附柱放入收集管中。
8. 11000rpm 离心 5min，将吸附柱敞口置于室温或 50℃ 温箱放置数分钟，目的是将吸附柱中残余的漂洗液去除，否则漂洗液中的乙醇会影响后续实验如酶切、PCR 等。
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 1-2ml 经 65℃ 水浴预热的洗脱液，室温放置 5min，11000rpm 离心 2min，收集质粒 DNA 溶液。
10. （可选）为了增加质粒的回收率，可将得到的洗脱液重新加入吸附柱中，室温放置 5min，11000rpm 离心 2min。



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司

Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话：400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱：saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com

#### 注意事项:

1. 使用前请先检查溶液 II 和溶液 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 500ul, 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(可用 NaOH 将水的 pH 值调至此范围), pH 值低于 7.0 会降低洗脱效率。DNA 产物应保存在 -20°C, 以防 DNA 降解。
3. 如果所提质粒为低拷贝质粒或大于 10kb 的大质粒, 应加大菌体使用量, 使用 400-800ml 过夜培养物, 同时按照比例增加溶液 I、溶液 II 和溶液 III 的用量, 吸附和洗脱时可以适当的延长一段时间, 以增加提取效率。
4. DNA 浓度及纯度检测: 得到的质粒 DNA 纯度与样品保存时间、操作过程中的剪切力等因素有关。得到的 DNA 可用琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测浓度与纯度。DNA 应在 OD<sub>260</sub> 处有显著吸收峰, OD<sub>260</sub> 值为 1 相当于大约 50μg/ml 双链 DNA、40μg/ml 单链 DNA。OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 比值应为 1.7-1.9, 如果洗脱时不使用洗脱缓冲液, 而使用去离子水, 比值会偏低, 因为 pH 值和离子存在会影响光吸收值, 但并不表示纯度低。

#### 保存条件:

RNA 酶, 溶菌酶于 -20°C 保存, 其它试剂室温保存。复检期一年。



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司

Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话: 400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱: saintbio@126.com

<http://www.saint-bio.com>