

革兰氏阳性菌质粒小量提取试剂盒

产品货号：26226

产品规格：50T/100T

产品组成：

试剂名称	50T	100T
RNase A	300 μ L	500 μ L
溶菌酶	3mL	5.5mL
溶液 I	15mL	30mL
溶液 II	15mL	30mL
溶液 III	20mL	40mL
漂洗液 I	24mL	48mL
漂洗液 II	15mL	15mL \times 2
洗脱液	15mL	30mL
吸附柱	50 个	100 个
收集管	50 个	100 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 $^{\circ}$ C 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 1-5ml 细菌培养物，12000rpm 离心 1min，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 200 μ L 溶液 I（**请先检查是否已加入 RNaseA**），使用移液器或旋涡振荡器彻底悬浮细菌细胞沉淀。再向其中加入 50 μ L 溶菌酶，混匀。37 $^{\circ}$ C 水浴 30min 以上（根据菌液量可适当加长水浴时间）。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。如不能确定为何种菌，请按阳性菌处理。
3. 向离心管中加入 250 μ L 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 350 μ L 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。12000 rpm 离心 10 min。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，12000rpm 离心 1min，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 600 μ L 漂洗液 I（使用前请先检查是否已加入无水乙醇），12000rpm 离心 1min，弃废液，将吸附柱放入收集管中。
7. 向吸附柱中加入 700 μ L 漂洗液 II（使用前请先检查是否已加入无水乙醇），12000rpm 离心 1min，弃废液，将吸附柱放入收集管中。
8. 向吸附柱中加入 500 μ L 漂洗液 II，12000rpm 离心 1min，弃废液，将吸附柱放入收集管中。
9. 12000rpm 离心 2min，将吸附柱敞口置于室温或 50 $^{\circ}$ C 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的实验如酶切、PCR 等。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com

10. 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 50-200 μ L 经 65 $^{\circ}$ C 水浴预热的洗脱液，室温放置 2min，12000rpm 离心 1min。
11. (可选)为了增加质粒的回收效率，可将得到的洗脱液重新加入吸附柱中，室温放置 2min，12000rpm 离心 1min。

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 $^{\circ}$ 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 50 μ L，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 $^{\circ}$ 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 5-10ml 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 OD₂₆₀ 处有显著吸收峰，OD₂₆₀ 值为 1 相当于大约 50 μ g/ml 双链 DNA、40 μ g/ml 单链 DNA。OD₂₆₀/OD₂₈₀ 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 $^{\circ}$ C 保存，其它试剂室温保存。复检期一年。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co.,Ltd

地址:郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话: 400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱: zzlybio@126.com