

革兰氏阳性菌质粒大量提取试剂盒说明书

货号：AC11000

规格：10T

保存：RNA 酶，溶菌酶于-20 °C 保存，其它试剂室温保存。复检期一年。

产品内容：

试剂盒组成	AC11000-10T
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
说明书	1 份

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°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 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°C 水浴 30 min 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 5 min，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。

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℃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℃，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 OD₂₆₀ 处有显著吸收峰，OD₂₆₀ 值为 1 相当于大约 50 μg/ml 双链 DNA、40 μg/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。