

革兰氏阳性菌质粒小量提取试剂盒说明书

货号：AC10999

规格：50T/100T

保存：RNase A，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：

组份	AC10999-50T	AC10999-100T
RNase A	300 μ L	500 μ L
溶菌酶	3 mL	5.5 mL
溶液I	15 mL	30 mL
溶液II	15 mL	30 mL
溶液III	20 mL	40 mL
漂洗液I	24ml	48ml
漂洗液II	15 mL	15 mL \times 2
洗脱液	15 mL	30 mL
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°C保存。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（仅供参考）：

- 1、取 1-5 mL 细菌培养物，12000 rpm 离心 1 min，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°C水浴 30 min 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 5 min，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 2 min，12000 rpm 离心 1 min，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。
- 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 10 kb 的大质粒, 应加大菌体使用量, 使用 5-10 mL 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延长时间, 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。

相关文献:

- [1] F.Yao,X.Y.Xu,Q.Pan,et al. A modified method for plasmid extraction from *Lactobacillus plantarum* contained lysozyme removal step. *Analytical Biochemistry*. February 2019;566:37-39. (IF 2.219)