



革兰氏阳性菌质粒大提试剂盒

(G⁺Plasmid Kit)

目录号: ZP117

试剂盒内容:

试剂盒组成	ZP117-1 (5次)	ZP117-2 (10次)	ZP117-3 (20次)
Lysozyme(100 mg/ml)	400 µl	800 µl	2×800 µl
RNaseA (10mg/ml)	400 µl	800 µl	1.6ml
细胞悬浮液	40 ml	80 ml	160 ml
溶液 2	40 ml	80 ml	160 ml
溶液 3	40 ml	80 ml	160 ml
漂洗液 W2	30 ml	2×30 ml	4×30 ml
洗脱缓冲液 TE	15 ml	30 ml	30 ml
过滤柱 FS	5 个	10 个	20 个
吸附柱	5 个	10 个	20 个
收集管 (50 ml)	5 个	10 个	20 个
说明书	1 份	1 份	1 份

储存条件:

第一次使用前将 RNase A 及 Lysozyme 加入细胞悬浮液中,混匀后置于 2-8°C 保存,可稳定保存半年。本试剂盒在室温 (15-25°C) 干燥条件下,可保存 1 年;更长时间的保存可置于 2-8°C。2-8°C 保存条件下,若溶液产生沉淀,应在使用前置于 37°C 下溶解沉淀。单独包装的 RNaseA 及 Lysozyme 在 -20°C 可稳定保存 1 年以上。

产品简介:

本试剂盒采用溶菌酶和直接裂解的方法促使革兰氏阳性菌细胞快速高效地破壁、裂解,通过独特的硅胶膜吸附技术,高效专一地结合质粒 DNA。同时采用特殊的溶液 3 和过滤器,可有效的去除杂质;整个提取过程仅 1 个小时左右,方便快捷。使用本试剂盒提取的质粒 DNA 可适用于各种常规操作,包括酶切、PCR、测序、连接、转化和转染多种细胞等实验。

推荐每次菌液使用量: 高拷贝质粒推荐使用量为 100ml,得率一般在 500~1000µg 左右;低拷贝质粒推荐使用量为 200ml,得率一般在 200~400µg 左右。

注意事项: 请务必在使用本试剂盒之前阅读此注意事项。

1. 细胞悬浮液在使用前先加入 RNase A 及 Lysozyme (**将试剂盒中提供的 RNase A 和 Lysozyme 全部加入**), 混匀,置于 2-8°C 保存。
2. 第一次使用前应按照试剂瓶标签的说明先在漂洗液 W2 中加入无水乙醇。
3. 使用前先检查溶液 2 和溶液 3 是否出现结晶或者沉淀,如有结晶或者沉淀现象,可在 37°C 水浴中加热几分钟,即可恢复澄清。
4. 注意不要直接接触溶液 2 和溶液使用后应立即盖紧盖子。
5. 使用过滤柱时请将推柄小心缓慢地从过滤管中抽出,避免滤膜因压力而松动。
6. 提取的质粒质量与细菌培养浓度、质粒拷贝数等因素有关。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,同时按比例增加溶液 1、2、3 的用量;洗脱缓冲液推荐在 65~70°C 水浴中预热。**可以适当延长吸附和洗脱时间,以提高提取效率。**

操作步骤：

1. 取 50-100ml (根据培养菌体的浓度选择合适的量, 低拷贝推荐用 200ml) 过夜培养的 G⁺菌液加入离心管, 室温 10,000 rpm (~11,500×g) 离心 3 分钟收集细菌, 尽量吸除上清。
注意: 菌液较多时可以通过几次离心将菌体沉淀收集到一个离心管中, 菌体量以能够充分裂解为佳, 过多的菌体裂解不充分会降低质粒的提取效率。
2. 尽量吸除上清, 为确保上清液全部吸取, 请用干净的吸水纸吸去瓶壁上的水滴。
3. 向留有菌体沉淀的离心管中加入 7ml 细胞悬浮液 (请先检查是否已加入 RNaseA 及 Lysozyme), 使用移液器或涡旋振荡器彻底悬浮细菌细胞沉淀, 37°C 温浴 30 分钟每隔 5-10 分钟颠倒混匀数次。
注意: 务必彻底悬浮细菌沉淀, 如果有未彻底混匀的菌块, 会影响裂解, 导致提取量和纯度偏低。
4. 向离心管中加入 7ml 溶液 2, 立即温和地上下翻转 6-8 次, 室温放置 5 分钟。
注意: 温和地混匀, 不要剧烈震荡, 以免污染基因组 DNA。此时菌液应变得清亮粘稠, 如果未变得清亮, 可能由于菌体过多, 裂解不彻底, 应减少菌体量。
5. 向离心管中加入 7ml 溶液 3, 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。然后室温放置 10 分钟左右, 10,000 rpm (~11,500×g) 离心 5 - 10 分钟, 将溶液全部倒入过滤柱 FS 中, 慢慢推动推柄过滤, 滤液收集在干净的 50ml 的管中 (自备)。
注意: 加入溶液 3 后应立即混匀, 避免产生局部沉淀。如果离心后倒入过滤柱 FS 中的溶液有白色沉淀也不会影响过滤。如果菌体过多 (>100ml), 推荐延长离心时间至 20-30 分钟。
6. 向滤液中加入滤液体积的 0.3 倍的异丙醇 (加入异丙醇过多容易导致 RNA 污染), 上下颠倒混匀后转移到吸附柱中 (吸附柱放入 50ml 收集管中)。
注意: 过滤后滤液会损失, 根据损失的不同请加入不同体积的异丙醇。吸附柱的最大容积为 15ml, 所以需要分 2 次过柱。

7. 室温 10,000 rpm (~11,500×g) 离心 2 分钟, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱重新放回收集管中。
注意: 将第 7 步中所得溶液分 2 次过柱, 每次均按以上条件操作。
8. 向吸附柱中加入 7ml 漂洗液 W2 (请先检查是否已加入无水乙醇), 10,000 rpm (~11,500×g) 离心 2 分钟, 弃掉收集管中的废液, 将吸附柱重新放回收集管中。重复此步骤一次。
9. 向吸附柱中加入 3ml 无水乙醇, 室温 10,000 rpm (~11,500×g) 离心 2 分钟, 倒掉废液。
10. 将吸附柱重新放回收集管中, 10,000 rpm (~11,500×g) 离心 5 分钟, 目的是将吸附柱中残余的漂洗液去除。
注意: 漂洗液中乙醇的残留会影响后续的酶反应 (酶切、PCR 等) 实验。为确保下游实验不受残留乙醇的影响, 建议将吸附柱开盖, 置于室温放置数分钟, 以彻底晾干吸附材料中残余的漂洗液。
11. 将吸附柱置于一个干净的 50ml 收集管中, 向吸附膜的中间部位悬空滴加 1-2ml 洗脱缓冲液 TE, 室温放置 5 分钟, 室温 10,000 rpm (~11,500×g) 离心 2 分钟。将 50ml 离心管中的洗脱液全部移入一个干净的 1.5ml 离心管, -20°C 保存。
注意: 为了增加质粒的回收效率, 可将得到的溶液重新加入到吸附柱中, 重复步骤 11。洗脱液的 pH 值对于洗脱效率有很大影响。若用水做洗脱液应保证其 pH 值在 7.0-8.5 范围内 (可以用 NaOH 将水的 pH 值调到此范围), pH 值低于 7.0 会降低洗脱效率。洗脱缓冲液的用量主要是依据质粒的拷贝数以及实验所需要的浓度。若需要的浓度高一些, 洗脱缓冲液体积可以少些, 但是最好不少于 1ml, 体积过小影响回收效率。且 DNA 产物应保存在 -20°C, 以防 DNA 降解。

质粒 DNA 浓度及纯度检测

得到的质粒 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。OD₂₆₀ 值为 1 相当于大约 50 μg/ml 双链 DNA。

纯化的质粒 DNA OD₂₆₀/OD₂₈₀ 通常在 1.8~2.0 左右, 可直接应用于细胞转染甚至动物体内实验等对 DNA 纯度要求很高的实验中。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, 但并不表示纯度低, 因为 pH 值和离子存在会影响光吸收值。