



G⁺质粒中量提取试剂盒

(G⁺Plasmid Midipure Kit)

目录号: ZP115

试剂盒内容:

试剂盒组成	ZP115-1 (50 次)	ZP115-2 (100 次)	ZP115-3 (200 次)
Lysozyme(100 mg/ml)	300 µl	600 µl	1.2 ml l
RNaseA (10 mg/ml)	300 µl	600 µl	1.2 ml
细胞悬浮液	30 ml	60 ml	120 ml
溶液 2	30 ml	60 ml	120 ml
溶液 3	40 ml	80 ml	150 ml
去蛋白液 W1	30 ml	60 ml	120 ml
漂洗液 W2	15 ml	2×15 ml	2×30 ml
洗脱缓冲液 TE	15 ml	20 ml	30 ml
吸附柱	50 个	100 个	200 个
收集管 (2 ml)	50 个	100 个	200 个
说明书	1 份	1 份	1 份

储存条件:

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 RNase A 在-20°C可稳定保存 1 年以上。加入 RNase A 后的溶液 1 应置于 2–8°C保存, 可稳定保存半年。

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, 离心吸附柱中采用的硅基质材料为本公司特有新型材料, 高效、专一吸附DNA, 可最大限度去除杂质蛋白及细胞中其他有机化合物。从5–15 ml大肠杆菌LB(Luria–Bertani)培养液中, 可快速提取多至70 µg纯净的高拷贝质粒DNA, 提取率达85–90 %。

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、文库筛选、体外翻译、转染一些常规的传代细胞等。

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 是否出现浑浊, 如有混浊现象, 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 3, 使用后应立即盖紧盖子。
5. 所有离心步骤均为使用台式离心机室温下进行离心, 速度为 12,000 rpm (~13,400×g)。
6. 提取的质粒量与细菌培养浓度、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, 洗脱缓冲液应在 65–70°C预热。可以适当的延长吸附和洗脱的时间, 以增加提取效率。

操作步骤：

1. 取 5–15 ml 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。收集的菌体量以能够充分裂解为佳,菌体过多裂解不充分会降低质粒的提取效率。
2. 向留有菌体沉淀的离心管中加入 500 μl 细胞悬浮液(请先检查是否已加入 RNaseA 和 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：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。
3. 向离心管中加入 500 μl 溶液 2,温和地上下翻转 6–8 次使菌体充分裂解。
注意：温和地混合,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,所用时间不应超过 5 分钟,以免质粒受到破坏。如果菌液没有变清亮,可能是由于菌体过多,裂解不彻底,应减少菌体量。
4. 向离心管中加入 700 μl 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。12,000 rpm (~13,400×g) 离心 10 分钟,此时在离心管底部形成沉淀。
注意：溶液 3 加入后应立即混合,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. 将上一步收集的上清液分次加入吸附柱中(吸附柱放入收集管中,其容量为 750–800 μl),注意尽量不要吸出沉淀。12,000 rpm (~13,400×g)离心 1 分钟,倒掉收集管中的废液,将吸附柱放入收集管中。
6. **可选步骤：向吸附柱中加入 500 μl 去蛋白液 W1,12,000 rpm (~13,400×g) 离心 1 分钟,倒掉收集管中的废液,将吸附柱重新放回收集管中。**

7. 向吸附柱中加入 700 μl 漂洗液 W2(请先检查是否已加入无水乙醇),12,000 rpm (~13,400×g)离心 1 分钟,倒掉收集管中的废液,将吸附柱放入收集管中。重复此步骤一次。
8. 吸附柱放入收集管中,12,000 rpm(~13,400×g)离心 2 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。
9. 将吸附柱置于一个干净的离心管中,向吸附膜的中间部位悬空滴加 100-300 μl 洗脱缓冲液 TE,室温放置 2-5 分钟,12,000 rpm(~13,400×g)离心 2 分钟,将质粒溶液收集到离心管中。
注意：为了增加质粒的回收效率,可将得到的溶液重新加入离心吸附柱中,重复步骤 9。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。洗脱缓冲液体积不应少于 100 μl,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。电泳可能为单一条带,也可能为 2 到 3 条 DNA 条带,这主要与提取物培养时间长短、提取时操作剧烈程度等有关。OD₂₆₀ 值为 1 相当于大约 50 μg/ml 双链 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,但并不表示纯度低,因为 pH 值和离子存在会影响光吸收值。