



上海源叶生物科技有限公司  
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd  
电话: 021-61312973 传真: 021-55068248  
网址: [www.shyuanye.com](http://www.shyuanye.com)  
邮箱: [shyysw@sina.com](mailto:shyysw@sina.com)

## 革兰氏阳性菌质粒小量提取试剂盒

货号: R32719

规格: 50T, 100T

保存温度: -20℃ 保存, 有效期 12 个月。

产品内容:

| 组份      | R32719-50T  | R32719-100T      |
|---------|-------------|------------------|
| RNase A | 100 $\mu$ L | 100 $\mu$ L*2    |
| 溶菌酶     | 60mg        | 60mg*2           |
| 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(50T/100T 的漂洗液I每瓶需要单独加入16mL/32mL 的无水乙醇, 漂洗液II每瓶需要单独加入45mL 的无水乙醇)。溶液I在使用前先加入RNaseA (将试剂盒中提供的 RNase A全部加入),混匀, 置于2-8℃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:

注意: 溶菌酶使用前需要用 50%甘油配制成 20mg/mL, 建议现用现配, 或者分多次配制。

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  $\mu$ 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



上海源叶生物科技有限公司  
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd  
电话: 021-61312973 传真: 021-55068248  
网址: [www.shyuanye.com](http://www.shyuanye.com)  
邮箱: [shyysw@sina.com](mailto:shyysw@sina.com)

50 $\mu$ L 溶菌酶，混匀，37°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  $\mu$ 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  $\mu$ 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. 取上一步上清，加入 0.4 倍体积无水乙醇，充分混匀。（体积过多可分两次混合，然后上柱）

6. 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，12000rpm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）。

7. 向吸附柱中加入600 $\mu$ 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。

8. 向吸附柱中加入 700 $\mu$ 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。

9. 向吸附柱中加入 500 $\mu$ L 漂洗液II，12000rpm 离心 1min，弃废液，将吸附柱放入收集管中。

10. 12000rpm 离心 2min，将吸附柱敞口置于室温或 50°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。

11. 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 $\mu$ L 经 65°C水浴预热的洗脱液，室温放置 2min，12000rpm 离心 1min。



---

12. (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°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  $\mu$ 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°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5-10mL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  $\mu$ g/ mL 双链DNA、40  $\mu$ 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。