天净沙系列

CAT#:220867

常温运输和保存

天净沙

革兰氏阳性细菌质粒 DNA 纯化试剂盒（沉淀法）

Gram-positive Bacteria Plasmid DNA Purification Kit

使用手册 V0.5

北京天净沙基因科技有限公司

网址：www.tjs.bio；电话：400-1078566；电邮：order@tjs.bio

产品及特点

碱变性法是最常见的革兰氏阳性细菌质粒 DNA 提取方法，其过程是首先菌体经离心悬浮后，细胞被 SDS 和碱裂解，并且碱使基因组 DNA 和革兰氏阳性细菌质粒 DNA 变性，随后用酸中和，革兰氏阳性细菌质粒 DNA 可以快速复性，而基因组 DNA 不能快速复性，故可以通过离心去除。如果用柱式法，则含革兰氏阳性细菌质粒 DNA 的上清用离心吸附柱吸附革兰氏阳性细菌质粒 DNA，洗去杂质，得到纯化的革兰氏阳性细菌质粒 DNA。但此方法不适合特别大的质粒。因此本公司推出沉淀法，用于纯化柱式法不能回收的革兰氏阳性细菌质粒 DNA。本产品具有下列特点：

1. 快速、步骤少，整个操作在 40 分钟左右完成。
2. 革兰氏阳性细菌质粒 DNA 纯化溶液 B 中有蓝色染料，便于目测非常关键的碱变性和中和反应两步的溶液混匀状况，保证实验效果。
3. 产量高，一次可以处理 1-5 mL 过夜培养的菌液，每毫升过夜培养的菌液可以提取到 2-5 μg/mL（取决于质粒是高拷贝、中拷贝还是低拷贝）。
4. 本产品足够 50 次微量提取。
5. 纯度高，采用本试剂盒提取的质粒 OD 比值在 1.8-2.0 之间，可以直接用于酶切、转化、测序及 PCR 等。
6. 本产品只能用于科研。

规格及成分

本产品采用大扁盒包装

成分	编号	规格	包装
革兰氏阳性细菌 质粒 DNA 纯化溶液 A	220867a	13 mL	15 mL 本色瓶
革兰氏阳性细菌 质粒 DNA 纯化溶液 B	220867b	13 mL	15 mL 棕色瓶
革兰氏阳性细菌 质粒 DNA 纯化溶液 C	220867c	18 mL	30 mL 本色瓶
溶菌酶干粉（20 KU/mg）	210808c	250 mg	2.0 mL 黄盖管
RNase A 溶液，10 mg/mL	220714	0.6 mL	1.5 mL 本色管
去蛋白溶液	220867d	30 mL	30 mL 棕玻瓶
质粒沉淀液	220867e	30 mL	30 mL 本色瓶
DNA 洗脱液（基因组纯化专用）	220125	10 mL	10 mL 本色瓶
使用手册	220867sc	1 份	无

运输及保存

常温运输和保存，RNase A 溶液需要-20℃保存低温运输，有效期一年。

自备试剂

75%乙醇

使用方法

1. 从筛选平板上挑取单菌落至含抗生素的培养基中，37℃震荡培养 12-16 小时（摇

床转速 200-300）。注意：建议使用 LB 培养基，营养更丰富的培养基会使菌体浓度过高，超过纯化系统的处理能力而降低革兰氏阳性细菌质粒 DNA 的质量。另外，延长培养时间会因细胞死亡、裂解而造成革兰氏阳性细菌质粒 DNA 浓度降低。

2. 用 1.5 mL 离心管收集 1-5 mL 过夜培养饱和菌液，室温 12,000×g 离心 1 分钟，弃上清，再短暂离心，吸弃残留液体。
3. 第一次使用本试剂盒时，先将本试剂盒提供的全部 RNase A 溶液加入到革兰氏阳性细菌质粒 DNA 纯化溶液 A（简称溶液 A，下同）中，摇匀后再取用，未用完的溶液 A 放 4℃保存。
4. 加入 250 μL 溶液 A 到第 2 步得到的细菌沉淀中，用枪头充分吹打使菌体重悬。注意：细胞未充分悬浮会影响后续碱变性，可以使用漩涡振荡器混匀或使用枪头吸头吹打沉淀至完全混匀。
5. 加入大约 5mg 溶菌酶干粉到细菌悬液中（用 0.1mg 精度的分析天平称量），轻柔颠倒混匀后室温放置 10 分钟破裂细胞壁。
6. 加入 250 μL 革兰氏阳性细菌质粒 DNA 纯化溶液 B（下面简称溶液 B，如果溶液 B 在低温放置产生沉淀，须 37℃加热溶解后冷却到室温方可使用），温和颠倒 4-6 次混匀，蓝色将变得均匀并且溶液将变得粘稠。注意：千万不要剧烈振荡，否则基因组 DNA 断裂产生的片段非常容易污染革兰氏阳性细菌质粒 DNA。
7. 冰上放置不超过 5 分钟。注意：冰上放置不要超过 5 分钟，否则革兰氏阳性细菌质粒 DNA 会有碱损伤。溶液 B 用后需要将盖拧紧存放，否则空气中的二氧化碳会进入溶液，形成碳酸，中和溶液 B 中的碱，降低其效率。如果溶液 B 颜色不是蓝色，则表示变质，应该弃之不用并且跟厂家联系。
8. 加入 350 μL 冰上预冷的革兰氏阳性细菌质粒 DNA 纯化溶液 C（下面简称溶液 C），温和反复颠倒 4-6 次，溶液将变成无色，将有白色絮状沉淀产生。
9. 冰上放置至少 5 分钟让革兰氏阳性细菌质粒 DNA 复性。不能短于 5 分钟，一般 10 分钟。
10. 12,000×g 离心 3 分钟，小心将上清液转移到新离心管中。由于此时的溶液比重较大，部分絮状物悬浮在上清液中属正常现象，吸取上清时避开这些悬浮物即可。如果此步的离心在 4℃进行，可减轻沉淀物漂浮。
11. 加入 0.6 mL 去蛋白溶液，充分震荡 2 分钟后常温 12，000×g 离心 2 分钟，取水相（无色）到新离心管中，不要取有颜色的部分。
12. 加等体积的质粒沉淀液，颠倒 30 秒混匀后室温 12,000×g 离心 10 分钟，革兰氏阳性细菌质粒 DNA 将形成沉淀，弃上清。

	13. 加入 1 mL 的自备 75%乙醇，室温 12,000×g 离心 1 分钟，弃上清。 14. 室温 12,000×g 离心 1 分钟，取出残留液体（约 50 μL）。 15. 室温短暂放置半分钟。 16. 加入 DNA 洗脱液 50-100 μL 重悬沉淀，即得革兰氏阳性细菌质粒 DNA 溶液，可以直接用于后续实验。
关联产品	革兰氏阳性细菌质粒 DNA 纯化试剂盒（过柱法）