天净沙系列

CAT#：220737

低温运输，常温保存（含低温成分）

天净沙

超螺旋质粒 DNA 纯化试剂盒（过柱法）

Supercoiled Plasmid DNA Purification Kit (Column Method)

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

本试剂盒用于超螺旋质粒 DNA 制备与纯化。基于改良后的碱变性法，用碱使基因组 DNA 和质粒 DNA 均变性，再用酸中和，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。除去基因组 DNA 后的含质粒 DNA 的上清用离心吸附柱吸附质粒 DNA，洗去杂质，即可得到纯化的质粒 DNA，再通过特定的核酸外切酶将除超螺旋质粒 DNA 外的其他质粒 DNA 降解，即可得超螺旋质粒 DNA 溶液。本产品具有下列特点：

1. 快速、步骤少，整个操作在 1 个小时左右完成。
2. 不需要预平衡离心吸附柱。
3. 通用洗柱液即开即用，不需要用户额外加乙醇。
4. 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。
5. 产量高，一次可以处理 1-4 mL 过夜培养的 G+菌液，每毫升过夜培养的细菌可以提取到 2-5 μg/mL（取决于质粒是高拷贝、中拷贝还是低拷贝）。
6. 本产品足够 50 次微量提取。
7. 纯度高，采用本试剂盒提取的超螺旋质粒 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。
8. 本产品只能用于科研。

规格及成分

本产品使用大纸盒包装

成分	编号	规格	包装
超螺旋质粒 DNA 纯化溶液 A	220737a	13 mL	15 mL 本色瓶
超螺旋质粒 DNA 纯化溶液 B	220737b	13 mL	15 mL 本色瓶
超螺旋质粒 DNA 纯化溶液 C	220737c	18 mL	30 mL 本色瓶
RNase A 溶液，10 mg/mL	220714	0.6 mL	2.0 mL 本色管
离心吸附柱	220144	50 套	塑料袋
通用洗柱液	220143	50 mL	60 mL 本色瓶
DNA 洗脱液（基因组纯化专用）	220125	10 mL	10 mL 本色瓶
超螺旋质粒 DNA 纯化专用 核酸外切酶，10 U/μL	220739a	100 μL	0.5 mL 红盖管
超螺旋质粒 DNA 纯化专用 核酸外切酶反应缓冲液	220739b	1.25 mL	1.5 mL 本色管
0.5 M EDTA	240829	100 μL	0.5 mL 本色管
使用手册	220737sc	1 份	无

运输及保存	低温运输，常温保存，RNase A 溶液超螺旋质粒 DNA 纯化专用核酸外切酶需要-20℃保存，有效期一年。
自备试剂	无
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、裂解而造成质粒 DNA 浓度降低。 2. 用 1.5 mL 离心管收集 1-4 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 溶液加入到超螺旋质粒 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 250 μL 超螺旋质粒 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质粒 DNA。 6. 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。 7. 加入 350 μL 冰上预冷的超螺旋质粒 DNA 纯化溶液 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。 8. 冰上放置至少 5 分钟让质粒 DNA 复性。不能短于 5 分钟，一般 10 分钟。 9. 12,000×g 离心 3 分钟，小心将上清液转移到离心吸附柱中。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。 10. 静置 2 分钟以让质粒 DNA 与离心吸附柱充分结合。 11. 室温 12,000×g 离心 1 分钟，弃收集管中的废液。

	12. 加入 500 μL 的通用洗柱液到离心吸附柱中，室温 12,000×g 离心 1 分钟，弃收集管中废液。注意：通用洗柱液中含乙醇，每次用后需要将盖拧紧存放，否则乙醇会挥发。 13. 重复上步 1 次。 14. 室温 12,000×g 离心 1 分钟，甩干残留液体。此步不能省略，否则残留乙醇会影响 DNA 的后续使用(如残留乙醇使 DNA 溶液在电泳上样时不能沉淀到加样孔中)。 15. 将离心吸附柱置于一个新的 1.5 mL 塑料离心管（自备）中，加入 30-100 μL 65-80℃预热的 DNA 洗脱液（基因组 DNA 专用），室温放置 2 分钟。 16. 室温 12,000×g 离心 1 分钟，离心管底溶液即质粒 DNA 溶液。 17. 获得的质粒 DNA 溶液与超螺旋质粒 DNA 纯化专用核酸外切酶反应缓冲液按照体积比 9:1 混合，以 50 μL 体积为例，50 μL 中含 DNA 溶液 45 μL，超螺旋质粒 DNA 纯化专用核酸外切酶反应缓冲液 5 μL。 18. 向 50 μL 质粒 DNA 溶液与反应缓冲液的混合溶液中加入 2 μL 超螺旋质粒 DNA 纯化专用核酸外切酶，37℃温浴 30 分钟。 19. 迅速冰浴，向反应溶液中加入 2 μL 0.5 M EDTA 终止反应，所得反应产物中超螺旋质粒 DNA 可以用于后续实验。
关联产品	超螺旋 DNA Ladder