天净沙系列

CAT#:220865

常温运输和保存，有低温成分

天净沙

革兰氏阳性细菌质粒 DNA 纯化试剂盒(过柱法)

Gram-Positive Bacteria Plasmid DNA Purification Kit

使用手册 V1.01

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

本试剂盒用于从革兰氏阳性（G+）细菌中小量制备质粒 DNA。本产品是经过精心改良后的碱变性法质粒 DNA 纯化试剂盒，其原理是菌体经溶菌酶破壁，将破壁后的菌体用碱使基因组 DNA 和质粒 DNA 全部变性，经酸中和后的质粒 DNA 可以快速复性，基因组 DNA 不能快速复性，通过离心可有效去除基因组 DNA。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。本产品具有如下特点：

1. 简单快捷，整个实验在 40 分钟左右完成。
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 G+细菌可以提取到 2-5 μg/mL，纯化后质粒 DNA 的浓度取决于质粒的拷贝数。
6. 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。
7. 本产品足够 50 次微量提取。
8. 本产品只可用于科研。

规格及成分

本产品使用大扁盒包装

成分	编号	规格	包装
革兰氏阳性细菌质粒 DNA 纯化溶液 A	220865a	13 mL	15 mL 本色瓶
革兰氏阳性细菌质粒 DNA 纯化溶液 B	220865b	13 mL	15 mL 棕色瓶
革兰氏阳性细菌质粒 DNA 纯化溶液 C	220865c	18 mL	30 mL 本色瓶
溶菌酶干粉（20 KU/mg）	210808c	250 mg	2 mL 黄盖管
RNase A 溶液，10 mg/mL	220714	0.6 mL	2 mL 本色管
通用洗柱液	220143	50 mL	60 mL 本色瓶
DNA 洗脱液（基因组 DNA 专用）	220125	10 mL	10 mL 本色瓶
离心吸附柱	220144	50 套	自封袋
使用手册	220865sc	1 份	无

运输及保存

常温运输和保存，RNase A 溶液需要-20℃保存，溶菌酶干粉长期保存需要放-20℃，有效期一年。

自备物品

1.5 mL 塑料离心管。

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 5 mg 溶菌酶干粉到细菌悬液中(用 0.1 mg 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质粒 DNA。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. 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。 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。 11. 静置 2 分钟以让质粒 DNA 与离心吸附柱充分结合。 12. 室温 12,000 g 离心 1 分钟，弃收集管中的废液。

	13. 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。 14. 重复上步 1 次。 15. 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）。 16. 将离心吸附柱置于一个新的 1.5 mL 塑料离心管中，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。 17. 室温 12,000 g 离心 1 分钟，离心管底溶液即质粒 DNA 溶液。
关联产品	超螺旋质粒 DNA 纯化试剂盒（过柱法）