

天  
净  
沙  
系  
列

CAT#:220865-50

常温运输和保存，有低温成分

**BINGENE**

革兰氏阳性细菌质粒 DNA 纯化试剂盒（过柱法）

使用手册 V1.0

江苏天净沙基因诊断技术有限公司

网址: [www.bingene.com](http://www.bingene.com); 电话: 400-6605850; 电邮: [order@bingene.com](mailto:order@bingene.com)

<p><b>产品及特点</b></p>	<p>本试剂盒用于从革兰氏阳性 (G+) 细菌中小量制备质粒 DNA。本产品基于改良后的碱变性法, 首先菌体经溶菌酶破壁, 然后用碱使基因组 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。本产品具有下列特点:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 快速、步骤少, 整个操作在 40 分钟左右完成。</li> <li>2. 不需要预平衡离心吸附柱。</li> <li>3. 通用洗柱液即开即用, 不需要用户额外加乙醇。</li> <li>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。</li> <li>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 ug/mL (取决于质粒是高拷贝、中拷贝还是低拷贝)。</li> <li>6. 本产品足够 50 次微量提取。</li> <li>7. 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。</li> </ol>																																								
<p><b>规格及成分</b></p>	<p style="text-align: center;">本产品大纸盒包装</p> <table border="1" data-bbox="389 1144 1428 1783"> <thead> <tr> <th>成份</th> <th>编号</th> <th>规格</th> <th>包装材料</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>革兰氏阳性细菌质粒 DNA 纯化溶液 A</td> <td>220865a</td> <td>13 mL</td> <td>15mL 本色瓶</td> </tr> <tr> <td>革兰氏阳性细菌质粒 DNA 纯化溶液 B</td> <td>220865b</td> <td>13 mL</td> <td>15mL 棕色瓶</td> </tr> <tr> <td>革兰氏阳性细菌质粒 DNA 纯化溶液 C</td> <td>220865c</td> <td>18 mL</td> <td>30mL 本色瓶</td> </tr> <tr> <td>溶菌酶干粉 (20KU/mg)</td> <td>210808c</td> <td>250mg</td> <td>2.0mL 黄盖管</td> </tr> <tr> <td>RNase A 溶液, 10mg/mL</td> <td>220714</td> <td>0.6 mL</td> <td>2.0mL 本盖管</td> </tr> <tr> <td>通用洗柱液</td> <td>220143</td> <td>50 mL</td> <td>60mL 本色瓶</td> </tr> <tr> <td>DNA 洗脱液 (基因组 DNA 专用)</td> <td>220125</td> <td>10 mL</td> <td>10 mL 本色瓶</td> </tr> <tr> <td>离心吸附柱</td> <td>220144</td> <td>50 套</td> <td>塑料袋</td> </tr> <tr> <td>使用手册</td> <td>220865sc</td> <td>1 份</td> <td>无</td> </tr> </tbody> </table>	成份	编号	规格	包装材料	革兰氏阳性细菌质粒 DNA 纯化溶液 A	220865a	13 mL	15mL 本色瓶	革兰氏阳性细菌质粒 DNA 纯化溶液 B	220865b	13 mL	15mL 棕色瓶	革兰氏阳性细菌质粒 DNA 纯化溶液 C	220865c	18 mL	30mL 本色瓶	溶菌酶干粉 (20KU/mg)	210808c	250mg	2.0mL 黄盖管	RNase A 溶液, 10mg/mL	220714	0.6 mL	2.0mL 本盖管	通用洗柱液	220143	50 mL	60mL 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	塑料袋	使用手册	220865sc	1 份	无
成份	编号	规格	包装材料																																						
革兰氏阳性细菌质粒 DNA 纯化溶液 A	220865a	13 mL	15mL 本色瓶																																						
革兰氏阳性细菌质粒 DNA 纯化溶液 B	220865b	13 mL	15mL 棕色瓶																																						
革兰氏阳性细菌质粒 DNA 纯化溶液 C	220865c	18 mL	30mL 本色瓶																																						
溶菌酶干粉 (20KU/mg)	210808c	250mg	2.0mL 黄盖管																																						
RNase A 溶液, 10mg/mL	220714	0.6 mL	2.0mL 本盖管																																						
通用洗柱液	220143	50 mL	60mL 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	塑料袋																																						
使用手册	220865sc	1 份	无																																						
<p><b>运输及保存</b></p>	<p>常温运输和保存, RNase A 溶液需要-20℃保存, 有效期一年。</p>																																								
<p><b>自备试剂</b></p>	<p>无</p>																																								
<p><b>使用方法</b></p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>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</li> </ol>																																								

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 rpm 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 uL 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 0.1mg 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 uL 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。
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。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 uL 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 rpm 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 rpm 离心 1 分钟，弃收集管中的废液。
13. 加入 500 uL 的通用洗柱液到离心吸附柱中，室温 12,000 rpm 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 rpm 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

	<p>样孔中)。</p> <p>16. 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 uL 65-80°C 预热的 DNA 洗脱液 (基因组 DNA 专用), 室温放置 2 分钟。</p> <p>17. 室温 12,000 rpm 离心 1 分钟, 离心管底溶液即质粒 DNA 溶液。</p>
<b>关联产品</b>	无内毒素质粒 DNA 纯化试剂盒