

质粒 DNA 纯化试剂盒（沉淀法）

使用手册 V1.0

产品及特点	碱变性法是最常见的质粒 DNA 提取方法,其过程是首先菌体经离心悬浮后,被 SDS 和碱裂解细胞,并且碱使基因组 DNA 和质粒 DNA 变性,随后用酸中和,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。如果用柱式法,则含质粒 DNA 的上清用离心吸附柱吸附质粒 DNA,洗去杂质,得到纯化的质粒 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. 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 ug/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	本产品大纸盒包装			
	成份	编号	规格	包装材料
	质粒 DNA 纯化溶液 A	221002a	13 mL	30mL 本色瓶
	质粒 DNA 纯化溶液 B	221002b	13 mL	30mL 本色瓶
	质粒 DNA 纯化溶液 C	221002c	18 mL	30mL 本色瓶
	RNase A 溶液,10mg/mL	220714	0.6 mL	2.0mL 蓝盖管
	去蛋白溶液	221002d	30mL	30mL 棕色玻璃瓶
	质粒沉淀液	221002e	30ml	30mL 本色瓶
	DNA 洗脱液 (基因组 DNA 专用)	220125	10 mL	10 mL 本色瓶
	使用手册	221002sc	1 份	无
运输及保存	常温运输和保存, RNase A 溶液需要-20℃保存,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 1-5 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 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 0.6mL 去蛋白溶液，充分震荡 2 分钟后常温 12,000rpm 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 rpm 离心 10 分钟，质粒 DNA 将形成沉淀，弃上清。
13. 加入 1mL 的通自备 75%乙醇，室温 12,000 rpm 离心 1 分钟，弃上清。
14. 室温 12,000 rpm 离心 1 分钟，取出残留液体（约 50uL）。
15. 室温短暂放置半分钟。
16. 加入 DNA 洗脱液 50-100uL 重悬沉淀，即得质粒 DNA 溶液。可以直接用于后续实验

关联产品

无内毒素质粒 DNA 纯化试剂盒

20220816dx