

天
净
沙
系
列

CAT#:80912-5

常温运输和保存，有低温成分

TIANDZ

大提柱式质粒 DNA_{OUT}

Column Max Plasmid DNAout

使用手册 V2.0

北京天恩泽基因科技有限公司

北京市海淀区上地信息路 26 号北京市留学人员海淀创业园中关村创业大厦 506

网址: www.tiandz.com; 电话: 400-6765278; 电邮: order@tiandz.com

<p>产品及特点</p>	<p>本试剂盒是用于质粒 DNA 大量制备与纯化的试剂盒。菌体先经碱裂解法处理，再通过离心吸附柱，专一结合 DNA，最后洗去杂质，高效快速提取质粒 DNA，全套操作可以在 30 分钟之内完成。使用本试剂盒可从 50-100 mL 过夜培养的菌液纯化得到高达 300-500 ug 的高纯度质粒 DNA (OD260/OD280 = 1.8-2.0)，可以直接用于酶切、转化、测序及 PCR 等。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 快速、步骤少，整个操作在半个小时之内完成。 2. 纯度高，采用本试剂盒提取的质粒 OD 比值在 1.8-2.0 之间。 3. 产量高，每毫升过夜培养的细菌可以提取到 2-5 ug/mL。 4. 用途广，适用于低拷贝和高拷贝质粒。 5. 价格低，比多数国内同类产品的价格更便宜。 																														
<p>规格及成分</p>	<table border="1" data-bbox="536 730 1321 1301"> <thead> <tr> <th>成份</th> <th>编号</th> <th>大纸盒包装</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>柱式质粒 DNAout 溶液 A</td> <td>60205a</td> <td>26 mL</td> </tr> <tr> <td>柱式质粒 DNAout 溶液 B</td> <td>60205b</td> <td>26 mL</td> </tr> <tr> <td>柱式质粒 DNAout 溶液 C</td> <td>60205c</td> <td>36 mL</td> </tr> <tr> <td>RNase A 溶液 (10mg/mL)</td> <td>3160</td> <td>0.6 mL</td> </tr> <tr> <td>大提离心吸附柱</td> <td>90303</td> <td>5 套</td> </tr> <tr> <td>通用洗柱液</td> <td>60408</td> <td>100 mL</td> </tr> <tr> <td>DNA 洗脱液 2.0</td> <td>111205</td> <td>10 mL</td> </tr> <tr> <td>使用手册</td> <td>80912sc</td> <td>1 份</td> </tr> </tbody> </table>				成份	编号	大纸盒包装	柱式质粒 DNAout 溶液 A	60205a	26 mL	柱式质粒 DNAout 溶液 B	60205b	26 mL	柱式质粒 DNAout 溶液 C	60205c	36 mL	RNase A 溶液 (10mg/mL)	3160	0.6 mL	大提离心吸附柱	90303	5 套	通用洗柱液	60408	100 mL	DNA 洗脱液 2.0	111205	10 mL	使用手册	80912sc	1 份
成份	编号	大纸盒包装																													
柱式质粒 DNAout 溶液 A	60205a	26 mL																													
柱式质粒 DNAout 溶液 B	60205b	26 mL																													
柱式质粒 DNAout 溶液 C	60205c	36 mL																													
RNase A 溶液 (10mg/mL)	3160	0.6 mL																													
大提离心吸附柱	90303	5 套																													
通用洗柱液	60408	100 mL																													
DNA 洗脱液 2.0	111205	10 mL																													
使用手册	80912sc	1 份																													
<p>运输及保存</p>	<p>RNase A 溶液需要低温运输、-20℃ 保存，其余成分可常温运输、室温保存，如有沉淀可加热溶解后再使用。</p>																														
<p>自备试剂</p>	<p>无。</p>																														
<p>使用方法</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. 用 250 mL 离心管收集 100-300 mL 菌液，5000 rpm 离心 10 分钟，去除上清。 2. 往细菌沉淀中加入 5 mL 柱式质粒 DNAout 溶液 A，充分振荡悬浮（第一次使用时需要将 RNase A 溶液全部加入到溶液 A 中并混合均匀，未用完的、含 RNase A 的溶液 A 需放 4℃ 保存）。注意：充分重悬细胞沉淀使之无细胞结块状物对于获得高的质粒产量十分重要。 3. 加入 5 mL 柱式质粒 DNAout 溶液 B，温和翻转 10 余次至蓝色变得均匀。室温放置 5-10 分钟裂解细菌。注意：避免剧烈振荡，否则细菌基因组 DNA 将断裂为小片段，与质粒难以分离，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，应该弃之不用并且速跟厂家联系。

4. 加入冰浴的 7mL 柱式质粒 DNAout 溶液 C，颠倒混匀，此时混合液应该从蓝色变成无色，如果不发生颜色变化，则表示柱式质粒 DNAout 溶液 C 变质，需要联系厂家。将混合液冰上放置 10 分钟，将有白色絮状物形成。注意不要过分振荡。
5. 6000 rpm 离心 10 分钟。如果离心管承受能力强，离心速度还可以适当提高以充分沉淀絮状物。
6. 将上清液（约 20 mL）转移到离心吸附柱中，放入 50 mL 套管中。由于此时的溶液比重较大，部分沉淀物悬浮在上清液中属正常，吸取上清时避开漂浮的沉淀物即可。
7. 6000 rpm 离心 5 分钟，质粒 DNA 将与离心吸附柱中的膜结合。弃穿透液。
8. 将 10 mL 通用洗柱液加入到离心吸附柱中，室温静置 2 分钟后 6000 rpm 离心 5 分钟，弃穿透液。
9. 重复上步一次，即将 10 mL 通用洗柱液加入到离心吸附柱中，室温静置 2 分钟后 6000 rpm 离心 5 分钟，弃穿透液。
10. 室温 6000 rpm 空甩 5 分钟，弃穿透液。注意：此步对去除残留通用洗柱液很重要，否则通用洗柱液会影响 DNA 的使用。
11. 将离心吸附柱放入一个自备的、干净的 50 mL 塑料离心管中，加 0.5 mL DNA 洗脱液 2.0（洗脱液如加热到 50-65℃效果更佳），室温静置 2 分钟后 6000rpm 离心 5 分钟，收集液即是质粒 DNA 溶液。
12. 本试剂盒中的离心吸附柱吸附能力较强，所以再用 1 mL DNA 洗脱液 2.0 洗脱 3-4 次才能把绝大部分质粒 DNA 洗脱下来。得到的 RNA 可以收集在一起立即使用或存放于-80℃待用。注：如果 DNA 洗脱液不够，可以用自备的 DEPC 水代替。注：一般情况下，第一次洗脱可以洗脱约 25%的质粒 DNA；第二次洗脱可以洗脱约 35%的质粒 DNA；第三次洗脱可以洗脱约 20%的质粒 DNA；第四次洗脱可以洗脱约 10%的质粒 DNA；第五次洗脱可以洗脱约 8%的质粒 DNA。
13. 合并所得质粒 DNA，立即使用或-20℃储存。如果需要使用液相内毒素清除剂清除质粒 DNA 中的内毒素，可以直接将此步所得的 DNA 溶液用于去内毒素处理。如果 DNA 浓度太低，可以另购本公司的核酸浓缩剂进行浓缩。

注意事项

1. 细菌培养时间一般为 12-16 小时，但接种量大时应减少时间。过度培养

	<p>会降低质粒的质量甚至导致质粒 DNA 突变。</p> <p>2. 溶液 A: 溶液 B: 溶液 C 的比例为 3: 3: 4。若细菌量增大, 需按此比例放大这些溶液的使用量。</p> <p>3. 随菌体增多应延长溶液 B 的作用时间, 直至溶液成粘稠透明状。但时间过长会导致质粒 DNA 变性。</p> <p>4. 加溶液 C 后形成的白色沉淀中有变性的蛋白质、细菌基因组 DNA 和细胞碎片, 离心后应避免带入到后续处理中。</p> <p>5. 通用洗柱液洗涤离心柱后必须甩干一次, 否则残留通用洗柱液中的乙醇会干扰后续实验。</p> <p>6. 质粒的具体产量跟细菌量、质粒拷贝数、质粒大小和操作规范程度密切相关。100 mL 高拷贝的菌液一般能得到 700-1500ug 质粒 DNA, 100 mL 低拷贝的菌液一般能得到 150-350ug 质粒 DNA。</p> <p>7. 纯化的质粒在电泳中表现为 2-3 条带有时甚至为 4-6 条带均属正常, 未分开的环套质粒, 易被误判为基因组 DNA。</p>
--	---

疑难解答	可能出现的问题	可能原因	建议解决方法
	质粒 DNA 中有基因组 DNA 污染	加入溶液 B 后剧烈振荡了细胞裂解液	加入溶液 B 后不要猛烈振荡或摇匀, 可轻轻颠倒离心管几次使充分混匀。
	质粒 DNA 产量低	细菌裂解率低	<p>1. 在加入溶液 A 后细菌沉淀没有充分混匀, 可漩涡振荡悬浮液使之充分混匀, 不要有块状物。</p> <p>2. 加入溶液 B 后, 延长孵育时间可获得清晰的裂解液。</p> <p>3. 如果装溶液 B 的瓶子没有盖紧, 溶液 B 可能失效, 需按以下配方重配: 0.2N NaOH, 1%SDS。</p>
		细菌培养物生长时间过长或不新鲜	不要于 37°C 培养超过 16 小时, 不要在分离质粒前长时间存放细菌培养物。
电泳上样时, 质粒 DNA 漂出点样孔	质粒 DNA 中有残留的乙醇	DNA 洗脱前离心柱必须干甩一次。	

关联产品	液相内毒素清除剂
-------------	----------