天净沙系列

CAT#:221086

常温运输和保存，有低温成分

天净沙

农杆菌质粒 DNA 纯化试剂盒（沉淀法）

Agrobacterium Plasmid DNA Purification Kit

使用手册 V1.0

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

市场上的基于碱变性法的质粒提取试剂盒都是为提取大肠杆菌质粒 DNA 的提取而开发的，本试剂盒是以碱变性法为基础、专门为农杆菌质粒 DNA 提取而开发的。其过程是首先菌体经离心悬浮后，被 SDS 和碱裂解，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。本产品具有下列特点:

1. 专门为农杆菌质粒提取优化，不适用于非农杆菌。
2. 适用于常见的穿梭质粒和双元质粒，不适用于 pTi 或 pRi 等大型质粒，提取这些质粒 DNA 需另购本公司专门的相关产品。
3. 快速、步骤少，整个操作在 40 分钟左右完成。
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，每毫升过夜培养的菌液可以提取到 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，一次可以处理 4-5 mL 过夜培养的菌液。
7. 纯度高，采用本试剂盒提取的质粒 A_{260}/A_{280} 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

本产品大扁盒包装

成份	编号	规格	包装
农杆菌质粒 DNA 纯化溶液 A	221086a1	10 mL	10 mL 本色瓶
细菌裂解增效剂	221086a2	25 mg	0.5 mL 白盖管
农杆菌质粒 DNA 纯化溶液 B	221086b	15 mL	15 mL 棕色瓶
农杆菌质粒 DNA 纯化溶液 C	221086c	14 mL	15 mL 本色瓶
RNase A 溶液，10 mg/mL	220714	1 mL	1.5 mL 本色管
质粒去蛋白溶液	221086d	30 mL	30 mL 棕玻瓶
核酸沉淀剂 B 型	230908	30 mL	30 mL 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	221086sc	1 份	无

运输及保存

常温运输和保存，RNase A 溶液需要-20℃保存低温运输，有效期一年。

自备物品

蒸馏水、75%乙醇

使用方法

1. 实验前将农杆菌质粒 DNA 纯化溶液 A（下面简称溶液 A）和农杆菌质粒 DNA 纯化溶

液 C（下面简称溶液 C）放冰上预冷。第一次使用时把本试剂盒提供的细菌裂解增效剂全部加入到溶液 A 中，轻柔混匀后待用。

2. 从筛选平板上挑取农杆菌单菌落至含抗生素的培养基中，28℃震荡培养 12-16 小时（摇床转速 200-300×g），使其 OD_{600} 达到 1.0-1.2（刚进入平台期）。注意：建议使用 YEP 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。
3. 用 1.5 mL 离心管收集 1.5 mL 过夜培养饱和菌液，4℃ 14,000×g 离心 1 分钟，弃上清，再短暂离心，吸弃残留液体。
4. 再加入 1.5 mL 过夜培养饱和菌液，4℃ 14,000×g 离心 1 分钟，弃上清，再短暂离心，吸弃残留液体。
5. 可以重复上步操作，直到累计得到 4-5 mL 菌液沉淀。
6. 用 1 mL 自备的蒸馏水重悬细菌沉淀，14,000×g 离心 1 分钟后弃上清。
7. 在沉淀中加入 150 μL 冰上预冷的溶液 A，用枪头充分吹打或漩涡振荡使菌体充分重悬。如果细胞未充分悬浮将会严重影响后续碱变性，降低质粒 DNA 回收率。
8. 室温放置 5 分钟。
9. 加入 300 μL 农杆菌质粒 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。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），溶液将变得粘稠。
10. 温和颠倒混匀 5-6 次（根据蓝色的均匀程度判断）后在冰上准确放置 10 分钟。注意：此步不要剧烈振荡，冰上放置时间也不要超过 10 分钟。
11. 加入 250 μL 冰上预冷的溶液 C，温和反复颠倒 4-6 次，溶液将变成无色，并有白色絮状沉淀产生。
12. 冰上放置至少 10 分钟让质粒 DNA 复性。不能短于 10 分钟。
13. 4℃ 14,000×g 离心 10 分钟，小心将上清液（只取 600 μL）转移到一个新离心管中。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。
14. 加入 10 μL 本试剂盒提供的 RNase A 溶液（10 mg/mL），室温放置 20 分钟。
15. 加入 600 μL 质粒去蛋白溶液，涡旋震荡器上充分震荡 2 分钟。
16. 4℃ 14,000×g 离心 2 分钟，将水相（无色部分）转移到一个新的离心管中，不要取有颜色的相。

	17. 加等体积的核酸沉淀剂 B 型，颠倒 30 秒混匀后 4℃ 14,000×g 离心 15 分钟，质粒 DNA 将形成沉淀，弃上清。 18. 加入 1 mL 的自备 75%乙醇，室温 14,000×g 离心 1 分钟，弃上清。 19. 室温 14,000×g 离心半分钟，用移液枪小心取出残留液体（约 50 μL）。 20. 室温短暂放置半分钟。 21. 加入 50-100 μL DNA 洗脱液（基因组 DNA 专用）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	大型农杆菌质粒 DNA 纯化试剂盒