

天
净
沙
系
列

CAT#:221086-50

常温运输和保存，有低温成分

BINGENE

农杆菌质粒 DNA 纯化试剂盒 (沉淀法)

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; 电话: 400-6605850; 电邮: order@bingene.com

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 开发的，本产品是以之为基础上专门为农杆菌质粒 DNA 提取优化，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。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. 快速、步骤少，整个操作在 40 分钟左右完成。 3. 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。 4. 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）。 5. 本产品足够 50 次微量提取。 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
	农杆菌质粒 DNA 纯化溶液 A	221086a	15 mL	15 mL 本色瓶
	农杆菌质粒 DNA 纯化溶液 B	221086b	30 mL	30 mL 本色瓶
	农杆菌质粒 DNA 纯化溶液 C	221086c	25 mL	30 mL 本色瓶
	RNase A 溶液，10mg/mL	220714	0.6 mL	1.5 mL 蓝盖管
	去蛋白溶液	221086d	30 mL	30 mL 棕色玻璃瓶
	质粒沉淀液	221086e	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，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），使其 OD600 达到 1.0-1.2。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。

2. 用 1.5 mL 离心管收集 1.5 mL 过夜培养饱和菌液，4℃ 12,000 rpm 离心 1 分钟，弃上清，再短暂离心，吸弃残留液体。
3. 再加入 1.5 mL 过夜培养饱和菌液，4℃ 12,000 rpm 离心 1 分钟，弃上清，再短暂离心，吸弃残留液体。
4. 可以重复上步操作，直到累计得到 3-5mL 菌液沉淀。
5. 第一次使用本试剂盒时，先将本试剂盒提供的全部 RNase A 溶液加入到农杆菌质粒 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。
6. 用 1mL 自备的无菌水洗涤细菌沉淀两次，即重悬细胞再离心弃上清。
7. 加入 300 uL 冰上预冷的溶液 A 到上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。
8. 室温放置 10 分钟。
9. 加入 600 uL 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），温和颠倒 5-6 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，也不要颠倒次数超过 6 次，否则基因组 DNA 断裂产生的片段非常容易污染质粒 DNA。
10. 冰上放置不超过 10 分钟。注意：冰上放置不要超过 10 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。
11. 加入 450 uL 冰上预冷的农杆菌质粒 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。
12. 冰上放置至少 10 分钟让质粒 DNA 复性。不能短于 10 分钟。
13. 在 4℃ 下 12,000 rpm 离心 5 分钟，小心将上清液转移到两个新离心管中，每管 600uL。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。
14. 加入 0.6mL 去蛋白溶液，充分震荡 2 分钟。
15. 4℃ 12,000rpm 离心 2 分钟，取水相（无色部分）到新的离心管中，不要取有颜色的部分。
16. 加等体积的质粒沉淀液，颠倒 30 秒混匀后 4℃ 12,000 rpm 离心 15 分钟，质粒 DNA 将形成沉淀，弃上清。

	17. 加入 1mL 的通自备 75%乙醇，室温 12,000 rpm 离心 1 分钟，弃上清。 18. 室温 12,000 rpm 离心 1 分钟，取出残留液体（约 50uL）。 19. 室温短暂放置半分钟。 20. 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