

农杆菌质粒DNA纯化试剂盒

产品货号：BA3237

产品规格：50T

产品简介：

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。

产品内容：

产品组成	50T	保存条件
农杆菌质粒DNA纯化溶液A	10mL	室温
细菌裂解增效剂	25mg	室温
农杆菌质粒DNA纯化溶液B	15mL	室温
农杆菌质粒DNA纯化溶液C	14mL	室温
RNase A溶液(10mg/mL)	1mL	-20℃
质粒去蛋白溶液	30mL	室温
核酸沉淀剂B型	30mL	室温
DNA洗脱液	10mL	室温

用户自备：

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200~300rpm），使其OD600达到1.0-1.2（刚进入平台期）。
 - ❖ 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1.5mL离心管收集1.5mL过夜培养饱和菌液，4℃ 14000rpm离心1分钟，弃上清，再短暂离心，吸弃残留液体。
4. 再加入1.5mL过夜培养饱和菌液，4℃ 14000rpm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4~5mL菌液沉淀。
6. 用1mL自备的蒸馏水重悬细菌沉淀，14000rpm离心1分钟后弃上清。
7. 在沉淀中加入150μL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300μL农杆菌质粒DNA纯化溶液B（下面简称溶液B），溶液将变得粘稠。
 - ❖ 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。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com

- ❖ 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。
- 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。
- ❖ 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 μ L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 $^{\circ}$ C 14000rpm离心10分钟，小心将上清液（只取600 μ L）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 μ L本试剂盒提供的RNase A溶液（10mg/mL），室温放置20分钟。
- 15. 加入600 μ L质粒去蛋白溶液，涡旋震荡器上充分震荡2分钟。
- 16. 4 $^{\circ}$ C 14000rpm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 $^{\circ}$ C 14000rpm离心15分钟，质粒DNA将形成沉淀，弃上清。
- 18. 加入1mL的自备75%乙醇，室温14000rpm离心1分钟，弃上清。
- 19. 室温14000rpm离心半分钟，用移液枪小心取出残留液体（约50 μ L）。
- 20. 室温短暂放置半分钟。
- 21. 加入50~100 μ L DNA洗脱液重悬沉淀，即得质粒DNA溶液。可以直接用于后续实验。

保存条件：

室温，其中RNase A溶液需置于-20 $^{\circ}$ C，有效期1年。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com