

版本号:250621

Agrobacterium/G+ Plasmid Mini Kit
农杆菌/革兰氏阳性率质粒小量快速提取试剂盒

目录号: PL09

❖ 试剂盒组成、储存、稳定性:

试剂盒组成	保存	50 次 (PL0901)	100 次 (PL0902)	200 次 (PL0903)
平衡液	室温	5 ml	10 ml	20 ml
RNase A	4°C	150 µl	250 µl	500 µl
Lysozyme	-20°C	0.5 ml	1 ml	2 ml
溶液 AG1	4°C	15 ml	25 ml	50 ml
溶液 AG2	室温	15 ml	25 ml	50 ml
溶液 AG3	室温	20 ml	35 ml	70 ml
去蛋白液 PE	室温	16 ml	32 ml	64 ml
		第一次使用前按瓶子标签说明加无水乙醇		
漂洗液 WB	室温	13 ml	25 ml	50 ml
		第一次使用前按瓶子标签说明加无水乙醇		
洗脱缓冲液 EB	室温	10 ml	10 ml	20 ml
吸附柱 AC	室温	50 个	100 个	200 个
收集管 (2ml)	室温	50 个	100 个	200 个

本试剂盒除低温组分在室温储存 12 个月不影响使用效果。

储存事项:

1. RNase A 保存在即用型甘油缓冲液中, 常温运输, 收到后, 不超过 25°C 室温至少保存 6 个月, 4°C 保存 12 个月, 长期保存放-20°C。
2. Lysozyme 溶菌酶常温运输, 收到后-20°C 保存 12 个月。
3. **第一次使用时, 可将试剂盒所带全部的 RNase A 加入溶液 AG1 后置于 4°C 可保存 3 个月左右。如果溶液 AG1 中 RNase A 时间较久失活了, 提取的质粒可能有微量 RNA 残留, 在溶液 AG1 中补加 RNase A 即可。**
4. 环境温度低时溶液 AG2 中 SDS 可能会析出, 出现浑浊或者沉淀, 可在 37°C 水浴加热几分钟恢复澄清, 重新混匀, 不要剧烈摇晃, 以免形成过量的泡沫。

❖ 产品介绍：

本试剂盒采用改进 SDS-碱裂解法裂解细胞，可提取农杆菌或者革兰氏阳性菌质粒。离心吸附柱内的硅基质膜在高盐、低 pH 值状态下选择性地结合溶液中的质粒 DNA，再通过去蛋白液和漂洗液将杂质和其它细菌成分去除，最后低盐、高 pH 值的洗脱缓冲液将纯净质粒 DNA 从硅基质膜上洗脱。

❖ 产品特点：

1. 离心吸附柱内硅基质膜全部采用特制吸附膜，柱与柱之间吸附量差异极小，可重复性好。克服了国产试剂盒膜质量不稳定的弊端。
2. 独有的去蛋白液配方，可以高效去除残留的核酸酶，即使是核酸酶含量丰富的菌株如 JM 系列、HB101 也可以轻松去除。有效防止了质粒被核酸酶降解。
3. 快速、方便，不需要使用有毒的苯酚、氯仿等试剂，也不需要乙醇沉淀。获得的质粒产量高、纯度好，可以直接用于酶切、转化、PCR、体外转录、测序等各种分子生物学实验。

❖ 注意事项

1. **所有的离心步骤如未加另外说明均在室温完成**，使用转速可以达到13,000 rpm 的台式离心机。
2. 提取质粒的量与细菌培养浓度、质粒拷贝数等因素有关。一般农杆菌质粒，**建议接种单菌落于1.5-5 ml加合适抗生素的LB培养基，过夜培养18-20个小时**，5 ml菌液可提取出约5-15 µg的纯净质粒。如果所提质粒为低拷贝质粒或大于10 kb的大质粒，应适当加大菌体使用量，使用5-10 ml过夜培养物，同时按比例增加AG1、AG2、AG3的用量，其它步骤相同。
3. 得到的质粒DNA可用琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测浓度与纯度。OD260值为1相当于大约50 µg/ml DNA。**电泳可能为单一条带，也可能为2条或者多条DNA条带**，这主要是不同程度的超螺旋构象质粒泳动位置不一造成，与提取物培养时间长短、提取时操作剧烈程度等有关。**本公司产品正常操作情况下基本超螺旋可以超过90%。**
4. **质粒DNA确切分子大小，必须酶切线性化后**，对比DNA分子量Marker才可以知道。处于环状或超螺旋状态的质粒，泳动位置不确定，无法通过电泳知道其确切大小。

❖ 操作步骤：（实验前请先阅读注意事项）

⇒ 第一次使用前请先在漂洗液 WB 瓶和去蛋白液 PE 瓶中按标签指示加入无水乙醇，充分混匀，加入后请及时在方框打钩标记已加入乙醇，以免多次加入！

⇒ 将 RNase A 全部加入溶液 AG1 中，混匀。每次使用后置于 2-8℃ 保存。

1. **柱平衡：**向吸附柱 AC 中加入 100 μ l 平衡液，13,000 rpm 离心 1 min，弃滤液，备用。

▲ 平衡液可以增强硅胶膜的吸附核酸能力，请使用当天处理的吸附柱。

2. 取 1.5-5 ml 过夜培养的菌液加入 1.5 ml 离心管，13,000 rpm 离心 30 sec，尽可能的倒干上清，收集菌体。

▲ 如使用收集超过 1.5 ml 菌液，可以离心弃上清后，在同一个 1.5 ml 管内加入更多的菌液，重复步骤 1，直到收集到足够的菌体。

3. 加 250 μ l 溶液 AG1 重悬菌体沉淀，移液器吹打或者涡旋振荡至彻底悬浮。

▲ 如果有未彻底混匀的菌块，会影响裂解，导致提取量和纯度偏低。

4. 加入 5 μ l Lysozyme 溶菌酶溶液，混匀，37℃处理 30 min。

▲ 难裂解的农杆菌老化菌，Lysozyme 可以多加到 10 μ l，建议最高不超过 10 μ l。

▲ 如果是难裂解的厚壁革兰氏阳性菌，提取效果不好，可以补加溶菌酶干粉到终浓度 5-10 mg/ml。

5. 加 250 μ l 的溶液 AG2，温和地上下翻转 6-8 次使菌体充分裂解，室温放置 4-5 min。

▲ 温和地混合，不要剧烈震荡，以免基因组 DNA 剪切断裂！所用时间不应超过 5 min！以免质粒受到破坏。此时菌液应变得清亮粘稠。如果很浑浊，可能由于菌体过多，裂解不彻底，应减少菌体量。

6. 加 350 μ l 溶液 AG3，立即温和地上下翻转 6-8 次，充分混匀此时会出现白色絮状沉淀。13,000 rpm 离心 10 min。

▲ 加入溶液 AG3 后应该立即混匀，以免产生 SDS 的局部沉淀。

▲ 如果追求最快速，离心时间可以改成 2 min。上清中含有少量微小白色沉淀对后续实验没有任何影响。如果上清中存在大量微小白色沉淀，可再次离心后取上清。

7. 小心吸取上清加入吸附柱 AC 中（吸附柱放入收集管中），避免吸取漂浮的白色沉淀。13,000 rpm 离心 30 sec，弃滤液。

▲ 偶然吸到少量漂浮的白色沉淀也不影响实验结果，上清中含有少量微小白色沉淀对后续实验无任何不良影响，后续过滤漂洗过程中都会去除。

8. 可选步骤：加入 500 μ l 去蛋白液 PE（请先检查是否已加入无水乙醇！），13,

000 rpm 离心 15 sec, 弃滤液。

▲ 此步骤为了去除痕量核酸酶等杂质, 如所用菌株为 XL-1 Blue、Top10 和 DH5α 等 endA 缺陷型菌株, 核酸酶含量低, 可省略此步骤。如所用菌株为 JM 系列、HB101 等 endA 菌株或野生型菌株, 核酸酶含量丰富, 残留核酸酶可能导致质粒降解或者下游酶切时候切散, 应做此步骤。

9. 加入 600 μl 漂洗液 WB (请先检查是否已加入无水乙醇!), 13, 000 rpm 离心 15 sec, 弃滤液。再加入 600 μl 漂洗液 WB 重复漂洗一次, 弃滤液。
10. 将吸附柱放回收集管中, 13, 000 rpm 离心 2 min, 尽量除去漂洗液, 以免漂洗液中残留乙醇抑制下游反应。
11. 取出吸附柱, 放入一个干净的离心管中, 向吸附膜的中央悬空滴加 30 μl-50 μl 洗脱缓冲液 EB, 室温放置 2 min, 13, 000 rpm 离心 1 min。

▲ 洗脱体积建议不少于 30 μl, 体积过小会影响核酸回收效率。

▲ 以下步骤都可以帮助提高 DNA 产物浓度:

洗脱缓冲液事先在 80°C-90°C 水浴中预热可提高产量。

将第一次洗脱液重新加入吸附柱, 室温放置 1 min, 13, 000 rpm 离心 1 min。洗脱两遍可提高浓度约 10%。