

农杆菌质粒提取试剂盒

一. 试剂盒货号 CAT#: AVK0100 / 产品清单:

组分名称	50T 规格/数量	100T 规格/数量	200T 规格/数量	保存
	CAT#: AVK0100S	CAT#: AVK0100M	CAT#: AVK0100L	
溶液 AB1	15ml X 1 瓶	25ml X 1 瓶	50ml X 1 瓶	室温/干燥
溶液 AB2	15ml X 1 瓶	25ml X 1 瓶	50ml X 1 瓶	室温/干燥
溶液 AB3	20ml X 1 瓶	40ml X 1 瓶	40ml X 2 瓶	室温/干燥
去蛋白液 RP	25ml X 1 瓶	50ml X 1 瓶	50ml X 2 瓶	室温/干燥
漂洗液 BW	50ml X 1 瓶	50ml X 2 瓶	100ml X 2 瓶	室温/干燥
洗脱缓冲液 EB	15ml X 1 瓶	15ml X 1 瓶	15ml X 1 瓶	室温/干燥
Rnase A (10mg/ml)	150ul X 1 支	300ul X 1 支	600ul X 1 支	室温/干燥
核酸纯化柱	50 套	100 套	200 套	室温/干燥
液体收集管	50 套	100 套	200 套	室温/干燥
说明书	1 份	1 份	1 份	—

二. 产品说明:

农杆菌质粒提取试剂盒是唯地生物开发的专门用于根癌农杆菌和发根农杆菌的质粒小量提取试剂盒,采用温和的细胞裂解液破碎农杆菌细胞,对质粒损伤更小,可提高质粒产量;操作简单,可在两小时内提出农杆菌质粒,提取的质粒纯度高,可直接转化大肠杆菌感受态,用于扩繁质粒。

三. 溶液 AB1 使用前需先加入 RNaseA 溶液,混匀,置 2-8°C 保存。

四. 操作流程:

1. 取 1-5 mL 农杆菌培养物, 12000 rpm 离心 1 min, 弃上清, 吸干水份。加入 250 μ L 的 AB1, 用移液器吹打混匀或涡旋振荡混匀。
2. 加入 250 μ L AB2 裂解液轻轻颠倒混匀 6-8 次(不要振荡), 室温放置 2-3 min, 此时菌液应变得清亮粘稠。
3. 加入 350 μ L AB3 中和液颠倒混匀 6-8 次, 此时会出现白色絮状沉淀。12000 rpm 离心 10 min (如果上清中还有微小白色沉淀, 可以再次离心后取上清)。
4. 上清转移至核酸纯化柱, 12000 rpm 离心 1 min。
5. 步骤 4 的流出液重新倒入核酸纯化柱中, 12000 rpm 离心 1 min。

6. 加入 500 μ L RP 去蛋白液，12000 rpm 离心 1 min。
7. 加入 500 μ L BW 漂洗液，12000 rpm 离心 1 min。
8. 重复步骤 7。
9. 再次离心（12000rpm，2 min）干燥柱膜，将纯化柱中的残余漂洗液去除。
10. 将纯化柱盖子打开，室温放置 3 分钟，以便纯化膜中的乙醇彻底挥发（此步骤可略过）。
11. 将纯化柱放置于一个干净的离心管中，向纯化膜中间部位加入 25-50 μ L 洗脱液 EB，室温放置 2 min，12000 rpm 离心 2 min 收集质粒（也可将洗脱液 65 $^{\circ}$ C 预热，或将加入洗脱液的纯化柱和新离心管一起放入 65 $^{\circ}$ C 金属浴 5 分钟，有助于提升洗脱效率）。

五. 关于农杆菌质粒拷贝数及大肠扩繁质粒的说明：

- 农杆菌中的质粒只有 1-5 个拷贝；而大肠杆菌中质粒拷贝数通常为 50-500 个/Cell；相同体积菌块提取的质粒，大肠是农杆菌的 50-100 倍。所以农杆菌提取的质粒无法通过电泳或分光光度计检测，也无法测序鉴定，无法酶切鉴定；可以作为 PCR 模板使用，也可以转化大肠杆菌扩繁质粒，通常建议使用量为：使用 2-5 μ l 用作 PCR 模板；使用 5-10 μ l 用于转化大肠杆菌。
- 转化大肠杆菌时应使用商业化的高效率感受态细胞（推荐唯地生物的 DH5 α Chemically Competent Cell，货号：DL1001；TOP10 Chemically Competent Cell，货号：DL1010）。

六. 注意事项

- 洗脱液体积不应少于 25 μ L，体积过小影响回收效率。
- 洗脱液 pH 值应在 7.0-8.5 之间，pH 低于 7.0 会影响洗脱效率。
- 加入 AB2 后不要剧烈振荡，以避免质粒断裂或基因组 DNA 断裂。
- 若产量偏低，可提高农杆菌菌液体积。

七. 注意事项：

- 1, 点板之前，阴性对照，阳性对照，试验组的 OD 值要调一致；起始 OD₆₀₀ 值一般为 0.5，根据实验结果也可以调整为 0.05-1.0 之间，但阴性对照，阳性对照，试验组的 OD 值一定要调一样。
- 2, 稀释倍数可根据实验调整，可按 10 倍稀释也可按 5 倍稀释，设置 3-5 个梯度均可。