
版本号:150120

BAC/PAC DNA Kit
BAC/PAC 大型质粒提取试剂盒

目录号: PL2001

❖ **适用范围:**

适用于BAC/PAC/P1/Cosmid等大型质粒制备

❖ **试剂盒组成、储存、稳定性:**

试剂盒组成	保存	20 次
RNaseA (10mg/ml)	-20℃	1.3ml
溶液 P1	4℃	130ml
溶液 P2	室温	100 ml
溶液 PIII	室温	110 ml
杂质清除剂 A	室温	3 ml
杂质清除剂 B	室温	30 ml
内毒素清除剂	-20℃	10 ml

本试剂盒在室温储存 12 个月不影响使用效果。

储存事项:

1. **第一次使用时,将试剂盒所带全部的 RNase A 加入溶液 P1 后(终浓度 100 μ g/ml)置于 4℃保存。如果溶液 P1 中 RNase A 失活,提取的质粒可能会混杂有微量 RNA 残留,在溶液 P1 中补加 RNase A 即可。**
2. 内毒素清除剂在 4℃可保存一个月,如果要长期保存,建议保存在-20℃!
3. 环境温度低时溶液 P2 中 SDS 可能会析出出现浑浊或者沉淀,可在 37℃水浴加热几分钟,即可恢复澄清,不要剧烈摇晃,以免形成过量的泡沫。
4. 避免试剂长时间暴露于空气中产生挥发、氧化、pH 值变化,各溶液使用后应**及时盖紧盖子**。

❖ 产品介绍:

常规的离心柱型质粒抽提试剂盒并不适用于 BAC/PAC/P1/Cosmid 等大型质粒 DNA 的抽提。这主要是因为大型质粒 DNA 分子量很大，常常会超过 100kb 而且一般拷贝数低产量低，使用常规的离心柱吸附膜吸附效率和产量很低而且过膜会打断这些大分子量的质粒 DNA。本试剂盒采用改进碱裂解法从培养菌中提取质粒 DNA，采用独特的溶液配方和内毒素清除试剂，只需要几次简单离心去除蛋白质、多糖、内毒素、RNA 等杂质，获得高质量的质粒 DNA。纯化 DNA 的 OD_{260/280} 通常在 1.8 左右，得到的质粒可直接应用于细胞转染甚至动物体内实验等对 DNA 纯度要求很高的工作中。纯化后期过程均在 1.5ml 离心管中操作，方法简单，不需特殊设备，无需过柱，不用酚氯仿抽提；基本可完全回收细菌裂解释放出的质粒，不必担心质粒 DNA 的丢失。本方法提取纯化质粒 DNA，对质粒损伤小，即使是 100kb 甚至 200kb 以上的大型质粒或超大型 BAC/PAC 质粒，只要碱裂解法能够提取，就可以有效纯化。此外溶液型的试剂可以按照比例放大缩小进行小提/中提/大提，最后可选择任意小体积溶解质粒，浓度可高达 3μg/μl。

❖ 产品特点:

1. 不需要使用有毒的苯酚，氯仿等试剂，也不需要乙醇沉淀。快速、方便、从 150 ml 大肠杆菌 LB(Luria-Bertani)培养液中，可快速提取典型产量 30-50μg 高纯度 BAC 质粒 DNA，提取率达 80-90%。
2. 获得的质粒产量高，超螺旋比例高，纯度好，可直接用于转染、测序、文库等各种分子生物学实验。
3. 内毒素含量极低 (<0.1 EU/μg DNA)，可直接应用于细胞转染。

❖ 注意事项

1. 提取的质粒量与细菌培养浓度、质粒拷贝数等因素有关。如果所提质粒为低拷贝质粒或大于 10kb 的大质粒，应加大菌体使用量，同时按比例增加 P1、P2、PIII 的用量。
2. 提取大质粒时操作动作要轻柔，应该使用剪大了开口的吸头，防止机械剪切对 DNA 的损坏。
3. DNA 沉淀液沉淀离心后，可能看不到明显沉淀。如未见沉淀，担心 DNA 丢失，可保留上清液，待完成全部操作后电泳鉴定，以确定是否获得终产物（数百微克 DNA 离心沉淀在管的侧壁上，可能无法看到明显团块）。

4. 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 μ g/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 95%。

❖ **操作步骤：（实验前请先阅读注意事项）**

⇒ **提示：**将 RNase A 全部加入溶液 P1 中，混匀，使用后置于 2-8 $^{\circ}$ C 保存。

1. 取过夜培养菌 150 ml 左右菌液（最大不超过 180ml-200ml），装入合适的离心瓶中，10,000 x g 于 4 $^{\circ}$ C 离心 2 min 沉淀菌体，完全弃除上清。
2. 加入 5 ml 溶液 P1，充分混悬震荡菌体沉淀，使其完全分散开，至无絮块存在。细菌悬液移入 50 ml 离心管中，室温放置 3~5 min。

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。

3. 加入 5 ml 溶液 P2，轻轻颠倒离心管 6~8 次，室温放置 4-5 min，使细菌完全裂解，溶液透明。

温和地混合，不要剧烈震荡，以免基因组 DNA 剪切断裂！所用时不应超过 5 分钟！以免质粒受到破坏。此时菌液应变得清亮粘稠，如果菌体少，很快清亮粘稠后就可以做下一步，不是一定要准确的 5 分钟。如果未变得清亮，可能由于菌体过多，裂解不彻底，应减少菌体量。

4. 加 5 ml 溶液 PIII，立即颠倒离心管 6~8 次，充分混匀，至白色絮状物产生。上述裂解液于 4 $^{\circ}$ C 12,000~16,000 x g 离心 10~15 min，小心吸出上清，移入新的 50 ml 离心管中。

加入溶液 PIII 后应该立即混匀，以免产生 SDS 的局部沉淀。

5. 加入 10 ml 异丙醇，颠倒离心管，充分混匀。

注意：使用异丙醇沉淀，蛋白杂质和盐离子共沉淀较少，可能看不到明显的较大团块沉淀，但是质粒还是可以完全沉淀下来，不影响实际的质粒产量。如果你习惯看见较大的沉淀团块操作，可以选择 2 倍体积的无水乙醇沉淀。

6. 于 4 $^{\circ}$ C 12,000~16,000 x g 离心 10 min，小心弃去上清，倒置于吸水纸上轻轻沥干残余液体，加入 3-5ml 70%乙醇漂洗一遍，最高速离心 5 分钟，弃上清，晾干沉淀。

DNA 沉淀如果干燥过头，DNA 将无法完全溶解，但是如果乙醇没有晾干挥发干净，残留太多，也会造成 DNA 无法完全溶解。

注意：异丙醇离心沉淀后，质粒纯度很高吸附在管底和侧壁可能看不见沉淀，但是不影响产量，后续步骤仔细吹打管底和沉淀所在的侧壁涮洗溶解质粒。

7. 加入 1.4 ml 溶液 P1 完全溶解沉淀团块，注意附着在管底和侧壁上的质粒沉淀虽然可能看不见，也要吹打管底和沉淀所在的侧壁涮洗下来（大质粒可用宽口吸管轻轻吹打辅助溶解）。然后将质粒溶液转入 2 个新的 1.5 ml 离心管中（每个 700 μ l）。

可选步骤（一般不需要）：如果菌株 RNA 丰富有微量 RNA 残留，可在此步骤后将质粒溶液 60 $^{\circ}$ C 孵育 15 min 消化 RNA。

8. 每管加入 55 μ l 杂质清除液 A，颠倒充分混匀后加入约 0.1 体积（约 80 μ l）冰预冷的内毒素清除剂，颠倒旋转 7-10 次（30 秒左右）充分混匀，冰浴或者冰上放置 \geq 5 分钟，中间偶尔颠倒混匀几次。

内毒素清除剂加入上清后，上清会变得浑浊，但是冰浴后应恢复清亮。

注意：如果不需要去内毒素用于转染，可在此步骤只加入 55 μ l 杂质清除液 A，充分混匀后冰上放置 5 分钟，离心后小心取上清转入一个新管，直接接步骤 11。

9. 42 $^{\circ}$ C 水浴，溶液又会变为浑浊，颠倒混匀后 42 $^{\circ}$ C 温育 5 分钟。
10. 室温 14,000 x g 离心 5 min 分相（温度低时，内毒素清除剂无法分相，因此必须至少 20 $^{\circ}$ C 以上室温离心或者保证冬季转头温度 20 $^{\circ}$ C 以上）。上层水相含 DNA，下层蓝色油状相含内毒素和其它杂质。将含 DNA 的上层水相转移到新管（注意不要吸到蓝色油状层，里面含内毒素等杂质），弃油状层。

溶液必须分为上下两相，否则应重复步骤 9-10。

11. 将上一步所得上层水相中加入等体积杂质清除液 B（约 750 μ l），轻柔混匀，4 $^{\circ}$ C 14,000 x g 离心 10 min，弃上清（注意不要丢失 DNA），轻轻加入 1 ml 70%乙醇洗涤，离心弃上清，共两次，室温倒置晾干 5~10 min 使乙醇完全挥发。
12. 每个离心管加适量 TE 或者纯水（50~100 μ l）溶解沉淀（可在 37 $^{\circ}$ C 水浴中振荡以辅助溶解）。要注意很多质粒 DNA 可能附着在离心管侧壁上，即使看不见，也应该充分吹打侧壁溶解回收质粒 DNA。

最后沉淀可以根据需要选择任意小体积溶解，这样可以得到很高浓度的转染级质粒 DNA（高达 3-5 μ g/ μ l）。如果有需要，客户也可以选择更大体积溶解。