杭州新景生物试剂开发有限公司
地址：浙江省杭州市西湖科技经济园西园一路 8 号 4 幢 5F
邮编：310030　电话：0571-87381295 传真：0571-87381297

BAC/PAC DNA 中量试剂盒说明书

产品组成

BAC/PAC DNA 中量试剂盒 Cat. No.	20 次制备 1013020
RNase A	520 µl
Buffer I	130 ml
Buffer II	110 ml
Buffer N3	110 ml
Buffer A	6 ml
Buffer ETR	10 ml
Buffer B	40 ml
说明书	1 份

产品储存

1. RNase A 可室温运输，收到产品后请将 RNase A、Buffer ETR 置于 2~8℃贮存。加入 RNase A 的 Buffer I 请置于 2~8℃贮存。如果 Buffer I 储存时间超过 6 个月，需补加 RNase A 至终浓度为 100 µg/ml。
2. 其他试剂与物品如果储存于室温（15~25℃），可在两年内保持使用性能无明显变化；如果将产品储存于 2~8℃，可延长产品的有效期至两年以上（2~8℃储存的产品使用前应先使产品恢复到室温后再使用）。

技术支持

杭州新景生物试剂开发有限公司研发部：e-mail: technical@simgen.cn，电话：400-0099-857。

产品介绍

本试剂盒采用碱裂解法抽提大片段质粒 DNA，适合于从 60～120 ml 细菌培养物（LB 培养基）中提取大片段质粒 DNA。特别设计的去内毒素步骤，确保获取的质粒 DNA 适用于测序、体外转录与翻译、限制性内切酶消化、转化、真核细胞转染、基因治疗、DNA 疫苗等分子生物学实验。

用户需自备的试剂与物品

1. 异丙醇、70% 乙醇、TE 缓冲液。
2. 50ml 离心管、2 ml 离心管、移液器及吸头
3. 一次性手套、纸巾及防护用品
4. 可使用 50 ml 离心管及 2ml 离心管的离心机
5. 旋涡振荡器、水浴锅、恒温培养箱
6. 冰浴

使用前准备

1）将水浴锅设置到 42℃（如果需要操做去内毒素步骤）。
2）向装有 RNase A 的螺旋盖管中加入 1ml Buffer I，混匀后再将溶液吸回到装有 Buffer I 的瓶子中，并在标签的方框中打勾作好“RNase A 已加”的标记，置于 2~8℃保存。
3）将部分 1ml 吸头剪去约 1cm 长度的头部，用于吸取或转移大片段质粒 DNA 溶液。
4）当室温低于 15℃时，使用 Buffer II 前应先观察试剂是否有白色沉淀产生，如有沉淀则应于 37℃水浴直至沉淀溶解后再使用。

操作步骤：

1）用自备的 50 ml 离心管收集 60~120 ml 过夜培养的细菌培养物（若使用丰富培养基，菌液体积应减半或更少），将离心管倒置于纸巾上 1min，除尽上清。

2）加入 5 ml 已加入 RNase A 的 Buffer I ，旋涡振荡悬浮细菌沉淀。

* 充分悬浮的细菌呈均一的悬浊液，不应留有可见的小菌块，否则将严重影响最后质粒的产量。

3）加入 5 ml Buffer II，温和并充分地上下翻转 6-8 次混合均匀，使菌体充分裂解。

* 使用 Buffer II 前确认溶液中没有可见沉淀存在；Buffer II 使用完后应盖紧瓶盖，避免与空气长期接触。

* 此步骤不可用旋涡振荡器混匀，否则将导致最后制备的质粒中混有基因组 DNA。

* 当细菌裂解充分时，溶液应呈粘稠的半透明状；如果达不到上述效果，可能因细菌用量过多所至，可增加翻转的次数以达到细菌充分裂解的效果。注意此步骤不应超过 5 分钟。

4）加入5 ml Buffer N3，温和地翻转离心管直至溶液中残留的蓝色沉淀全部转变为淡黄色沉淀，4℃，≥12,000×g 离心15分钟。

* 此步骤不可用旋涡振荡器混匀，否则将导致最后制备的质粒中混有基因组 DNA。

5）小心地转移上清到一个洁净的50 ml离心管中，加入10 ml异丙醇，盖紧管盖，温和地上下翻转10次混合均匀。4℃，≥12,000×g 离心10分钟。

6）弃离心管中上清液，将50ml 离心管中倒置于纸巾上约1分钟以吸干残留液体。

7) 向50 ml离心管中加入 5 ml 70%乙醇，盖上管盖，温和地翻转离心管4~6次，4℃，≥12,000×g 离心5分钟。

8）弃50ml离心管中上清液，开盖，室温静置10-15分钟晾干DNA沉淀。

* 如果此步骤结束后，核酸纯化柱中还能闻到乙醇味，应适当延长静置时间。

9）加入 1.4 ml Buffer I，用剪掉头部的 1ml 吸头非常轻柔地吹打管底及管壁上的 DNA 沉淀，直至沉淀全部溶解，然后将 DNA 溶液均分到两个 2 ml 离心管中（每管 700 µl），室温静置 5 分钟。

* 大片段质粒 DNA 容易被剪切断裂，必须用剪掉头部（约 1cm 长度）的 1ml 吸头轻柔地吹打 DNA 沉淀，不可用旋涡振荡溶解。

* 高纯度的 DNA 可能不形成可见的白色沉淀，而是以雾状沉淀的形式沉积在管壁上，请特别注意吹打形成沉淀一侧的管壁。

10）在每个离心管中加入 100 µl Buffer A，温和地翻转离心管混合均匀。

* 如果无需去除内毒素，本步骤操作完成后直接跳到步骤 14)操作。加入 Buffer A 后溶液会转变为黄色。

11）每管加入 150 µl Buffer ETR，温和地翻转离心管 7-10 次混匀，冰浴 10 分钟，使溶液呈透明状。

12）42℃水浴 5 分钟，使溶液呈现浑浊状。室温≥12,000×g 离心 3 分钟。

* 如果离心机有制冷功能，请将温度设置到 25℃，否则可能导致分相不成功。

13）小心吸取上清液转移到 2 个洁净的 2ml 离心管中（每管约 0.8 ml）。

* 必须用剪掉头部（约 1cm 长度）的 1ml 吸头转移上清，勿吸取下相，内毒素聚集在离心管底部的淡黄色下相中。

14）加入 0.8 ml Buffer B ，温和地翻转离心管混合均匀，≥14,000×g 离心 10 分钟。

15）弃尽上清，保留管底 DNA 沉淀。每管加入 1.5 ml 70%乙醇, 13000 rpm 离心 5 分钟。

* 注意勿丢弃管底的 DNA 沉淀。

16）重复步骤 15）一次，弃尽上清，超净台上室温干燥 DNA 沉淀 10 分钟。

17）每管加 50~100 µl TE 缓冲液或去离子纯水，轻弹离心管使 DNA 沉淀溶解，将 DNA 储存于-20 ℃备用。

* 大片段质粒 DNA 容易被剪切断裂，不可用旋涡振荡溶解，可以在 37℃摇床，200 rpm 放置 10 分钟帮助溶解。

* 如果 DNA 的拷贝数较低，可减少加入的 TE 缓冲液的体积以增加质粒 DNA 的浓度。