

## BAC/PAC 大型质粒提取试剂盒

### KD408(20 次)

#### 试剂盒组成、储存、稳定性:

试剂盒组成	保存	KD408(20 次)
RNase A (10mg/ml)	4°C	1.3ml
溶液 P1	4°C	130ml
溶液 P2	室温	100 ml
溶液 P3	室温	100 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	4°C	10 ml

试剂盒在室温储存 18 个月不影响使用效果

#### 试剂盒储存:

1. RNase A, 4°C保存 12 个月, 长期保存需放置于 - 20°C。
2. 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 100ug/ml) 置于 4°C保存。如果 RNase A 失活, 需要在溶液 P1 补加 RNase A (终浓度 100ug/ml)。
3. 内毒素清除剂常温运输, 4°C可以保存 12 个月, 长期保存放-20°C。
4. 如果室温比较低, 溶液 P2 中 SDS 可能会析出沉淀, 可在 37°C水浴加热几分钟, 不要剧烈摇晃。
5. 各溶液使用后应及时盖紧盖子, 避免长时间和空气接触。

#### 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。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<sub>260/280</sub> 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 纯度要求很高的实验中。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，方便，快速。从 150-200 ml 大肠杆菌 LB((Luria-Bertani)培养液中，可快速提取 0.5-2mg 纯净的高拷贝质粒 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 (< 0.1EU/μg DNA)，可直接应用于细胞转染。

## 注意事项：

1. 如果提取质粒为低拷贝质粒或大于 10kb 的质粒，应加大菌体使用量，同时按比例增加 P1、P2、P3 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。OD<sub>260</sub> 值为 1 相当于大约 50μg/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。本公司产品正常情况下基本超螺旋可以超过 95%。
5. 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。处于环状或者超螺旋状态的质粒，泳动位置不确定，无法通过电泳知道确切大小。

**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°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°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 5ml 溶液 P3, 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°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 P3 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°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 $\mu$ 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 $\mu$ l 杂质清除液 A，颠倒充分混匀后加入约 **0.1 体积(约 80 $\mu$ 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 $\mu$ 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 $\mu$ 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（100~200 $\mu$ 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 5-10 $\mu$ g/ $\mu$ l）。如果有需要，也可以选择更大体积溶解。**