

HiPure BAC DNA Mini Kit

大型质粒小中提试剂盒

本产品采用硅胶柱和改良碱裂解法，适合于从10~15ml 细菌培养液中提取高达 20 μ g 转染级大型质粒DNA，如P1、BAC、Cosmid、Fosmid等。纯化的质粒可直接用于自动测序、酶切、PCR、标记和细胞轨染等。30 分钟可以完成数个样品的抽提工作，整个操作过程不需接触酚氯仿等有机物抽提，也不需用到耗时的醇类沉淀。

产品组份

产品编号	P1151-01	P1151-02	P1151-03
包装次数	10次	50 次	250 次
RNase A	1 mg	5 mg	20 mg
Buffer P1	7 ml	30 ml	150 ml
Buffer P2	7 ml	30 ml	150 ml
Buffer N3	7 ml	30 ml	150 ml
Buffer EWB	7 ml	40 ml	180 ml
Buffer PW2*	6 ml	20 ml	50 ml
Buffer TE	1.8 ml	10 ml	30 ml
HiPure DNA Mini Column I	10	50	250
2 ml Collection Tube	10	50	250

版本：202401

保存条件

本产品可在室温下保存 18 个月。RNase A 干粉室温运输和保存，长期保存(>3 个月)置于-20~-8 $^{\circ}$ C。低温下，Buffer P2 可能会有沉淀形成，使用前 37 $^{\circ}$ C 水浴使沉淀完全溶解。

准备事项

- 加入0.2~0.5ml Buffer P1 至RNase A 干粉中，吸打 5~10 次让RNase A 充分溶解，然后把RNase A 全部转移至 Buffer P1 中，于2-8℃保存，有效期为 6 个月。
- 按瓶子标签所示，加入 4 倍体积的无水乙醇稀释 Buffer PW2，于室温保存。

实验步骤

1. **将含质粒的菌种接种于含10~15ml LB/抗生素培养液的50~100ml培养瓶中，37℃摇床培养12~16小时以扩增质粒。**

培养方法：在无菌条件下，用灭菌牙签挑取一单菌落，转移10~15ml 含相应抗生素的LB培养基中，37℃摇床(200-300rpm)培养14-16小时。培养瓶容量最好超过培养液体积的4-5倍。平板挑菌培养时，可能会存在一些菌株生长缓慢，培养过夜后可通过菌液密度或OD600来判断。培养良好的菌液(LB培养液)，OD600应该在2.0-3.0。

2 x YT或TB培养液因菌体密度很高，菌液用量不应超过6ml。2 x YT或TB培养液中菌体生长速度过快，不利于质粒充分复制，应尽量避免使用。

2. **3,000~5,000 × g离心10分钟收集10~15ml 菌体，倒弃废液并在吸水纸上拍打吸尽残液。**

若使用2ml离心管收集菌体时,于13,000 × g离心1分钟收集菌体，倒弃废液后再加入菌液离心收集直至达到要求。HiPure DNA Mini Column I最高可吸附20µg DNA。

3. **加入 500µl Buffer P1/RNase A 混和液，高速涡旋或吸打充分重悬菌体。**

使用前确保 RNase A 已加到 Buffer P1。彻底重悬细菌对产量很关键，重悬后应看不到细菌团块。若涡旋未能充分打散菌块，用移液器吸打数次。使用15~50ml离心管收集菌液时，这一步转移重悬液至2.0ml离心管中以方便第6步的高速离心。

4. **往重悬液中加入 500µl Buffer P2，颠倒混匀 6~8 次，室温放置2分钟。**

涡旋会造成基因组污染。混匀后溶液应变得粘稠而透亮。当菌液用量达15ml时，裂解液会极为粘稠，属于高密度碱裂解类型，混匀时需要更多次数的颠倒和翻转动作，并轻轻振荡让菌体充分裂解，形成均一无团块的裂解液，总裂解时间不要超过5分钟。

5. **加入 500µl Buffer N3至裂解液中，立即颠倒 8~10 次让溶液彻底中和。**

加入Buffer N3后应立即稍快速上下颠倒混匀，以避免产生局部沉淀。当菌液用量达15ml时，属于高

密度碱裂解类型，中和时会形成大块且紧密的沉淀团，混匀时需要更多次数的颠倒和翻转动作，并轻轻振荡让大块沉淀团分散成较少的团块，让Buffer N3完全渗透到沉淀内部进行充分中和。

6. 13,000 × g 离心 15分钟。
 7. 转移1.2ml上清液至2.0ml离心管，加入0.36ml异丙醇(~0.3倍体积)，颠倒混匀6-8次，室温静置2分钟。
 8. 将HiPure DNA Mini Column I装在收集管中，把一半体积的混合液转移至柱子中。13,000 × g 离心 30~60 秒。
 9. 倒弃滤液，把柱子套回收集管中，转移剩余混合液至柱子。13,000 × g离心30-60秒。
 10. 倒弃滤液，把柱子套回收集管中，加入 600µl Buffer EVB 至柱子中，静置1分钟，13,000 × g 离心30~60 秒。
 11. 倒弃滤液，把柱子套回收集管中。加入 600µl Buffer PW2至柱子中。13,000 × g 离心30~60 秒。
 12. 倒弃滤液，把柱子套回收集管中。加入 300µl Buffer PW2 (已用无水乙醇稀释)至柱子中。13,000 × g 离心 2分钟。
- 取出柱子时不要颠倒或侧转，不要让柱子的底部碰到收集管中的液体。若碰到了液体，倒弃废液后，把柱子放回收集管中再离心一次甩干柱子。
13. 倒弃滤液，把柱子套回收集管中。13,000 × g 离心3分钟甩干柱子。
 14. 把柱子套在1.5ml离心管中，加入30µl 预热至65℃的Buffer TE至柱子膜中央，静置3分钟。13,000 × g离心1分钟。
 15. 把洗脱液再转移至柱子的膜中央，静置3分钟，13,000 × g离心1分钟。丢去柱子，把质粒保存于-20℃。

该方法得到的DNA存在少量基因组DNA污染，若需要彻底去除基因组DNA污染，用ATP Dependent DNase(如Takara Code No. 2225)进一步去除基因组DNA污染。

常见问题

1. DNA 产量低

- **质粒拷贝数：**载体因拷贝数差异会造成质粒产量明显的波动。高拷贝数的载体常有2~3倍的产量波动，(每毫升培养过夜的菌液，高拷贝数的质粒载体产量为 3~16 μ g)。长片段质粒 (>7KB) 和表达型载体常以中低拷贝数为主，每毫升菌液的产量约为0.5~2 μ g。
- **菌种问题：**菌种保存过程中存在质粒丢失现象，养菌前最好先划线活化，以稳定产量。
- **细胞未充分裂解：**细菌须在 Buffer P1/RNase A 中充分重悬，成团细菌因无法裂解会降低产量。
- **试剂准备有误：**Buffer P2 若有沉淀析出需加热溶解。Buffer PV2 未加入乙醇稀释或体积不准确(乙醇浓度需控制在 80%)。

2. 基因组 DNA 污染

- **培养时间太长：**菌液培养时间需控制在 12~16 小时。
- **裂解问题：**加入 Buffer P2 时，必须轻柔颠倒混匀；处理多个样品时，从加入 Buffer P2 时算起，总时间不要超过 4 分钟。

3. 下游实验结果不理想

- **质粒降解：**用 end A⁺ 的菌株如 HB101 或其它野生型菌株，含有高丰度的核酸酶，最好使用 HiPure Plasmid Plus Kits 系列。
- **膜脱落：**硅胶膜在离心过程中可能会发生脱落。脱落到质粒中硅胶膜是不溶解的。10,000 x g 离心 2 分钟后再把质粒转移至新的离心管中。