

目 录

简 介	2
原 理	2
组 成	3
保质期	4
准备工作	4
1. HiPure BAC DNA Mini Kit 离心方案	5
2. HiPure BAC DNA Maxi Kit 提取方案	7
3. 基因组 DNA 污染的去除	10
常见问题回答	11

版本: 2013-10

简介

HiPure BAC DNA Kits 为低拷贝数质粒和大型质粒，如 BAC、PAC、Fosmid、Cosmid、P1 等的制备提供了一种快速且经济的方法。试剂盒采用硅胶柱纯化技术，可在 30 分钟(小量)和 60 分钟(大量)完成抽提工作，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。纯化的质粒 DNA 可直接用于酶切、测序、PCR 等运用。

	BAC DNA Mini Kit	BAC DNA Maxi Kit
产品编号	P1151	P1152
菌液用量	1~15ml	200~400ml
柱子结合能力	20 μ g	200 μ g
使用的离心机	小型离心机	大型离心机和桶状水平式离心机
洗脱体积	15~30 μ l	400~600 μ l
载体类型	低拷贝数质粒，大型质粒如 BAC、PAC、Fosmid、Cosmid、P1 等	

原理

HiPure 质粒提取系列将经典的碱裂解法和硅胶柱纯化技术结合在一起，采用独特的结合体系，为大型质粒制备提供简单快速的方法。其流程主要包括：

- **碱裂解法处理**

离心收集细菌，加入缓冲液重悬，加入碱溶液裂解，加入中和液进行中和；通过离心或过滤去除沉淀，得到上清液。

- **硅胶柱纯化**

得到的上清液，经特殊缓冲液调节结合条件后，上柱吸附 DNA，而其它杂质则不被吸附而去除。

- **洗涤除盐和洗脱出核酸**

硅胶柱吸附质粒后，再通过含乙醇的洗液洗涤脱盐；最后用 Tris 缓冲液或灭菌水洗脱出 DNA。得到的 DNA 可直接用于下游的各种用途。

组 成

HiPure BAC DNA Mini Kit

Cat.No.	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	180 ml
Buffer P2	7 ml	30 ml	180 ml
Buffer N3	7 ml	30 ml	180 ml
Buffer B4	2 ml	10 ml	40 ml
Buffer PW2*	6 ml	20 ml	2 x 50 ml
Elution Buffer	1.8 ml	20 ml	60 ml
HiPure DNA Mini Column I	10	50	250
2 ml Collection Tube	10	50	250

HiPure BAC DNA Maxi Kit

Cat.No.	P1152-01	P1152-02	P1152-03
包装次数	2 次	10 次	50 次
RNase A	5 mg	20 mg	2 x 60 mg
Buffer P1	40 ml	180 ml	2 x 500 ml
Buffer P2	40 ml	180 ml	2 x 500 ml
Buffer LEN3	20 ml	90 ml	500 ml
Buffer LN4	100 ml	400 ml	4 x 500 ml
Buffer PW1	12 ml	60 ml	300 ml
Buffer PW2*	20 ml	50 ml	2 x 100 ml
Buffer TE	10 ml	20 ml	100 ml
Clear Maxi Syringe	2	10	50
HiPure DNA Maxi Column II	2	10	50
50 ml Collection Tube	2	10	50

保质期

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)放置于-20~8℃。收到产品后把 RNase A 放置 2-8℃保存。低温下，溶液可能会有沉淀形成(特别是 Buffer P2)，37℃水浴使沉淀完全溶解后使用。当 RNase A 加入 Buffer P1 后，可在 2-8℃保存 6 个月。

准备工作

- 加入 0.2~0.5ml Buffer P1 至 RNase A 干粉中，吸打混匀 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。
- 无水乙醇
- 异丙醇
- LB 培养液和相应的培养管
- 使用前，Buffer B4 需用异丙醇进行稀释，于室温保存。

P1151-01	加入 8 ml 异丙醇
P1151-02	加入 40 ml 异丙醇
P1151-03	加入 160 ml 异丙醇

- 在 Buffer PW2 中，加入无水乙醇，并于室温保存。

P1151-01	加入 24 ml 无水乙醇
P1151-02	加入 80 ml 无水乙醇
P1151-03	每瓶中加入 200 ml 无水乙醇
P1152-01	加入 80 ml 无水乙醇
P1152-02	加入 200 ml 无水乙醇
P1152-03	每瓶中加入 400 ml 无水乙醇

1. HiPure BAC DNA 小量提取(P1151)

该方案采用离心方法，适合于从 5-15ml 细菌培养液中提取 2-20 μ g 低拷贝数质粒 DNA 和大型质粒 DNA，如 P1、BAC、Cosmid、Fosmid 等。

1. 将带目的质粒菌种接种于 5~15 ml LB/抗生素培养基的 50ml 培养管中。37 $^{\circ}$ C 摇床培养 12~16 小时扩增质粒；
甘油保藏的菌种须在固体培养平板上划线挑取单菌落进行小量扩增，不要直接用甘油保藏菌种进行培养。培养瓶或培养管的体积必须大于或等于培养液体积的 4 倍。
2. 3,000 \times g 离心 10 分钟，收集 5~15 ml 菌体。
3. 倒弃培养基，并反扣于吸水纸上吸尽残液。**加入 550 μ l Buffer P1/RNase A 混合液**，涡旋重悬细菌。
4. **加入 550 μ l Buffer P2**，轻轻颠倒离心管 8~10 次。放置 2 分钟，其间偶尔颠倒混匀几次。
轻轻颠倒混匀，不要涡旋，否则会引起基因组 DNA 断裂而污染。如有必要，可一直颠倒至裂解液变得粘稠清亮。这一步操作时间不要超过 4 分钟。
5. **加入 550 μ l 预冷至 4 $^{\circ}$ C 的 Buffer N3**，温和颠倒混匀 10-15 次。把所有的混合液转移至 2ml 离心管中。
6. \geq 13,000 \times g 离心 15 分钟。
7. 转移上清液至 5ml 离心管中。**加入 1/2 倍体积 Buffer B4 (已用异丙醇稀释)至上清液**。颠倒混匀，室温静置 2 分钟。
8. 将 HiPure DNA Mini Column I 套在收集管中。**转移 700 μ l 混合液至柱子中**。8,000 \times g 离心 30~60 秒。
9. 倒弃滤液，把柱子套回收集管中。再转移 700 μ l 混合液至柱子中。8,000 \times g 离心 30~60 秒。重复该步骤直到所有混合液都从柱子中离心过滤。
10. 倒弃滤液，把柱子套回收集管中，**加入 600 μ l Buffer PW2 (已用无水乙醇稀释)至柱子中**。8,000 \times g 离心 30-60 秒；
使用前 Buffer PW2 必须用无水乙醇稀释。稀释条件请按瓶子上的标签指示或说明书第 4 页。

11. 倒弃滤液，把柱子套回收集管中。**12,000 × g 离心 2 分钟。**

注：不要忽略此步。这一步可去除残留在柱子的乙醇。

12. 把柱子套在灭菌的 1.5ml 离心管中。**加入 15~30 μ l 预热至 65℃ 的 Elution Buffer 或灭菌水至柱子的膜中央。**静置 3 分钟。12,000 × g 离心 1 分钟。

若需提取质粒的稳定性或延长质粒保存时间，最好用 Buffer TE 洗脱 DNA。

13. **再加入 15~30 μ l 预热至 65℃ 的 Elution Buffer 或灭菌水至柱子的膜中央。**静置 3 分钟。12,000 × g 离心 1 分钟。

14. 丢去柱子，把质粒保存于-20℃。

注：该方法得到的 DNA 存在少量的基因组 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。

2. HiPure BAC DNA 大量提取(P1152)

该方案采用大量结合柱，适合于从 400ml 细菌培养液中提取 10-200 μ g 高纯度的大型质粒 DNA，如 P1、BAC、Cosmid、Fosmid 等。

1. 将含质粒的菌种接种于含有 1ml LB/抗生素培养液的培养管中。37 $^{\circ}$ C 摇床培养 8 小时以小量扩增菌液。
甘油保藏的菌种须在固体培养平板上划线挑取单菌落进行小量扩增，不要直接用甘油保藏菌种进行培养。培养瓶或培养管的体积必须大于或等于培养液体积的 4 倍。
2. 在 2L 培养瓶中加入 400ml 含抗生素的 LB 培养液。接种 1/1000 初级菌液至培养瓶中，37 $^{\circ}$ C 摇床培养 12-16 小时。
3. 3,000-5,000 \times g 离心 15 分钟，收集 500ml 菌液中的菌体。
4. 倒弃培养基，并反扣于吸水纸上轻轻拍打吸尽残液。**加入 16ml Buffer P1/RNase A 混合液**，涡旋重悬细菌。把重悬液转移至合适的高速离心管中。
使用前，须确保 RNase A 已经加到 Buffer P1 中。彻底重悬细菌对获得高产量是相当重要的，重悬后应看不到细胞团块。
5. **加入 16ml Buffer P2**，轻轻颠倒离心管 8~12 次。放置 2 分钟，其间偶尔颠倒混匀数次。
轻轻颠倒混匀，不要涡旋，否则会引起基因组 DNA 断裂而污染。菌液用量较大时，裂解液会很粘稠而难混匀，可放置 2 分钟，其间常颠倒混匀以提高裂解效果。
6. **加入 8ml 预冷至 4 $^{\circ}$ C 的 Buffer LN3**，立即轻轻颠倒混匀 10-15 次。
7. 3,000~5,000 \times g 离心 20 分钟。
8. **取出过滤器(Clear Maxi Syringe)活塞，把第七步的上清倒入过滤器中**。把过滤器的出水口对准已准备好的瓶子中。把活塞插入过滤器。推动活塞使裂解液过滤到 50ml 离心管中。
9. **测量滤液体积，加入等倍体积的 Buffer LN4 至上清液中**。颠倒或涡旋混匀。
10. 将 HiPure DNA Maxi Column 套在 50ml 收集管中。转移 20ml 上清液至柱子中。3,000-5,000 \times g 离心 3 分钟。

11. 倒弃流出液，把柱子套回收集管中。把剩余的上清液转移至柱子中。3,000-5,000 \times g 离心 3 分钟。重复此步直至所有的上清液都转移至柱子中离心过滤。
12. 倒弃滤液，把柱子套回收集管中。**加入 5 ml Buffer PW1 至柱子中，静置 2 分钟。**3,000-5,000 \times g 离心 3 分钟。
13. 倒弃滤液，把柱子套回收集管中。**加入 15 ml Buffer PW2（已用无水乙醇稀释）至柱子中。**3,000-5,000 \times g 离心 3 分钟。
14. 倒弃滤液，把柱子套回收集管中。 $>4,000 \times$ g 离心 15 分钟。
15. 取出吸附柱，于 50~55°C 烘干 10 分钟。
16. 把柱子套在灭菌的 50ml 离心管中(自备)。**加入 0.8ml Buffer TE 至柱子膜中央，静置 3 分钟。** $>3,000 \times$ g 离心 3 分钟。
17. **再把洗脱液转移至柱子膜中央，**静置 3 分钟。 $>3,000 \times$ g 离心 3 分钟。
18. 弃去柱子，把质粒保存于-20°C。

注：该方法得到的 DNA 会存在少量的基因组 DNA 污染，可选 ATP Dependent DNase，如 Takara Code No. 2225，进一步去除基因组 DNA 污染。

3. 微量的基因组 DNA 污染的去除

试剂盒采用经典的碱裂解法和独特的结合液，可高效地去除基因组 DNA 的污染。对大多数的实验而言，并不需要对纯化的质粒 DNA 进行处理。若下游的应用，对基因组 DNA 污染比较敏感，我们建议对纯化的 DNA 进行酶法去除线性 DNA 的污染，以得到高纯度的超螺旋 DNA。该方案采用 ATP 依赖型的 DNase，该酶可高效消化各种开环或线性的 DNA(如基因组 DNA)，而不会降解超螺旋的质粒 DNA。

1. 取 BAC、Cosmid 或其它质粒溶液，按下表配制反应液：

试剂	体积
25mM ATP	8 μ l
10 X Reaction Buffer	20 μ l
ATP-Dependent DNase	2 μ l(10U/ μ l)
取质粒 DNA(<20 μ g)或 BAC DNA (<5 μ g)	X μ l
灭菌水	Y μ l
总体积	200 μ l

- 37°C 水浴 1-16 小时。
- 70°C 水浴 30 分钟。
- 加入 100 μ l Buffer N3 和 100 μ l 异丙醇，颠倒混匀。
- 将 HiPure Mini Column I 套在收集管中。转移混合液至柱子中。8,000 \times g 离心 30-60 秒。
- 倒弃滤液，把柱子套回收集管中，加入 600 μ l Buffer PW2 (已用无水乙醇稀释)至柱子中。8,000 \times g 离心 30-60 秒；
- 倒弃滤液，把柱子套回收集管中。12,000 \times g 离心 2 分钟。
- 把柱子套在灭菌的 1.5ml 离心管中。加入 15-30 μ l 预热至 65°C Elution Buffer 或灭菌水至柱子的膜中央。静置 5 分钟。12,000 \times g 离心 1 分钟。
- 再加入 15-30 μ l 预热至 65°C Elution Buffer 或灭菌水至柱子的膜中央。静置 5 分钟。12,000 \times g 离心 1 分钟。丢去柱子，把质粒保存于-20°C。

常见问题回答

该列表可能有利于解决提取过程所碰到的问题。此外，Magen 的技术人员也可以随时为您提供服务，若您对试剂盒存在问题或建议，或您在分子生物学碰到问题，都请您联系我们。我们将竭尽所能为您排忧解难。

现象及原因	解决方法
产量低或无产量	
质粒拷贝数低	大型质粒 DNA 一般拷贝数都极低。1ml 菌液的产量约为 0.1-0.5 μ g。
真菌污染	培养液受到真菌污染，需重新培养。
培养条件有问题	检查培养条件
菌种老化	进行中大量提取时，若菌种是在甘油中保存时，建议先划线活化菌种，挑单菌落接种至 1ml 培养液中培养 8 小时后再扩大培养。
Buffer P2 有沉淀或失效	Buffer P2 中的 SDS 在低温时可能会有沉淀析出，使用前需水浴使其溶解；Buffer P2 可能会被空气中 CO ₂ 中和而失效。
细菌没有彻底重悬	细菌沉淀团必须在 Buffer P1/RNase A 混合液中充分重悬，成团的细菌因无法裂解会降低产量。
Buffer PW2 没有用乙醇稀释	Buffer PW2 在使用前须用无水乙醇进行稀释。收到试剂盒后，应尽快把乙醇加到 Buffer PW2 中，以防止微生物的污染。
洗脱时有问题或洗脱体积太少	洗脱核酸最好使用 Elution Buffer (10mM Tris, pH8.5)，灭菌水因 pH 较低，显酸性，而导致洗脱效率下降。洗脱液必须加到柱子的膜的中央；增加洗脱次数或洗脱液的体积。
裂解不充分	处理较多菌体时，加入 Buffer P2 裂解时释放的基因组 DNA 让溶液变得非常粘稠而难于混匀。增加颠倒混匀的次数，并室温静置 2-3 分钟，其间偶尔颠倒混匀让细菌充分裂解。
中和不充分	处理较多菌体时，裂解液非常粘稠，加入 Buffer N3 需要更多的颠倒混匀次数，以到达充分中和效果。理想的中和效果：白色沉淀物比较分散，溶液均匀，沉淀内部不存在黄色粘稠液体。
角度离心机	DNA Maxi Column 因内径比较大，须用水平/桶状离心机。使用固定角度离心机机会大大降低柱子的结合效率。
Buffer B4 没有加入异丙醇	Buffer B4 使用前必须用异丙醇进行稀释。

基因组 DNA 污染

Buffer P2 裂解过度	加入 Buffer P2 时, 必须轻柔颠倒混匀; 处理多个样品时, 加入 Buffer P2 时算起, 总时间不要超过 4 分钟。
Buffer N3 中和不充分或不及时	加入 Buffer N3 后, 应立即轻轻颠倒混匀, 一般需要 6~10 次。若处理菌液较多时, 需要 10~20 次才能让溶液充分中和。
细菌培养时间过长	培养太长时间的菌液中含有死去的细菌和降解的 DNA。菌液的培养时间不要超过 16 小时。

RNA 污染

Buffer P1 不含有 RNase A	使用前, 没有把 RNase A 加到 Buffer P1 中。
Buffer P1/RNase A 混合液过期	Buffer P1/RNase A 混合液可于 4℃ 保存 6 个月。超过 6 个月后, 可能需要再加入 RNase A。
细菌密度太高	减少菌液的使用量。

下游实验结果不理想

盐分污染	加入 Buffer PW2 后, 静置 5 分钟后, 再离心, 然后再加入 80%乙醇洗涤柱子。
核酸酶污染	使用 endA+ 的菌株如 HB101 或其它野生型菌株, 可能含有高丰度的核酸酶, 最好使用 HiPure Plasmid Plus Kits。
乙醇污染	确保离心干燥时, 离心速度必须达到要求。
膜材料脱落	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×g 离心 2 分钟, 然后再把质粒转移至新的离心管中。

若以上的解答还是无法解决您的问题, 请您联系我们。

Note: