

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 15~30μl 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 15~30μl 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 × 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 × 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 × g 离心 3 分钟。
14. 倒弃滤液，把柱子套回收集管中。 >4,000 × 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 × 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 × 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。10,000xg 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: