

大型质粒提取试剂盒简明说明书 (BW-PD1311) 产品简介

本试剂盒可从小体积培养菌液中快速纯化得到 BAC、PAC、柯斯质粒和 P1。基于一种改良的碱裂解工艺，特别适用于离心柱。该提取步骤已被不同大肠杆菌菌株内的多种低拷贝柯斯质粒、BAC、PAC、P1 验证测试过。此外，本试剂盒也可用于高拷贝质粒的提取。

产品构成

Catalog#	-00	-01	-02
Preps	10	50	250
Mini Columns	10	50	250
2 mL Collection Tubes	10	50	250
Buffer X1	5 mL	25 mL	125 mL
Buffer X2	5 mL	25 mL	125 mL
Buffer X3	5 mL	25 mL	125 mL
BAC Binding Buffer*	1 mL	5 mL	25 mL
DNA Wash Buffer**	3 mL	12 mL	50 mL
Elution Buffer	1 mL	5 mL	25 mL
RNase A (20 mg/mL)	45 µL	225 µL	1125 µL
User Manual	1	1	1

要点

- RNase A: 使用前将提供的所有 RNase A 瞬时离心后加入 Buffer X1, 使用后将 Buffer X1/RNase A 置于 4°C 保存。
- DNA Wash Buffer: 使用前请将 12 mL (BW-PD1311-00) 或 48 mL (BW-PD1311-01) 或 200 mL (BW-PD1311-02) 96-100% 乙

醇加入至 DNA Wash Buffer 瓶内。

- BAC Binding Buffer: 使用前请将 4 mL (BW-PD1311-00) 或 20 mL (BW-PD1311-01) 或 100 mL (BW-PD1311-02) 异丙醇加入至 BAC Binding Buffer 瓶内。
- 强烈推荐 2xYT 培养基培养柯斯质粒、BAC、PAC 和 P1。
- Buffer X2: 低于室温时会沉淀, 使用前请检查 SDS 沉淀, 若形成沉淀, 请于水浴锅温浴溶解。使用后保证 Buffer X2 瓶盖拧紧, 避免因空气中的 CO₂ 引起酸化。
- 预冷 Buffer X3, 有助于沉降。
- 在洗脱前提前 65°C 预热 ddH₂O 或 Elution Buffer。
- 步骤 6 使用 4°C 离心。

产品贮存及稳定性

本试剂盒自生产之日起可保存 12 个月。所有试剂及用品可保存于室温 (15-25°C)。加入 RNase A 后的 Buffer X1 应储存于 4°C。

实验前需准备的材料

- 小型低温台式离心机 (12,000 ×g, 4°C)
- 无菌水
- 无菌 1.5 mL 和 2 mL 离心管
- 10-15 mL 培养管
- 96-100% 乙醇
- 96-100 异丙醇

操作步骤 (BAC、PAC、P1 标准纯化)

1. 接种新鲜的单个菌落到 **2-5 mL** LB 培养基或 **2 mL** TB 培养基 (含适量抗生素), 37°C 震荡 (~300 ×g) 培养 20-24 h。
2. 12,000 ×g 离心 2 min, 弃上清。
3. 加入 **400 µL Buffer X1/RNase A**, 用移液器或涡旋震荡仪充分悬浮细菌细胞。
注: 充分重悬有利于菌体裂解和中和。
4. 加入 **400 µL Buffer X2**, 轻轻地反转 5-10 次以混匀 (可见澄清的裂解液), 室温静置 5 min。避免剧烈混匀, 否则会引起染色体 DNA 断裂。请勿静置超过 5 min。(Buffer X2 使用后请拧紧)
5. 加入 **400 µL Buffer X3 (预冷)**, 反转 10-15 次以轻柔混匀, 直至絮状白色沉淀形成。冰上孵育 5 min。请勿涡旋混匀, 否则会引起 DNA 断裂。
6. 4°C, 12,000 ×g 离心 10 min。立即进行下一步。
7. 小心将上清液转移至 **2 mL Collection Tube**, 加入 **450 µL BAC Binding Buffer**, 颠倒混匀 3-5 次。
注: 使用前按要求加入异丙醇至 BAC Binding Buffer 中。
8. 转移 700 µL 样品至 **Mini Column**, 12,000 ×g 室温离心 15 s, 弃滤液。转移剩余的样品至 **Mini Column**, 12,000 ×g 室温离心 30 s, 弃滤液。
9. 加入 **700 µL DNA Wash Buffer** (使用前按要求加入乙醇), 12,000 ×g 室温离心 30 s, 弃滤液。
10. 将 **Mini Column** 开盖放回至 **2 mL Collection Tube**, 12,000 ×g 离心 1 min。
11. 将 **Mini Column** 转移至一个干净的 1.5 mL 离心管, 在膜中

加入 **35-50 μ L** 预热至 65°C 的 **Elution Buffer** 或 ddH₂O，静置 5 min。

12. 12,000 \times g 离心 1 min 洗脱质粒 DNA。将洗脱的 DNA 二次上柱，12,000 \times g 离心 1 min 洗脱质粒 DNA。

注：提前 65°C 预热 **Elution Buffer** 或 ddH₂O 以及加入洗脱液后 65°C 静置 5 min 有利于提高 DNA 产率。

注：第一次洗脱可得到约 60-70% 的质粒 DNA，二次洗脱可回收到剩余 20-30% 的质粒。

低拷贝质粒/柯斯质粒的纯化

预产量：2 mL LB 培养基的 BAC 产量大约在 0.6 μ g，5 mL 培养基约 1 μ g。若使用 TB 培养基，则 1.5 mL 培养基的产量约在 1 μ g，5 mL 培养基约 3 μ g。

培养体积：使用容量为培养基 4 倍的烧瓶或试管，以确保细菌生长的最佳条件。不要超过最大培养体积，否则会降低产量和纯度。

常见问题解答

问题	可能原因	建议
低得率	裂解不完全	建议使用 LB 或 TB 培养基(含适量抗生素)培养。标准步骤提取质粒时，不要超过 5 mL 菌液。
		Buffer X2 加入后，细胞没有完全裂解。确保重悬细胞沉淀，充分裂解。
		加入 Buffer X2 后，继续颠倒混匀直至澄清的裂解液。
	如果瓶盖没拧紧，重配 Buffer X2(0.2 M NaOH 和 1% SDS)	
	菌液不新鲜	使用新鲜的甘油培养菌，避免反复冻融。确保新鲜的培养皿接种菌。任何剩余的菌液都可以用作甘油菌储存。
没有 DNA	裂解液制备错误	检查缓冲液的储存时间和使用时间，确保加入的 Buffer 量正确。
	Buffer X2 沉淀	Buffer X2 使用前预热，溶解沉淀。
	菌体没有充分重悬	Buffer X1 加入后应充分重悬菌体。未获得均匀的细胞悬液前不要加入 Buffer X2。
基因组污染	加入 Buffer X2 后过度混匀	加入 Buffer X2 后请勿涡旋混匀或震荡。
	细菌过度培养	过度生长的细菌含有裂解的细胞和降解的 DNA，培养时间不要超过 16 h。
储存后质粒降解	核酸内切酶含量高	加热灭活。
RNA 污染	Buffer X1 中未加 RNase A	在 Buffer X1 中加入 RNase A。
	质粒跑出点样孔	洗脱前确保没有干燥 DNA，无乙醇残留。

杭州倍沃医学科技有限公司

BIOMIGA (中国)

www.biomiga.com.cn

400-115-2855

info@biomiga.com.cn