

HiPure BAC DNA Maxi Kit

低拷贝无内大提质试剂盒

本产品适合于从200~500ml 细菌培养液中提取高达100~2500 μ g 转染级的大型质粒 DNA，如P1、BAC、Cosmid、Fosmid、以及常规的质粒等。纯化的质粒可直接用于自动测序、酶切、PCR、标记和细胞转染等。60 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

Cat.No.	P1152-01	P1152-02	P1152-03
包装次数	2 次	10 次	50 次
RNase A	5 mg	30 mg	2 x 60 mg
Buffer P1	45 ml	220 ml	2 x 550 ml
Buffer P2	45 ml	220 ml	2 x 550 ml
Buffer N3	45 ml	220 ml	2 x 550 ml
Buffer LN4	1.8 ml	10 ml	50 ml
Buffer PW2*	10 ml	10 ml	20 ml
Buffer TE	1 ml	1.8 ml	10 ml
Buffer ER2	1 ml	3 ml	15 ml
Clear Maxi Syringe	2	10	50
HiPure DNA Mini Column III	2	10	50
2 ml Collection Tube	2	10	50

版本：202401,P3

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℃。低温下，Buffer P2 可能会有沉淀形成，使用前 37℃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. 将含目的质粒的大肠杆菌菌种接种于含 1ml LB/抗生素培养基的 5-10ml 培养管中，37℃摇床培养 6~8 小时进行小量扩增菌液。

培养方法：在无菌条件下，用灭菌牙签挑取一单菌落，转移 1ml 含相应抗生素的 LB 培养基中，37℃摇床(200-300rpm)培养 6-8 小时。甘油保存菌种在保存过程可能会丢失载体，先划平板进行活化，用灭菌牙签挑取一单菌落进行初步培养。

2. 在◆1L 培养瓶加入 200ml LB 培养液；或在■2L 培养瓶中加入 500ml LB 培养液，接种 0.001 倍初级菌液至培养瓶中，37℃摇床培养 12-14 小时。

培养瓶容量最好超过培养液体积的 4-5 倍，培养良好的菌液(LB 培养液)，OD600 应该在 2.0-3.0。使用 YT 或 TB 培养液时，建议不要超过 80ml/200ml。

3. 3,000~5,000rpm 离心 10 分钟收集◆200ml 或■500ml 菌液，倒弃培养基，在吸水纸上轻轻拍打以吸尽残液。

4. 加入◆10ml 或■20ml Buffer P1/RNase A 混和液，高速涡旋或吸打充分重悬细菌。

充分重悬细菌对产量很关键，重悬后应看不到明显的菌块。

5. 加入◆10ml 或■20ml Buffer P2，温和上下颠倒并转动离心管 6~8 次，室温放置 3 分钟，其间颠倒数次。

颠倒混匀不要涡旋。充分裂解后，整个溶液变成均一的溶液而且透亮。涡旋会造成基因组污

染。当菌液用量达 500ml 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直至形成均一无团块的裂解液。

6. 加入◆10ml 或■20ml Buffer N3 至裂解液，上下颠倒混匀 10~15 次或直至形成蛋花状悬浊液。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。当菌液用量较多时，中和时会形成大块且紧密沉淀团，混匀时需要更多次数的颠倒和翻转动作，并稍稍振荡让大块沉块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。
7. 3,000~5,000rpm 离心 10 分钟。
8. 取出过滤器(Clear Maxi Syringe)活塞，把全部上清液倒入针筒，插入并推动活塞让上清液过滤至合适的容器中。
9. 测量滤液体积，加入 0.6 倍体积的异丙醇，颠倒 10~15 次，转移混合液至合适的高速离心管中。4°C, 12,000 × g 离心 30 分钟。
10. 倒弃上清液，短暂离心收集液滴，吸尽全部残液。按方案 A 过柱纯化（低拷贝）或方案 B 异丙醇沉淀纯化（中高拷贝）。

HiPure DNA Mini Column III 最高吸附力只能达到 100µg，若质粒产量预计超过 100µg 时，按方案 B 进行操作。

方案A：过柱纯化（低拷贝）

11. 加入 0.7ml Buffer P1/RNase 混合液，室温放置 10~15 分钟，其间轻轻振荡让 DNA 完全溶解。若需要彻底去除基因组 DNA 污染，加入适量的 ATP-Exonuclease 和 ATP 至样品中，混匀后 37 度放置 60 分钟消化基因组 DNA。
12. 加入等倍体积的 Buffer LN4，颠倒混匀 6-8 次。
13. 将 HiPure DNA Mini Column III 柱套在收集管中，转移一半体积的混合液至柱子中。13,000 × g 离心 30~60 秒。
14. 倒弃滤液把柱子套回收集管中，转移余下的混合液至柱子。13,000 × g 离心 30~60 秒。
15. 倒弃滤液把柱子套回收集管，加入 600µl Buffer PW2 至柱子。13,000 × g 离心 30~60 秒。
16. 倒弃滤液把柱子套回收集管，加入 600µl Buffer PW2 至柱子。13,000 × g 离心 30~60 秒

17. 倒弃滤液，把柱子套回收集管中。13,000 × g 离心 2 分钟。
18. 把柱子套在灭菌的 1.5ml 离心管中，加入 70~100 μ l 预热至 65℃ 的 Buffer TE 至柱子的膜中央。静置 3 分钟。13,000 × g 离心 1 分钟。
19. 再把洗脱液转移至柱子膜中央，静置 3 分钟，13,000 × g 离心 1 分钟洗脱 DNA。弃去柱子，把质粒保存于-20℃。

方案 B：异丙醇沉淀纯化（高拷贝）

11. 加入 0.9ml Buffer P1/RNase 混合液至 DNA 沉淀中，涡旋 5 秒，放置 5~10 分钟，其间轻轻振荡让 DNA 完全溶解，转移至 2.0ml 离心管中，加入 0.1ml Buffer N3，颠倒混匀。
若质粒产量超过 1mg 时，用灭菌水稀释至 1.6ml，加入 0.16ml Buffer N3，混匀。若质粒产量超过 2mg 时，用灭菌水稀释至 2.8ml，加入 0.3ml Buffer N3，混匀，降低质粒浓度，有利于第 12 步的提升去除内毒素的效果。
12. 加入 0.1ml Buffer ER2 至样品中，颠倒混匀 6-8 次，冰上放置 10~15 分钟，其间颠倒数次。42-50℃ 温育 3-5 分钟，室温下，13,000 × g 离心 3 min，转移上清液至新的离心管中。
离心后管底分层成红色液层。若质粒用于动物注射或高敏应用，建议重复第 12 步两次以达到无内毒素级。若上清液体积超过 1.5ml 时，转移至 2~3 个 2.0ml 离心管中。
13. 加入 0.7 倍体积（上清液体积）的异丙醇，颠倒混匀 10-15 次。室温静置 5min，13,000 × g 离心 15min。
离心后，DNA 沉淀物有可能看不到，特别是处理中低拷贝数载体时，DNA 产量太少形成的沉淀更不可见。受离心机角度影响，部分 DNA 沉淀可能粘附的管壁上。若 DNA 沉淀粘附不紧，离心后取出离心管后再颠倒数次让沉淀从管壁上脱落，再重复离心步骤。
14. 小心倒弃上清液，加入 1.0ml 的 75%乙醇，涡旋 5 秒，13,000 × g 离心 3min。
15. 小心倒弃上清液，再短暂离心，吸尽所有残液，空气干燥 5~10min。
16. 加入适量灭菌水至沉淀中，涡旋混匀，室温放置 5-10min 让质粒充分溶解。