

## BAC/PAC DNA 小量提取试剂盒

### E.Z.N.A.<sup>®</sup> BAC/PAC DNA Mini Kit

货号	D2156-00	D2156-01	D2156-02
反应次数	5 次	50 次	200 次
MicroElute <sup>®</sup> DNA Columns	5 个	50 个	200 个
2 mL Collection Tubes	5 个	50 个	200 个
T1 Buffer	5 mL	20 mL	60 mL
T2 Buffer	5 mL	20 mL	60 mL
T3 Buffer	5 mL	20 mL	60 mL
BAC Binding Buffer	1.5 mL	5 mL	15 mL
Elution Buffer	5 mL	10 mL	40 mL
SPM Buffer	3 mL	30 mL	60 mL
Linear Polyacrylamides	15 $\mu$ L	120 $\mu$ L	450 $\mu$ L
RNase A	50 $\mu$ L	100 $\mu$ L	400 $\mu$ L
User Manual	✓	✓	✓

#### ★ 保存方式及稳定性

1. 按条件保存的试剂盒保质期为 24 个月（见盒外失效日期），所有组分均可常温运输；
2. 收到试剂盒后，请把 RNase A 置于-20°C作长期保存；
3. RNase A 加入到 T1 Buffer 后请置于 2-8°C保存；
4. T2 Buffer 在不使用时，请务必拧紧瓶盖，避免长时间暴露于空气中；
5. 当贮存温度较低时，T2 Buffer 及 T3 Buffer 易析出沉淀，请在使用前把整瓶试剂置于 37°C中，至沉淀完全溶解，充分混匀后再使用。
6. 本试剂盒仅限科学研究使用。

#### ★ 实验前准备

1. 将整管 RNase A 加入到 T1 Buffer 瓶内，混匀后 2-8°C保存；

2. 按照下表提示, 使用【无水乙醇】对 SPM Buffer 进行稀释, 使用【异丙醇】对 BAC Binding Buffer 进行稀释, 稀释后均置于室温保存。

货号	SPM Buffer 稀释 无水乙醇 加入量	BAC Binding Buffer 稀释 异丙醇 加入量
D2156-00	7 mL	4.5 mL
D2156-01	70 mL	15 mL
D2156-02	140 mL (每瓶)	45 mL

### ★ 用户自备仪器及耗材:

- ✓ 70%无水乙醇、异丙醇
- ✓ 离心速度可达 13,000xg 的离心机
- ✓ 涡旋仪
- ✓ 10-15 mL 细菌培养管
- ✓ 无菌无酶的 1.5 或 2mL 离心管
- ✓ (可选) 无菌水、温度可达 70°C的孵育装置

### ★ 提取步骤 —— 标准方案

1. 从新鲜划线培养的平板中挑取单菌落并接种到含有抗生素的 2-5mL LB 或 YT 培养基中, 37°C (~300rpm) 摇菌 20-24h。培养管或培养瓶的体积至少是培养基的 4 倍;
2. 取 1.5~5.0mL 培养的菌液, 室温下 13,000xg 离心 3min 收集细菌, 弃除上清培养基;
3. 加入 200 $\mu$ L T1 Buffer/RNase A 混合液, 漩涡振荡使细菌完全分散;  
**# 注意:** T1 Buffer 使用前必须加入 RNase A。
4. 往重悬液中加入 200 $\mu$ L T2 Buffer, 轻轻颠倒 5-10 次混匀, 如有必要, 可把裂解液置于室温静置 5min;  
**# 注意:** 避免剧烈混合裂解液, 静置时间不应超过 5min, 否则会使染色体 DNA 断裂而使质粒纯度降低。静置时间过长可能会导致质粒 DNA 断裂 (当使用完 T2 Buffer 以后, 须盖紧瓶盖保存)。
5. 加入 200 $\mu$ L 预冷的 T3 Buffer, 温和颠倒 15-20 次至形成白色絮状沉淀。冰浴

5min。

6. 4°C 13,000xg 离心 10min; 转移上清到新的 1.5 mL 离心管中, 加入 200μL BAC Binding Buffer (已加异丙醇稀释), 颠倒 3-5 次混匀。

**# 注意:** BAC Binding Buffer 在使用前必须按照说明书加入异丙醇稀释。

7. 把 MicroElute® DNA Column 套至 2mL 收集管中;
8. 转移上清液至 MicroElute® DNA Column, 室温下 8,000xg 离心 30 s, 弃除滤液;

9. 把 MicroElute® DNA Column 重新装回收集管, 加入 750μL SPM Buffer (已加无水乙醇稀释), 室温下最大速度离心 1 min, 弃除滤液;

**# 注意:** SPM Buffer 在使用前必须按照说明书加入无水乙醇稀释。

(可选) 弃去滤液, 重复第 9 步进行第二次 SPM Buffer 洗涤;

10. 弃去滤液, 把 MicroElute® DNA Column 重新装回收集管, 最大速度离心空柱 2min 以甩干结合柱基质;

11. 把 MicroElute® DNA Column 装在干净的 1.5mL 离心管上, 加入 20-50μL Elution Buffer 到结合柱基质中, 静置 1min, 13,000xg 离心 1min 洗脱出 DNA;

**# 注意:** 首次洗脱可获得 65-80%的质粒 DNA, 可按照实际需求进行二次洗脱。

- 用新的 Elution Buffer 进行二次洗脱 (可增加产量, 但会导致浓度降低)
- 将第一次洗脱出的 Elution Buffer 重新加至结合柱内进行二次洗脱 (可增加洗脱浓度但不增加洗脱体积)。

12. 洗脱的 DNA 保存在 -20°C。

## ★ 提取步骤 —— 低拷贝质粒提取方案

1. 从新鲜划线培养的平板中挑取单菌落并接种到含有抗生素的 2-5mL LB 或 YT 培养基中, 37°C (~300rpm) 摇菌 20-24h。培养管或培养瓶的体积至少是培养基的 4 倍。
2. 取 1.5~5.0mL 培养的菌液, 室温下 13,000xg 离心 3min 收集细菌, 弃除上清培养基;
3. 加入 260μL T1 Buffer / RNase A 混合液, 漩涡振荡使细菌完全分散;

**# 注意:** T1 Buffer 使用前必须加入 RNase A。

4. 往重悬液中加入 260 $\mu$ L T2 Buffer, 轻轻颠倒 5-10 次混匀, 如有必要, 可把裂解液置于室温静置 5min;  
**# 注意:** 避免剧烈混合裂解液, 静置时间不应超过 5min, 否则会使染色体 DNA 断裂而使质粒纯度降低。静置时间过长可能会导致质粒 DNA 断裂 (当使用完 T2 Buffer 以后, 须盖紧瓶盖保存)。
5. 加入 260 $\mu$ L 预冷的 T3 Buffer, 温和颠倒 15-20 次至形成白色絮状沉淀。冰浴 5min;
6. 4 $^{\circ}$ C 13,000xg 离心 10min; 转移上清到一新的 1.5 mL 离心管中, 加入 0.7 倍体积的异丙醇和 2 $\mu$ L Linear Polyacrylamides, 涡旋混匀;
7. 室温 14,000xg 离心 10min 沉淀 DNA, 小心吸弃上清;
8. 加入 500  $\mu$ L 70%乙醇到离心管中, 颠倒混匀清洗沉淀;
9. 室温 14,000xg 离心 10min 沉淀 DNA, 小心吸弃上清;
10. 把管盖打开, 倒扣在吸水纸上 10-15min 干燥 DNA 沉淀。确保干燥之后看不到液滴, 但是不要过度干燥, 否则 DNA 难于重新溶解;
11. 加入 30-50 $\mu$ L Elution Buffer 到离心管中溶解 DNA 沉淀, 必要时室温孵育过夜。

## ★ 产品信息卡



更多详情, 请扫描左方二维码获取原文说明书  
中文翻译仅供辅助阅读



常见问题合集及操作注意事项  
请扫描左方二维码获取



中国总代理: 广州飞扬生物工程有限公司  
技术支持: 020-32051125  
企业 QQ: 800848200 (人工客服在线)  
中文网站: **omgabiotech.com.cn**



如需查询代理商名录, 请关注“飞扬生物”微信号获取