

D2156 BAC/PAC DNA Kit

BAC/PAC DNA 小量提取 常见问题及排除方法

1. 实验前检查 Buffer T2 是否有沉淀物析出，久置或低温都会让 Buffer T2 析出沉淀，如有沉淀析出，需按照说明书提示：在 37°C 水浴至沉淀完全溶解；如 Buffer T2 未能完全溶解，可能会导致菌体无法裂解。
2. 实验前，BAC Binding Buffer 必须按照说明书加入【异丙醇】稀释备用。请开盖闻气味确认已加入醇类稀释。稀释错误或未稀释会导致 DNA 无法挂柱结合，致提取失败。
3. 实验前，SPM Buffer 必须按照说明书加入【无水乙醇】稀释备用。请开盖闻气味确认是否已加入醇类稀释。稀释错误或未稀释会导致 DNA 无法挂柱结合，致提取失败。
4. 吸取菌液时需将菌液彻底摇晃均匀，可避免取菌量不一导致提取结果不稳定。
5. BAC 质粒培养：先在 2×YT 培养基中将氯霉素的浓度调致 20μg/mL，接菌后培养过夜（BAC 质粒有氯霉素抗性，培养时间为 14-16h）；此时虽然可得到很浓的细菌，但是质粒含量很少，因此需要将氯霉素的浓度增加 150μg/mL，使培养基中氯霉素的终浓度变为 170μg/mL，然后再培养 8-14 个小时，这样就可以大大提高细菌中的质粒含量。
6. 菌液培养时间不宜过长，高拷贝菌液用量不宜超过 5mL（低拷贝菌液用量不宜超过 10mL），如菌密度较大，需按照比例酌情增加 Buffer T1、T2、T3 的用量，以免过载。
7. 离心收集菌体后，加入 Buffer T1 重悬，注意一定要将菌体彻底打散，不要留下菌团，可对着光检查。如菌团未能彻底打散，则加入 Buffer T2 后会无法彻底裂解，这是导致提取结果不稳定的关键因素之一。
8. 注意不要省略空柱子离心步骤，该步骤能除去柱子中残留的乙醇，否则可能会影响下游实验。如产物点电泳时无法正常沉降，绝大部分情况下由于空甩不完全，乙醇残留所致，可在下次提取中，提高离心机速度或延长空甩时间至 5~10min，可解决残留问题。
9. 如产物浓度偏低，建议按照说明书进行第二次洗脱。洗脱方法：将第一次洗脱的 Elution Buffer 重新吸回 HiBind® DNA MicroElute column，室温等待 2-3min，再次离心。
10. 不要随意缩小说明书中的洗脱体积 20-50μl，过低的洗脱体积会大幅降低洗脱效率。
11. 说明书中的沉淀法提取方案（即低拷贝提取方案）可更好保证质粒的完整性，建议在标准方案提取不能得到理想结果时或对质粒的完整性有更高的要求时，尝试该方案。

如按照上述步骤仍无法排查问题，请提供单位名称及试剂盒条形码（即盒外标签 Lot 开头数字字母组合）核验正品货源，添加技术支持 QQ: 800848200 获取更多信息。