

## D2156 BAC/PAC DNA Kit

### 简易中文步骤

√实验前请按说明书配制和保存以下溶液：

- 将一小瓶 RNase A 加入到 Buffer T1 中，保存至 4°C 中
- 使用【异丙醇】对 BAC Binding Buffer 进行稀释，稀释后室温保存

货号	加入量
D2156-00	4.5mL
D2156-01	15mL
D2156-02	45mL

- 使用【无水乙醇】对 SPM Buffer 进行稀释，稀释后室温保存

货号	加入量
D2156-00	7mL
D2156-01	70mL
D2156-02	140mL

### BACs, PACs, P1s 和质粒分离步骤 (标准方案)

1. 从划线平板培养中挑取单克隆菌株，接种到 2-5mL 含有选择抗生素的 LB 或 YT 培养液的培养瓶中，37°C 摇床（约 300rpm）孵育 20-24h，使用的培养瓶体积至少为培养基体积的 4 倍；
2. 取 1.5-5mL 菌液至离心管中，室温下 13,000xg 离心 3min，弃培养液，得到细菌沉淀；
3. 加入 200μl Buffer T1/RNase A solution，涡旋混匀。完全重悬细胞沉淀对于获得良好的产量至关重要；
4. 加入 200μl Buffer T2，轻轻上下颠倒混匀 5-10 次，室温放置 5min，可观察到混合液逐渐变澄清。应避免剧烈震荡，否则染色体 DNA 可能会断链并降低质粒浓度。此时裂解液看起来应该是粘稠的。裂解反应时间不要超过 5min。（Buffer T2 在存放时应拧紧瓶盖）。
5. 加入 200μl 预冷的 Buffer T3，轻轻上下颠倒 15-20 次，直至出现白色絮状沉淀，在冰上孵育 5min，不要涡旋，否则染色体 DNA 可能会断链。
6. 在 4°C 下，≥13,000xg 离心 10min；
7. 小心转移上清液至新的 1.5mL 离心管中，加入 200μl BAC Binding Buffer，上下颠倒混匀 3-5 次；

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

8. 将 HiBind® DNA MicroElute column 套入到 2mL 收集管中，将步骤 7 中混合液转

移到 HiBind® DNA MicroElute column, 室温下 > 8,000xg 离心 30s, 弃滤液;  
9. 将 HiBind® DNA MicroElute column 重新套回到 2mL 收集管中, 加入 750µl SPM Buffer, 室温下 > 8,000xg 离心 30s, 弃滤液;

Note: SPM Buffer 在使用前必须按照说明书加入无水乙醇稀释。

10. 将 HiBind® DNA MicroElute column 重新套回到 2mL 收集管中, 最大速度空柱子离心 2min 干燥;

11. 将 HiBind® DNA MicroElute column 套入到新的 1.5mL 离心管中, 加入 20-50 µl Elution Buffer (10mM Tris-HCl, pH8.5) 或水, 室温静置 5min;

12. 最大速度离心 2min 洗脱 DNA;

13. 将 DNA 保存到-20°C中。

### **BACs, PACs, P1s 和质粒分离步骤 (低拷贝方案)**

1. 从划线平板培养中挑取单克隆菌株, 接种到 2-5mL 含有选择抗生素的 LB 或 YT 培养液的培养瓶中, 37°C摇床 (约 300rpm) 孵育 20-24h, 使用的培养瓶体积至少为培养基体积的 4 倍;

2. 取 1.5-5mL 菌液至离心管中, 室温下 13,000xg 离心 3min, 弃培养液, 得到细菌沉淀;

3. 加入 260µl Buffer T1/RNase A solution, 涡旋混匀。完全重悬细胞沉淀对于获得良好的产量至关重要;

4. 加入 260µl Buffer T2, 轻轻上下颠倒混匀 5-10 次, 室温放置 5min, 可观察到混合液逐渐变澄清。应避免剧烈震荡, 否则染色体 DNA 可能会断链并降低质粒浓度。此时裂解液看起来应该是粘稠的。裂解反应时间不要超过 5min。(Buffer T2 在存放时应拧紧瓶盖)。

5. 加入 260µl 预冷的 Buffer T3, 轻轻上下颠倒 15-20 次, 直至出现白色絮状沉淀, 在冰上孵育 5min, 不要涡旋, 否则染色体 DNA 可能会断链。

6. 在 4°C下,  $\geq 14,000xg$  离心 10min;

7. 小心将上清液转移到新的 1.5mL 离心管中, 加入 0.7 倍体积的异丙醇和 2µl linear polyacrylamides (如 780µl 裂解液加入 546µl 异丙醇), 涡旋混匀 15s;

8. 室温下,  $\geq 14,000xg$  离心 10min, 小心将上清液吸除, 不要碰到 DNA 沉淀。

9. 加入 500µl 70%的乙醇洗涤 DNA 沉淀, 将含有沉淀的 2mL 收集管调整好方向, (与之前方向相同), 离心 10min, 小心吸除上清液, 注意不要碰到沉淀。将含有 DNA 沉淀的离心管倒扣在吸水纸上, 使 DNA 干燥;

Note: 确保在空气干燥后没有可见的液滴, 注意不要将 DNA 沉淀干燥过度。过度干燥的 DNA 沉淀会难以重新溶解。

10. 向 DNA 沉淀中加入 30-50 $\mu$ l Elution Buffer (10mM Tris-HCl, pH8.5) , 可在室温下孵育过夜;

11. DNA 的产量和质量: 适当稀释样品, 确定在 260nm 和 280nm 处的吸光度。

DNA 浓度计算如下:

$$\text{DNA 浓度} = A_{260} \times 50 \times (\text{稀释倍数}) \mu\text{g/mL}$$

( $A_{260}$ )/( $A_{280}$ )的比值是核酸纯度的指标, 产量 (以及质量) 可以通过琼脂糖凝胶/溴化乙锭电泳来确定。

中文翻译仅供辅助阅读, 详情请以英文说明书为准