

# D2157 Endo-Free 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
D2157-00	4.5mL
D2157-01	15mL
D2157-02	45mL

### BACs, PACs, P1s 和质粒分离步骤

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 2mL 离心管中，加入 0.1 倍体积的 ETR Solution（蓝色），上下颠倒混匀 7-10 次，置于冰上孵育 10min，孵育期间涡旋混匀几次；
 

Note：在加入 ETR Solution 后，溶液会变浑浊，但在冰上孵育后会变得澄清。
8. 在 42°C 中孵育 5min，混合液再次变浑浊。25°C 下，10,000xg 离心 3min，ETR Solution 在底部形成蓝色层。
9. 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。
10. 将 HiBind® DNA column 套入到 2mL 收集管中，将步骤 9 中混合液转移到 HiBind® DNA column，室温下 > 8,000xg 离心 30s，弃滤液；

11. 将 HiBind<sup>®</sup> DNA column 重新套回到 2mL 收集管中, 加入 750 $\mu$ l 80%乙醇, 室温下 > 8,000xg 离心 30s, 弃滤液;
12. 将 HiBind<sup>®</sup> DNA column 重新套回到 2mL 收集管中, 最大速度空柱子离心 2min 干燥;
13. 将 HiBind<sup>®</sup> DNA column 套入到新的 1.5mL 离心管中, 加入 40 $\mu$ l Elution Buffer (10mM Tris-HCl, pH8.5) 或水, 室温静置 5min;
14. 最大速度离心 2min 洗脱 DNA;
15. 将 DNA 保存到-20 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ 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 260 $\mu$ l 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 260 $\mu$ l 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 260 $\mu$ l 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. 选做: 置于冰上孵育 10min;
7. 在室温下,  $\geq$ 12,000xg 离心 10min;
8. 将 HiBind<sup>®</sup> DNA Column 套入到 2mL 离心管中, 小心将上清液转移到 HiBind<sup>®</sup> DNA Column 中, 注意不要转移到沉淀, 在室温下 12,000xg 离心 1min, 直至裂解液完全通过 HiBind<sup>®</sup> DNA Column;
9. 丢弃 HiBind<sup>®</sup> DNA Column, 将滤液转移到新的 2mL 离心管中, 加入 0.1 倍体积的 ETR Solution (蓝色), 上下颠倒混匀 7-10 次, 孵育期间混匀几次;  
Note: 在加入 ETR Solution 后, 溶液会变浑浊, 但在冰上孵育后会变得澄清。
10. 在 42 $^{\circ}$ C中孵育 5min, 混合液再次变浑浊。25 $^{\circ}$ C下, 12,000xg 离心 3min, ETR

Solution 在底部形成蓝色层。

11. 小心转移上清液至新的 1.5mL 离心管中, 加入 2 $\mu$ l linear polyacrylamides (提供) 和 0.7 倍体积的异丙醇, 涡旋混匀 15s;

12. 室温下,  $\geq 12,000xg$  离心 15min, 小心将上清液吸除, 不要碰到 DNA 沉淀。

13. 加入 500 $\mu$ l 预冷的 70%乙醇洗涤 DNA 沉淀, 最大速度涡旋 15s, 离心 10min, 再次沉淀 DNA。弃上清液, 将含有 DNA 沉淀的离心管倒扣在吸水纸上 10-15min, 使 DNA 干燥;

Note: 确保空气干燥后看不到乙醇液滴, 但要注意不能过度干燥 DNA 沉淀, 过度干燥将导致难以再溶解。

14. 向 DNA 沉淀中加入 30 $\mu$ l Endotoxin-Free Elution Buffer, 最大速度涡旋重悬沉淀, 可在室温下孵育过夜;

15. 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:

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

中文翻译仅供辅助阅读, 详情请以英文说明书为准