

Version: AD 4.0 (2024.02.22修订)

SPARKclassic BAC/PAC Large plasmid Kit

BAC/PAC大型质粒提取试剂盒

(溶液型)

目录号: AD0305

01/产品组分

序号	组分	20次 AD0305
1	RNase A (10 mg/mL)	1.3 mL
2	溶液 P1	130 mL
3	溶液 P2	100 mL
4	溶液 PIII	100 mL
5	杂质清除剂 A	3 mL
6	杂质清除剂 B	30 mL
7	内毒素清除剂	10 mL

02/保存条件

RNase A、内毒素清除剂于-20°C保存，其它组分室温（15-25°C）保存。

03/产品概述

本试剂盒采用改进碱裂解法从培养菌中提取质粒 DNA，操作简单方便，单个样品的抽提可在 1 h 内完成。本试剂盒采用独特的溶液配方和内毒素清除试剂，只需要几次简单离心去除蛋白质、多糖、内毒素、RNA 等杂质，获得高质量的质粒 DNA。纯化 DNA 的 OD_{260/280} 通常在 1.8 左右，得到的质粒可直接应用于细胞转染甚至动物体内实验等对 DNA 纯度要求较高的工作中。本方法提取纯化质粒 DNA，对质粒损伤小，即使是 100 kb 甚至 200 kb 以上的大型质粒或超大型 BAC/PAC 质粒，只要碱裂解法能够提取，就可以有效纯化。此外溶液型的试剂可以按照比例放大缩小进行小提/中提/大提，最后可选择任意小体积溶解质粒，浓度可高达 3 μg/μL。

推荐使用量及产量：推荐使用量 150 mL，得率可多达 30-50 μg 左右；低拷贝质粒或大于 10 kb 的大质粒，应加大菌体量，同时按比例增加溶液 P1、溶液 P2、溶液 PIII 的用量，其它步骤相同。

04/自备材料

异丙醇、70%乙醇、纯水或者 TE 溶液

05/注意事项

请务必在使用本试剂盒之前阅读此注意事项

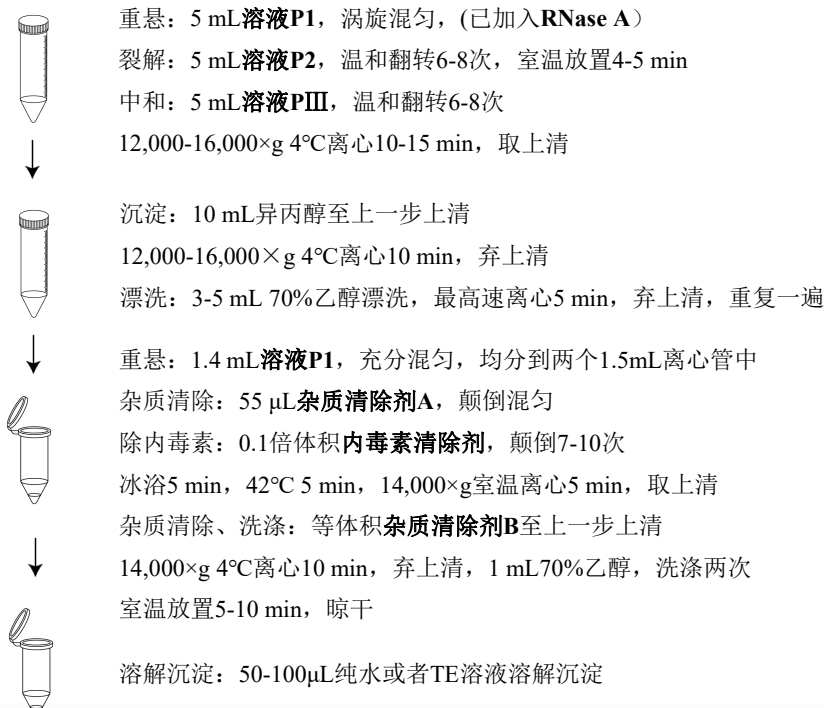
- ◇ 第一次使用时，将试剂盒所带的全部 RNase A 加入溶液 P1 后（终浓度 100 µg/）mL 置于 4°C 保存。如果溶液 P1 中 RNase A 失活，提取的质粒可能会有微量 RNA 残留，在溶液 P1 中补加 RNase A 即可。
- ◇ 环境温度低时溶液 P2 中 SDS 可能会析出沉淀或出现混浊，可在 37 °C 水浴加热帮助恢复澄清，不要剧烈摇晃，以免形成过量的泡沫。
- ◇ 避免试剂长时间暴露于空气中产生挥发、氧化、pH 值变化，各溶液使用后应及时盖紧瓶盖。
- ◇ 提取大质粒时操作动作要轻柔，应该使用剪了开口的吸头，防止机械剪切对 DNA 的损坏。

06/使用方案

1. 取过夜培养菌 150 mL 左右菌液（最大不超过 180-200 mL），选择合适的离心瓶或 50 mL 离心管收集菌体，于 4 °C 10,000×g 离心 2 min 沉淀菌体，完全弃除上清。
2. 加入 5 mL 溶液 P1，用移液器吹打或涡旋震荡混匀菌液至无絮块菌体。细菌悬液移入 50 mL 离心管中，室温放置 3-5 min。
 - ▲ 如果有未彻底混匀的菌块，会影响裂解，导致提取量和纯度偏低。
3. 加入 5 mL 溶液 P2，轻轻颠倒离心管 6-8 次，使菌体充分裂解，室温放置 4-5 min，。
 - ▲ 温和地混合，不要剧烈震荡，以免基因组 DNA 剪切断裂！所用时间不应超过 5 min，以免质粒受到破坏。此时菌液应变得清亮粘稠，如果很浑浊，可能由于菌体过多，裂解不彻底，应减少菌体量。
4. 加入 5 mL 溶液 PIII，立即颠倒离心管 6-8 次，充分混匀，至白色絮状物产生。上述裂解液于 4°C 12,000-16,000×g 离心 10-15 min，小心将上清转移至新的 50 mL 离心管中。
 - ▲ 加入溶液 PIII 后应该立即混匀，以免产生 SDS 的局部沉淀。
5. 加入 10 mL 异丙醇，颠倒离心管，充分混匀。
6. 于 4°C 12,000-16,000×g 离心 10 min，小心弃上清，倒置于吸水纸上轻轻沥干残余液体，加入 3-5 mL 70% 乙醇漂洗一遍，最高速离心 5 min，弃上清，晾干沉淀。
 - ▲ DNA 沉淀如果干燥过头，DNA 将无法完全溶解，但是如果乙醇没有晾干挥发干净，残留太多，也会造成 DNA 无法完全溶解。
 - ▲ 异丙醇离心沉淀后，质粒大多吸附在管底和侧壁，可能看不见沉淀，但不影响产量，后续步骤仔细吹打管底和沉淀所在的侧壁涮洗溶解质粒。
7. 加入 1.4 mL 溶液 P1 完全溶解沉淀团块，注意吹打附着在管底和侧壁上肉眼看不到的质粒沉淀，（大质粒可用宽口吸管轻轻吹打辅助溶解）。为方便操作，将质粒溶液转入 2 个新的 1.5 mL 离心管中（每个 700 µL）。

- ▲上步骤也可不分管（需选用大于 3mL 离心管），相应试剂加倍即可。
- ▲可选步骤（一般不需要）：如果菌株 RNA 丰富有微量 RNA 残留，可在此步骤后将质粒溶液 60 °C 孵育 15 min 消化 RNA。
8. 每管加入 55 μL 杂质清除剂 A，颠倒充分混匀后加入约 0.1 倍体积（约 80 μL）冰预冷的内毒素清除剂，颠倒旋转 7-10 次（30 s 左右）充分混匀，冰浴或者冰上放置 5 min 以上，中间偶尔颠倒混匀几次。
- ▲内毒素清除剂加入上清后，上清会变得浑浊，但是冰浴后应恢复清亮。
- ▲如果不需要去内毒素用于转染，可在此步骤只加入 55 μL 杂质清除剂 A，充分混匀后冰上放置 5 min，离心后小心取上清转入一个新管，直接接步骤 11。
9. 42°C 水浴，溶液又会变为浑浊，颠倒混匀后 42 °C 温育 5 min。
10. 室温 14,000×g 离心 5 min 分相（温度低时，内毒素清除剂无法分相，因此必须至少 20 °C 以上室温离心或者保证冬季转头温度 20 °C 以上）。上层水相含 DNA，下层蓝色油状相含内毒素和其它杂质。将含 DNA 的上层水相转移到新管（注意不要吸到蓝色油状层），弃油状层。
- ▲溶液必须分为上下两相，否则应重复步骤 9-10。
11. 将上一步所得上层水相中加入等体积杂质清除剂 B（约 750 μL），轻柔混匀，4°C 14,000×g 离心 10 min，弃上清（注意不要丢失 DNA），轻轻加入 1 mL 70%乙醇洗涤，离心弃上清，共漂洗两次，室温倒置晾干 5-10 min 使乙醇完全挥发。
12. 每个离心管加适量 TE 或者纯水（50-100 μL）溶解沉淀（可在 37°C 水浴中振荡以辅助溶解）。要注意很多质粒 DNA 可能附着在离心管侧壁上，即使看不见，也应该充分吹打侧壁溶解回收质粒 DNA。
- ▲最后沉淀可以根据需要选择任意小体积溶解，这样可以得到很高浓度的转染级质粒 DNA（高达 3-5 μg/μL）。如果有需要，客户也可以选择更大体积溶解。可将两管质粒合并成一管混匀后使用。

07/流程简图



08/相关产品

- AA0201 SPARKeasy 细菌基因组DNA快速提取试剂盒
- AA1904-A RNase A (10 mg/mL)
- AD0302 SPARKeasy 高纯度质粒大量快速提取试剂盒
- AD0303 SPARKeasy 无内毒素高纯质粒大量提取试剂盒
- AE0101 胶回收/PCR产物纯化试剂盒
- AK0601 Spark HiFi Seamless Cloning Kit
- AK0603 Spark HiFi Seamless Cloning Kit (单片段)

本产品仅用于科学研究！

Tel: 0531-82387577

Web: <http://www.sparkjade.com>

Support: support@sparkjade.com

