

BAC/PAC DNA 大量提取试剂盒

E.Z.N.A.[®] BAC/PAC DNA Maxi Kit

货号	D2154-00	D2154-01	D2154-02
反应次数	2 次	5 次	20 次
HiBind [®] BAC/PAC DNA Maxi Columns	2 个	5 个	20 个
2 mL Collection Tubes	2 个	5 个	20 个
T1 Buffer	40 mL	90 mL	2 x 180 mL
T2 Buffer	40 mL	90 mL	2 x 180 mL
T3 Buffer	40 mL	90 mL	2 x 180 mL
BAC Binding Buffer	15 mL	30 mL	2 x 60 mL
HBC Buffer	18 mL	40 mL	170 mL
SPM Wash Buffer	18 mL	42 mL	2 x 75 mL
RNase A	100 μ L	300 μ L	2 x 500 μ L
Elution Buffer	10 mL	30 mL	120 mL
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. 本试剂盒仅供科学研究使用。

★ 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 Wash Buffer 进行稀释，使用【异丙醇】对 BAC Binding Buffer 以及 HBC Buffer 进行稀释，稀释后均置于室温保存。

货号	SPM Wash Buffer 稀释 无水乙醇加入量	BAC Binding Buffer 稀释 异丙醇加入量	HBC Buffer 稀释 异丙醇加入量
D2154-00	42 mL	45 mL	7 mL
D2154-01	98 mL	90 mL	16 mL
D2154-02	175 mL (每瓶)	180 mL (每瓶)	66 mL

★ 用户自备仪器及耗材：

- ✓ 无水乙醇、异丙醇
- ✓ 离心温度可达 4°C，速度可达 3,000xg 的水平转子离心机
- ✓ 涡旋仪、冰盒
- ✓ 无菌无酶的 50mL 离心管
- ✓ 真空抽滤装置
- ✓ (可选) 无菌水、温度可达 65°C 的孵育装置、3M NaOH

★ 提取步骤 —— 离心方案

1. 从新鲜划板培养的平板中挑取单菌落并接种到含有抗生素的 100-200 mL 2 x YT 培养基中，37°C (~300rpm) 摇菌 16-20h；

注意：最佳的生长条件对于获得高产量的 BAC DNA 至关重要。为了达到最佳的生长条件，从新鲜转化或者新划板的平板里挑取单菌落，接种到 2-5mL 含抗生素的培养基中，37°C (~300rpm) 摇菌~8h 后，再将菌以 1/1000-1/500 的比例接种到合适体积的培养基中，37°C (~300rpm) 摇菌 16~20h。培养瓶的体积至少是培养基的 3-4 倍。如果使用甘油菌作为接种物，需要先在划板，再挑单菌落进行扩大培养。

2. 取 100~200mL 培养的菌液，室温下 3,000xg 离心 10-15min 收集细菌，弃除上清培养基；

注意：为了确保去除多余的培养基，可以把收集瓶倒扣在吸水纸上，吸走多余的液体。

3. 加入 16 mL T1 Buffer/RNaseA 混合液，漩涡振荡使细菌完全分散；充分打散对于获得理想产量至关重要；

注意：T1 Buffer 使用前必须加入 RNase A。

4. 往悬液中加入 16 mL T2 Buffer，轻轻颠倒 10-20 次混匀，如有必要，可把裂解液置于室温静置 2-3min；

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 16 mL 预冷的 T3 Buffer，温和颠倒 15-20 次至形成白色絮状沉淀。冰浴 5min；

注意：加入 T3 Buffer 后，必须立刻进行颠倒彻底混合溶液，以免形成局部沉淀。如果混合物仍然呈粘性，棕色或者圆球状，则需要更多次颠倒混合来完全中和溶液。

6. 冰浴 10min。4°C 3,000-5,000xg 离心 15min；

注意：为了更快得去除沉淀，可以使用 omega Biotek 的过滤注射器 (Cat No. PD094) 来替代离心的步骤。这个过滤器可以完全去除 SDS 沉淀物和细菌裂解物。

7. 转移上清到合适的容器中，注意不要吸到沉淀物；

注意：转移上清时，沉淀物可能会有部分漂浮在上清的顶部，小心地将移液枪头插入到漂浮物下层，只转移走清液。

8. 加入 20 mL BAC Binding Buffer (已加异丙醇稀释)，颠倒 20 次混匀。室温静置 2-5min；

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

9. 把 HiBind® BAC/PAC DNA Maxi Columns 套至 50ml 离心管中；

可选柱平衡处理：

1) 往空 HiBind® BAC/PAC DNA Maxi Columns 内加入 3mL 3M NaOH；

2) 室温静置 5min，室温下 3,000xg 离心 3min，弃除滤液。

10. 转移 20 mL 步骤 8 的混合液至 HiBind® BAC/PAC DNA Maxi Columns，室温

下 4,000xg 离心 5 min, 弃除滤液;

11. 重复步骤 10 直至把步骤 8 所有的混合液都离心通过 HiBind® BAC/PAC DNA Maxi Columns。
12. 把 HiBind® BAC/PAC DNA Maxi Columns 重新装回收集管, 加入 10 mL HBC Buffer (已加异丙醇正确稀释), 室温下 4,000xg 离心 5 min, 弃除滤液;
注意: HBC Buffer 在使用前必须按照说明书加入异丙醇稀释。
13. 把 HiBind® BAC/PAC DNA Maxi Columns 重新装回收集管, 加入 20 mL SPM Wash Buffer (已加无水乙醇正确稀释), 室温下最大速度离心 1 min, 弃除滤液;
注意: SPM Wash Buffer 在使用前必须按照说明书加入无水乙醇稀释。
14. 弃去滤液, 把 HiBind® BAC/PAC DNA Maxi Columns 重新装回收集管, 最大速度离心空柱 10min 以甩干结合柱基质;
注意: 洗脱前干燥结合柱基质时很重要的, 残留的乙醇可能回干扰下游的实验。
注意: 对于要获得最大产量还是获得更高浓度的 BAC DNA, 见第 6 页的替代洗脱方案。标准的洗脱方案, 请继续执行以下步骤。
 - A. 将 HiBind® BAC/PAC DNA Maxi Columns 放置于真空装置中干燥 15min, 然后接着步骤 15 继续操作
 - B. 在 65°C 的真空烘箱或者培养箱中烘烤 10min, 然后接着步骤 15 继续操作。
15. 把 HiBind® BAC/PAC DNA Maxi Columns 装在干净的 50mL 离心管中, 加入 0.7-2.0 mL Elution Buffer、无菌水或 TE Buffer 到结合柱基质中, 静置 5-10min, 最大速度离心 5min 洗脱出 DNA;
注意: 首次洗脱可获得 70% 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)。
16. 洗脱的 DNA 保存在 -20°C。

★ 提取步骤 —— 真空抽滤方案

1. 按照离心方案的 1-8 步，准备好裂解混合液；
2. 按使用说明准备好真空抽滤器，把 HiBind® BAC/PAC DNA Maxi Columns 连接到抽滤器；

可选柱平衡处理：

- 1) 往空 HiBind® BAC/PAC DNA Maxi Columns 内加入 3 mL 3M NaOH；
 - 2) 室温静置 5min，真空抽滤让所有的液体都通过结合柱。
3. 转移 20 mL 细菌裂解混合液到 HiBind® BAC/PAC DNA Maxi Columns，小心不要超过结合柱的容积（20mL），用真空抽滤让裂解液通过结合柱，转移剩下的裂解液到结合柱，抽滤，直到所有的裂解液都通过结合柱；
 4. 加入 10 mL HBC Buffer（已加异丙醇正确稀释）到 HiBind® BAC/PAC DNA Maxi Columns，抽滤让液体流过结合柱；
 5. 加入 20 mL SPM Wash Buffer（已加无水乙醇正确稀释），抽滤让液体流过结合柱；
 6. 按照离心方案步骤 14-16 进行干燥柱子并洗脱 DNA。

★ 用户自备仪器及耗材：

- ✓ 70%无水乙醇、3M 醋酸钠、异丙醇
- ✓ 离心温度可达 4°C，速度可达 3,000xg 的水平转子离心机
- ✓ 冰盒
- ✓ 无菌无酶的 15mL，50mL 离心管
- ✓ (可选) 无菌水、温度可达 65°C 的孵育装置

★ 洗脱替代方案

1. 把 HiBind® BAC/PAC DNA Maxi Columns 套至 50mL 离心管中；
2. 加入 3 mL Elution Buffer，无菌水或 TE Buffer 到柱子基质中；
3. 室温放置 5min；
4. 室温下 4,000xg 离心 5 min；

注意：首次洗脱可获得 70% 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）。

5. 小心转移滤液到一无菌的 15mL 离心管中；
6. 加入 0.1 倍上清体积的 3M 醋酸钠，0.7 倍上清体积的异丙醇，涡旋混匀；
7. 4°C 5,000xg 离心 20 min，小心去除上清液，注意不要吸到沉淀；
8. 加入 5mL 预冷的 70%乙醇，涡旋重悬沉淀；
9. 室温下 3,000xg 离心 10 min，小心去除上清液，注意不要吸到沉淀；
10. 室温空气干燥沉淀 5-10min；
11. 加入 200-500 μ L TE Buffer 或无菌水溶解 DNA 沉淀；
12. DNA 保存在 -20°C。

★ 提取步骤示意图

离心方案



离心收集菌体沉淀
重悬、裂解

离心转移上清

加入 BAC Binding
Buffer

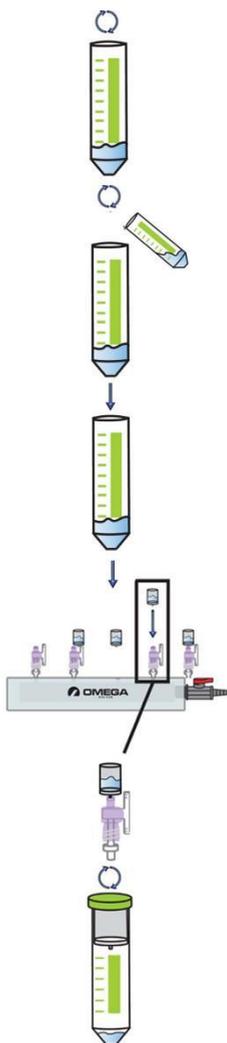
转移混合液
至结合柱内

洗涤

干燥

洗脱 BAC DNA

真空抽滤方案



离心收集菌体沉淀
重悬、裂解

离心转移上清

加入 BAC Binding Buffer

转移混合液至结合柱内
真空抽滤过柱
洗涤

洗涤

干燥

洗脱 BAC DNA

★ 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



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：omegabiotek.com.cn

如需查询代理商名录，请关注“飞扬生物”微信号获取

售后保障服务说明

为确保您所使用的试剂为正品来源，请从使用单位所在地指定代理商处购买 Omega bio-tek 产品。由其他渠道购买或任一标签信息(应包括货号、条形码、完整 Lot 号、失效日期)缺失的试剂盒，我司恕不提供任何质量保证及售后服务。