

# BAC DNA Extract Kit

Cat. No.: BD-001

Size: 10 Tube

Store: RT

## Instrodution

BAC DNA 提取试剂盒使用传统的碱性裂解方法分离质粒，并使用独特的阴离子交换柱有效吸附质粒 DNA，可获得高纯度质粒。可以根据实际情况增加细菌液的量，以获得更高浓度的质粒。提取的质粒可用于 PCR，酶切，测序以及探针标记等。

## Composition

Cat. No	Product Name	Size	Number	Store
	P1 液	200 ml	1	RT
	P2 液	200 ml	1	RT
	P3 液	200 ml	1	RT
	平衡液 EQB	120 ml	1	RT
	RNase A	1ml	2	RT
	洗涤液 WB	250 ml	3	RT
	洗脱液 EB	200 ml	1	RT
	TE 缓冲液	15 ml	1	RT
	阴离子交换柱	—	10	RT

## Before Starting

1. 如需长期保存，请将 RNase A 置于-20℃保存。
2. P1 和 P3 液平时于 4℃放置，使用时直接取用，不需要恢复至室温，P2 液应置于室温保存，如气温过低出现白色结晶，使用前请置于 37℃水浴中溶解。

Exon Biotech Inc.,Guangzhou,China  
Room 404、405 , No.189 Dunhe Road, Guangzhou. China  
E-mail:focobio@126.com Tel:86-20-89895006 89269730  
Web: www.focofish.com www.focobio.com

## Standard Action

1. 从冰箱中取出冻存菌，37°C水浴中快速融化，在加有氯霉素（12.5ug/ml）的琼脂培养皿中划平板，37°C培养1天。
2. 挑取单克隆的菌落至装有2-5 ml培养基（含氯霉素）的15ml离心管中，37°C摇床培养8小时。
3. 取200ul摇好的菌液接种至有250ml LB培养基的锥形瓶中，37°C摇床过夜（14-16小时）。  
（剩余菌液可加入20%甘油，置于-80°C冻存。）

**高拷贝质粒可使用100ml LB培养基摇菌，并将P1、P2、P3、RNase A用量按比例减少。**

**培养液体积不高于培养容器体积的1/5，过夜摇床培养的菌液中细胞密度应为 $3-4 \times 10^9$ /ml。**

4. 4000rpm离心10 min，弃上清。
5. 加入15 ml的P1液及150ul的RNase A，涡旋混匀（应保证彻底重悬细菌沉淀，避免出现颗粒）。
6. 加入15 ml的P2液，轻轻上下颠倒混匀5-8次，室温静置5 min（P2液取完后应立即盖好瓶盖，避免长时间接触空气）。
7. 加入15 ml的P3液，轻轻颠倒混匀15-25次，冰上放置至少20 min。
8. 提前取10ml平衡液EQB倒入阴离子交换柱中，靠重力使平衡液完全流出，以平衡柱子。
9. 将步骤7中的裂解液于4°C，6000g，离心20 min，小心转移上清液备用（不要吸到白色沉淀，如有必要，可将上清移至新的离心管中，再次离心10 min）。
10. 提前65°C水浴预热洗脱液EB。
11. 将离心后的上清液全部上柱，在重力作用下使其全部通过柱子。（一次加不完可分多次加入，直至上完全部滤液）
12. 将30ml洗涤液上柱，在重力作用下使其全部通过柱子
13. 重复步骤13。
14. 将预热的洗脱液EB 15ml上柱，在重力作用下洗脱至新的50ml离心管中，加入0.7倍体积（10.5ml）的异丙醇，混匀。

**步骤13-15中，如有负压装置可在负压下过柱，以节省时间，步骤12滤液建议在重力下过柱，使阴离子树脂充分吸附DNA，如流速太慢，可考虑适当使用负压。**

Exon Biotech Inc.,Guangzhou,China  
Room 404、405 , No.189 Dunhe Road, Guangzhou. China  
E-mail:focobio@126.com Tel:86-20-89895006 89269730  
Web: www.focofish.com www.focobio.com

15. 大于 15000g, 4℃下离心 30min。
16. 去上清, 沉淀置于室温干燥 5-10min, 加入 400ul TE 缓冲液溶解沉淀。
17. 质粒浓缩: 将质粒转入 1.5ml 离心管, 在溶解的质粒中加入 400ul 的酚: 氯仿: 异戊醇 (25: 24: 1), 混匀, 高速离心机最大转速离心 5min。(可选)
18. 将上层水相转入干净的 1.5ml 离心管中。
19. 加入 40ul NaAC (3M, pH5.5) 和 1100ul 冰冷的无水乙醇, -20℃放置至少 2h, 沉淀 DNA。
20. 高速离心机最大转速 4℃下离心 30min。
21. 弃上清后, 加入 1 ml 70%乙醇洗涤沉淀, 15000g, 4℃离心 5min。洗涤两次。
22. 小心吸去上清, 沉淀置于室温干燥 5-10min, 加入 50-100ul TE 缓冲液溶解沉淀, 紫外分光光度计测 DNA 浓度及纯度 (OD260/280), 用琼脂糖凝胶电泳确定 BAC 的完整性。



## Ordering Information

Product	Size	Cat.No
NICK Label DNA Probe Kit	25 Reaction	LN001

Exon Biotech Inc.,Guangzhou,China  
Room 404、405 , No.189 Dunhe Road, Guangzhou. China  
E-mail:focobio@126.com Tel:86-20-89895006 89269730  
Web: www.focofish.com www.focobio.com