

Biospin Plasmid DNA Midi Extraction Kit

Biospin 质粒 DNA 中量提取试剂盒

TECHNICAL SUPPORT:

For technical support, please dial phone number : 0086-571-87774567-5525 or 5211,
or fax to 0086-571-87774303
Email to reagent@bioer.com.cn.

Website: www.bioer.com.cn

试剂盒组成

货号	BSC01S1B	BSC01M1B
试剂盒组成	10 人份	25 人份
Balance Buffer	10ml	25ml
Resuspension Buffer	25ml	62.5ml
Lysis Buffer	25ml	62.5ml
Neutralization Buffer	30ml	75ml
Wash Buffer	26.4ml (add 39.6ml ethanol before use)	66ml (add 99ml ethanol before use)
Elution Buffer	20ml	40ml
RNase A	1 管	1 管
Midi spin Column	10 管	25 管
Handbook	1 份	1copy

储存与运输

- ◆ Resuspension Buffer 中一旦加入 RNase A 后须保存于 4° C。其他组分可室温保存 (22-25°C)。
- ◆ 试剂盒可在常温下运输。
- ◆ 试剂盒有效期为 18 个月。

介绍

本试剂盒中的结合系统在高效吸附 DNA 的同时，通过洗涤过程将蛋白等其他杂质去除，最终使用无菌水或洗脱液将核酸洗脱。

该试剂盒可用于从 15—50ml 大肠杆菌培养物中快速高效提取质粒 DNA，结合柱的理论质粒 DNA 结合能力可达 250µg。

提取到的质粒 DNA 可直接用于基因克隆、测序、酶切、文库筛选、体外转录翻译、转染 HEK293 细胞等。

需要的配套设备和材料

- * 无水乙醇
- * 高速离心机
- * 高速离心管
- *15ml与50ml锥形管

重要提示

- 1) RNase A: 使用前将提供的所有RNase A瞬时离心后加入Resuspension Buffer, 使用后Resuspension Buffer/RNase A置于2°C—8°C保存。
- 2) DNA Wash Buffer: 使用前请按标签提示加入含量95%以上的无水乙醇。
- 3) Lysis Buffer: 在低于室温时会沉淀, 请于50°C左右水浴加热至沉淀完全溶解, 使用后保证Lysis Buffer瓶盖旋紧。
- 4) Neutralization Buffer: 低于10°C会沉淀, 请于37°C左右水浴加热至完全溶解, 溶液澄清。
- 5) 在室温下进行所有离心操作。

- 6) 使用前在每支MidiSpin column中加入1ml Balance Buffer, 室温静置2mins, 5,000 ×g离心3mins, 弃去套管内液体, 备用。(使用Balance Buffer处理后, 可以明显提高DNA得率)

操作步骤

1. 取50 μL新鲜的菌液接种到15-50 ml的LB培养基(含适量抗生素), 37°C震荡培养14-16小时。室温下5,000 ×g离心10分钟, 收集菌体, 并尽可能的吸去上清。
注: 残留的液体培养基容易导致菌液裂解不充分,
注: 本操作程序适用于标准LB (Luria Bertani) 培养基培养12-16小时, OD600 (细菌密度) 在2.0-3.0之间的菌液。若用的是富集培养基, 例如TB或2×YT, 请注意保证OD600不超过3.0。
2. 加入2.5 ml Resuspension Buffer (确保已加入RNase A), 用移液器或涡流震荡确保细菌沉淀重新悬浮。
注: 不完全悬浮易导致菌体裂解不完全, 从而使产量降低。
3. 加入2.5ml Lysis Buffer, 轻轻地反转5-10次以混合均匀, 然后静置2-5分钟至溶液粘稠而澄清。
注: 切勿剧烈振荡。静置时间不应超过5分钟, 时间过长会导致基因组DNA污染或质粒受到破坏。若溶液未清亮澄清, 则表明菌体裂解不充分, 应加大Lysis Buffer的用量或减少菌体量。
4. 加入3ml Neutralization Buffer, 立即反转5次, 用手用力摇晃3-5次充分混匀, 此时出现白色絮状沉淀。
注: 使用前将Neutralization Buffer预冷或在加到裂解液后在冰上放1分钟利于减少蛋白漂浮。
5. 将离心管转至高速离心机, 在室温下14,000 ×g离心10分钟(若上清中有白色沉淀, 可再次离心)。
注: 低温下RNase不工作, 易有RNA污染。如果离心机转子较冷, 将离心管在室温下温育10分钟后再离心。
6. 小心吸取离心后的上清液至15ml管中(避免吸起沉淀), 加入3 ml 100%乙醇, 立即摇匀, 需马上离心过DNA柱。
7. 立即转移4ml混合液至带收集管的DNA柱中, 室温下>5,000 ×g离心1分钟, 倒掉收集管中的废液, 将离心柱重新放回到收集管中。重复此步直至所有的溶液通过DNA柱。
8. 向离心柱中加入3ml Wash buffer, 室温下>5,000 ×g离心1分钟, 倒掉收集管中的废液, 将离心柱重新放回到收集管中。重复步骤“8”。
9. 将离心柱放回高速离心机中, 室温下5,000 ×g开盖离心10分钟, 以彻底去除残留的乙醇, 将离心柱置于65度烘箱中放置10min, 有利于彻底去除乙醇。
注: 此步骤中开盖离心将会更有效的去除残留的乙醇。5,000 g转速更有利于去除乙醇。乙醇是否去除干净将会影响最后的洗脱效率。
10. 将离心柱转至一个新的15ml离心管中, 向DNA柱膜的正中加入1.5 ml灭菌ddH₂O (pH在7.0-8.5之间)或Elution Buffer, 室温放置5分钟, 5,000 ×g离心3分钟, 以洗脱质粒DNA。若想提高得率, 将50 ml离心管中的洗脱液再加到柱的中间, 5,000 ×g离心1分钟以洗脱质粒DNA。
注: 加入洗脱液之前, 将洗脱液56°C温浴, 可以提高DNA的洗脱效率。

常见问题及对策

问题	可能原因	建议对策
得率低	细胞裂解不充分	用Resuspension Buffer重悬菌体沉淀后用振荡器充分振荡或移液器反复吹打。 如果Lysis Buffer得瓶盖没有盖紧, 配置新鲜的Lysis Buffer(0.2N NaOH and 1%SDS)。
得率低	细菌培养过长或过短	细菌培养12-16小时。离心收集菌体后, 如不当天使用, 请将沉淀保存于-20℃, 而非4℃。
得率低	低拷贝质粒	增加培养物使用量并 按比例增加 Resuspension Buffer、Lysis Buffer、Neutralization Buffer以及100%乙醇用量。
无DNA	宿主大肠杆菌丢失质粒	重新培养。
基因组DNA污染	加了Lysis Buffer后温浴时间过长	加入Lysis Buffer后不要振荡过于激烈, 也不要温浴超过5分钟。
RNA 污染	RNase A未加入 Resuspension Buffer.	将RNase A 加入到Resuspension Buffer。