

Biospin Plasmid DNA Maxi Extraction Kit

Biospin 质粒 DNA 大量快速提取试剂盒

TECHNICAL SUPPORT:

For technical support, please dial phone number : 0086-571-87774567-5215 or 5211, or fax to
0086-571-87774553

Email to reagent@bioer.com.cn.

Website: www.bioer.com.cn

试剂盒组成

货号	BSC01S1C	BSC01M1C
试剂盒组成	10 人份	25 人份
Balance Buffer	20ml	50ml
Resuspension Buffer	100ml	250ml
Lysis Buffer	100ml	250ml
Neutralization Buffer	120ml	150ml
Washing Buffer	50ml × 2 (使用前加入 75ml 无水乙醇)	70ml × 2 (使用前加入 105ml 无水乙醇)
Elution Buffer	60ml	150ml
RNase A	1 管	1 管
Max Spin column	10 管	25 管
说明书	1 份	1 份

储存与运输

- ◆ 该提取试剂盒于室温保存，RNase A 保存于 2℃-8℃，有效期为 18 个月。
- ◆ 试剂盒可在常温下运输。
- ◆ Resuspension Buffer 中加入 RNase A 后需储存在 2℃-8℃。

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 150—200ml 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 1mg。

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

- * 50ml 离心管
- * 各种规格移液器吸头
- * 离心机（最大转速 ≥ 14,000g）
- * 含量 95% 以上无水乙醇

重要提示

- 1) Resuspension Buffer: 使用前将提供的所有RNase A瞬时离心后加入Resuspension Buffer, 使用后将Resuspension Buffer/RNase A置于2°C~8°C保存。
- 2) 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Maxi Spin column中加入2ml Balance Buffer, 室温孵育2分钟, 5,000 ×g离心3min, 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100 μL新鲜的菌液接种到150–200 mL的LB培养基(含适量抗生素), 37°C震荡培养12–16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10 mL Resuspension Buffer (确保使用前已加入RNase A), 用移液器或涡流震荡确保细菌沉淀重新充分分散悬浮。

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10 mL 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2.8mL 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将其在冰上放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 x g 离心20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50 ml管中（避免吸起沉淀），加入9.2 ml Neutralization Buffer 和12 ml 100% 乙醇，立即摇匀，混合液需马上离心过DNA柱。

7. 立即转移20 ml混合液至带收集管的DNA柱中，室温下 $\geq 2,500 \times g$ 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10 ml Washing Buffer，室温下 $\geq 2,500 \times g$ 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5000 x g 开盖离心10分钟，以彻底去除残留的乙醇。

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. 取出离心柱，65℃烘干10min。

11. 将离心柱转至一个新的50 ml离心管中，向DNA柱膜的正中加入2 ml灭菌ddH₂O（pH在7.0-8.5之间）或Elution Buffer，室温放置5分钟，5000 x g离心2分钟，以洗脱质粒DNA。若想提高得率，可再次向DNA柱膜的正中加入1-2ml灭菌ddH₂O（pH在7.0-8.5之间）或Elution Buffer，室温放置1分钟，5000 x g离心1分钟，以洗脱残留在离心柱吸附膜上的质粒DNA。

也可以将50 ml离心管中的洗脱液再加入到柱的中间，室温放置1分钟，5000 x 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℃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。