



**ELK Biotechnology**  
For research use only.

## Plasmid Prepare Kit

### 质粒小提中量试剂盒说明书

货号	规格	储藏/有效期
EP002-50T	50T	室温/一年
EP002-200T	200T	室温/一年

#### 产品介绍

本试剂盒采用改进的 SDS 碱裂解法，结合高吸附量 DNA 制备膜选择性地吸附 DNA 的方法达到快速纯化质粒 DNA 的目的。适合于从 5-30 ml 细菌培养物中提取多至 60  $\mu$ g 高纯的质粒 DNA，用于测序、体外转录与翻译、限制性内切酶消化、细菌转化等分子生物学实验。

#### 试剂盒组成

成分	EP002-50T	EP002-200T	Storage
Solution A	25 ml	100 ml	RT
Solution B	25 ml	100 ml	RT
Solution C2	35 ml	140 ml	RT
Wash Buffer	60 ml	240 ml	RT
Elution Buffer	10 ml	40 ml	RT
RNaseA	125 $\mu$ l	500 $\mu$ l	-20 $^{\circ}$ C
吸附柱 P 柱	50 套	200 套	RT
说明书	1 份	1 份	RT

#### 一、使用前准备

**Solution A:** 向提供的 Solution A 中添加 RNaseA 后，请将 Solution A 置于 4  $^{\circ}$ C 保存。

**Solution B、C2:** 密封保存。Solution C2 开盖后如果长时间未使用，请检查 Solution C2 的 pH，确保 pH $\leq$ 4.8，如 pH 过高，可加入少量醋酸进行调节。

**Wash Buffer:** 使用前请按要求将无水乙醇加入 Wash Buffer（试剂瓶上有标签提示）中。



# ELK Biotechnology

## For research use only.

### 二、操作步骤

1. 接种菌种到 5-30 ml 的液体培养基, 37 °C 震荡培养 12-16 h。室温下 13,000 g 离心 1 min, 收集菌体, 并尽可能的吸去上清。  
注: a. 残留的液体培养基容易导致菌液裂解不充分, 第 5 步离心后沉淀较松, 不能有效吸取上清。  
b. 本说明书中的操作程序适用于标准 LB (Luria Bertani) 培养基培养 12-16 h 后, 培养液 OD<sub>600</sub> (细菌密度) 在 2.0-3.0 之间的菌液。若采用的是富集培养基, 例如 TB 或 2×YT, 请注意保证 OD<sub>600</sub> 不超过 3.0。
2. 加入 500 μl Solution A, 用涡旋震荡充分悬浮细菌细胞。  
注: 细菌细胞如果没有充分悬浮均匀, 将导致菌体裂解不完全, 从而降低产量。
3. 加入 500 μl Solution B, 轻轻地颠倒混匀 5-10 次以混合均匀, 此时溶液粘稠而澄清。  
注: 切勿剧烈振荡。此步骤时间不超过 5 min, 时间过长会导致基因组 DNA 污染或质粒受到损伤。若溶液未清亮澄清, 则表明菌体裂解不充分, 应加大 Solution B 的用量或减少菌体量。
4. 加入 700 μl Solution C2, 颠倒混匀 5-10 次, 此时出现白色絮状沉淀。
5. 将离心管转至高速离心机, 在室温下 12,000 rpm (≈13,000×g) 离心 10 min (若上清中有白色沉淀漂浮, 可再次离心)。小心吸取离心后的上清液。
6. 将上一步得到的上清液添加至本试剂盒提供的吸附柱 P 柱中 (如一次无法加完, 可分多次加入, 吸取时应避免吸起沉淀), 室温下 12,000 rpm (≈13,000×g) 离心 1 min。弃掉收集管中的废液。
7. 加入 600 μl 的 Wash Buffer 溶液 (**确保已加入无水乙醇**), 室温下 12,000 rpm (≈13,000×g) 离心 1 min, 弃废液。
8. 重复步骤 7。
9. 室温下 12,000 rpm (≈13,000×g) 离心 2 min 以彻底甩下 Wash Buffer 残留。
10. 取出吸附柱 P 柱并放入新的 EP 管中, 将吸附柱 P 柱开盖室温下开盖静置 2 min, 如有需要可放在空调风口吹 1-2 min, 以彻底去除残留的乙醇。
11. 向吸附柱 P 柱正中间加入 100-200 μl (至少 100 μl 的溶解体积) Elution Buffer 或 ddH<sub>2</sub>O (56 °C 水浴后效果更好), 静置 5 min 待吸附的质粒完全溶解, 室温下 13,000×g 离心 2 min 即得到提取的质粒。  
注: 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、转染细胞。若用于转染内毒素敏感性细胞株, 原代细胞及用于微注射, 建议去除内毒素。

### 三、DNA 浓度及纯度

DNA 浓度 (μg/ml) = OD<sub>260</sub> × 50 × 稀释倍数, OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 约为 1.8-2.0



## **ELK Biotechnology**

### **For research use only.**

#### **四、注意事项**

质粒拷贝数:纯化中低拷贝的质粒时, 使用2倍的菌液体积, 2倍的Solution A,B,C2, 相同体积的Wash Buffer和Elution Buffer。

转化菌:若为-80 °C甘油冻存的菌, 请先涂布平板培养后, 再重新挑选新的单个菌落进行培养。切勿直接取冻存的菌种进行培养。

#### **五、常见问题及解答**

##### **1、未提出质粒或者质粒浓度很低**

###### **A、菌种老化:**

建议: 对于甘油保存的菌种, 需要先进行活化。涂布或者划线菌种, 重新挑选单菌落进行液体培养, 并对菌种进行初摇活化, 按照 1: 500 的比例进行菌种培养。二次培养细胞最好不要超过 16 小时。

###### **B、质粒丢失**

建议: 某些质粒在多次继代培养的过程中会出现丢失的现象, 另外检查筛选抗生素的浓度是否正确。

###### **C、裂解不充分**

建议: 如果采用超过推荐量的菌体进行质粒制备, 会导致菌体裂解不充分。可适当减少菌体的用量或者相应增大各种 Solution 的用量。请根据选取的试剂盒, 处理相应量的细菌量。

###### **D、Solution 中有沉淀未溶解**

建议: Solution B 和 Solution C2 在温度较低时会出现沉淀, 使用前请检查是否有沉淀生成, 如有沉淀生成, 请置于 37 °C 温育片刻, 待溶液澄清后使用。

###### **E、DNA Wash Buffer 中未按要求加入无水乙醇。**

建议: 按照说明书要求加入要求量的无水乙醇, 使用后旋紧瓶盖, 防止乙醇挥发。

###### **F、溶解液 pH 值不正确**

建议: 将 DNA 从柱子上溶解下来的最适 pH 值在 7.0~8.5 之间, 如果溶解液的 pH 超出此范围将会显著影响溶解效果, 请使用试剂盒配套的 Elution Buffer (pH 8.0, 10 mM Tris-HCl) 进行溶解, 如果用 ddH<sub>2</sub>O 或者其他溶液进行溶解, 请确保 pH 在 7.0~8.5 之间。

###### **G、溶解体积及时间的选择**

建议: 溶解体积将会影响最终的收获量, 溶解体积越大, 收获量越高, 但是浓度将会降低。请使用试剂盒推荐的溶解体积进行溶解, 以保证最好的收获量和浓度。如果需要高浓度的质粒, 请减少溶解体积。

另外, 如果想收获高浓度高收获量的质粒, 可进行二次溶解。

建议: 加入 Elution Buffer 后, 室温放置 2~5 min, 更有利于溶解。



## **ELK Biotechnology**

**For research use only.**

### **2、质粒纯度不高**

#### **A、蛋白质污染 $OD_{260}/OD_{280}<1.8$**

建议：选择推荐量的菌体，离心后小心吸取上清，如果上清液中混有悬浮物，可再次离心，以彻底去除蛋白质。

#### **B、RNA 污染 $OD_{260}/OD_{280}>2.0$**

建议：检查配送的 RNase A 是否完全加入到 Solution A 中，加入 RNase 后，Solution A/RNase 应该存放在 4 °C，如果存放时间过长，或者没有正确存放，请重新加入 RNase。

#### **C、基因组 DNA 污染**

建议：加入 Solution B 后，轻轻颠倒混匀，避免剧烈震荡涡旋，加入 Solution B 的处理时间最好不要超过 5 min。