



**ELK Biotechnology**  
For research use only.

## EndoFree Plasmid Miniprep Kit

### 无内毒素质粒小量提取试剂盒说明书

货号	规格	储藏/有效期
EP004-50T	50T	室温/一年
EP004-200T	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 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 1-5 ml 细菌培养物中提取多至 20 µg 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	EP004-50T	EP004-200T	Storage
Solution A	15 ml	60 ml	RT
Solution B	15 ml	60 ml	RT
Solution C	15 ml	60 ml	RT
Endo-Remove Buffer	4 ml	16ml	2-8°C
Wsh Buffer	60 ml	240 ml	RT
Elution Buffer	5 ml	20 ml	RT
RNase A	75 µl	300 µl	-20°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°C 保存。

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

**Wsh Buffer:** 使用前请将无水乙醇加入 Wsh Buffer（试剂瓶上有标签提示）。

**Endo-Remove Buffer:** 长期保存需要放在 2-8°C



# ELK Biotechnology

## For research use only.

### 二、操作步骤

1. 接种菌种到1-5 ml 的液体培养基，37°C震荡培养12-16 h。室温下12,000 g离心1min，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，第5步离心后沉淀较松，不能有效吸取上清。**

**注：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 小时后，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250 μl Solution A，用涡流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 250 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250 μl Solution C，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12,000rpm(≈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. 向上清中添加1/10倍体积的Endo-Remove Buffer (例如上清是500μl，加入50μl的Endo-Remove Buffer)。

7. 冰浴10min，期间上下颠倒混匀数次以冰浴完全。(加入Endo-Remove Buffer后，混合体系可能会变浑浊，冰浴后应恢复澄清)

8. 42°C下孵育5-10min，期间可上下颠倒数次。(此时溶液又将出现浑浊)

9. 室温下12,000rpm(≈13,000×g)离心5min，此时溶液将出现分层现象，小心的吸取上清到新的1.5 ml EP管中。

**注意，此步骤的温度要求一定要在20°C以上，否则将不出现分层，导致内毒素无法去除。对于冷冻离心机，建议提前调到25°C。**

10. 加入3倍体积的无水乙醇，上下颠倒混匀6-8次，室温下静置1-2min。

11. 将上一步得到的混合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)，室温下12,000rpm(≈13,000×g)离心1 min。弃掉收集管中的废液。

12. 加入600 μl 的Wsh Buffer溶液 (**确保已加入无水乙醇**)，室温下12,000rpm(≈13,000×g)离心1 min，弃废液。

**13. 重复步骤12。**

14. 室温下12,000rpm(≈13,000×g)离心2 min以彻底甩下Wsh Buffer残留。

15. 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，以彻底去除残留的乙醇。

16. 向吸附柱P柱正中间加入30-100 μl (推荐50μl的溶解体积)Elution Buffer或ddH<sub>2</sub>O (56°C水浴后效果更好)，静置5min待吸附的质粒完全溶解，室温下12,000rpm(≈13,000×g)离心2 min即得到提取的质粒。



# ELK Biotechnology

## For research use only.

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。

### 三、DNA浓度及纯度

DNA浓度( $\mu\text{g/ml}$ ) =  $\text{OD}_{260} \times 50 \times$  稀释倍数,  $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ 约为1.8-2.0

### 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 Wsah Buffer 和 Elution Buffer。

转化菌:若为 $-80^{\circ}\text{C}$ 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、没有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 Buffer 的用量。请根据选取的试剂盒,处理相应量的细菌量。

##### D、Buffer 中有沉淀未溶解

建议: Solution B 和 Solution C 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 $37^{\circ}\text{C}$ 温育片刻,待溶液澄清后使用。

##### E、DNA Wash Buffer 中未按要求加入乙醇

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 8.5, 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



## ELK Biotechnology

### For research use only.

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。

## 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。