



ELK Biotechnology
For research use only.

Endo-Low Plasmid Prepare Kit

低内毒素质粒小提中量试剂盒说明书

货号	规格	储藏/有效期
EP015-50T	50T	室温/一年
EP015-200T	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, 配合专用 Endo-Remove Buffer, 可有效去除内毒素。适合于从 5-30 ml 细菌培养物中提取多至 60 µg 高纯的质粒 DNA, 用于测序、转染、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	EP015-50T	EP015-200T	Storage
Solution A	25 ml	100ml	RT
Solution B	25 ml	100ml	RT
Solution C2	35 ml	140ml	RT
Endo-Remove Buffer	9 ml	36 ml	2-8°C
Wash Buffer	60 ml	240ml	RT
Elution Buffer	10 ml	40ml	RT
RNaseA	125 µl	500 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、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≤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.

Endo-Remove Buffer: 长期保存需要放在 2-8°C。

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 OD₆₀₀ (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 OD₆₀₀ 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. 向上清中添加 1/10 体积的 Endo-Remove Buffer (例如上清是 500 μl, 加入 50 μl 的 Endo-Remove Buffer)。
7. 冰浴 10 min, 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 5-10 min, 期间可上下颠倒数次。(此时溶液又将出现浑浊)
9. **室温下** 12,000 rpm (≈ 13,000 × g) 离心 5 min, 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 1-2 min。
11. 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。
12. 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。
13. 重复操作步骤 12。
14. 室温下 12,000 rpm (≈ 13,000 × g) 离心 2 min 以彻底甩下 Wash Buffer 残留。



ELK Biotechnology

For research use only.

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，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。
16. 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ddH₂O (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 \times 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。

三、DNA浓度及纯度

DNA浓度($\mu\text{g/ml}$) = OD₂₆₀ \times 50 \times 稀释倍数，OD₂₆₀/OD₂₈₀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。



ELK Biotechnology

For research use only.

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 ddH₂O 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。

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。