



ELK Biotechnology
For research use only.

Max Plasmid Purification Kit

高纯度质粒大提试剂盒

货号	规格	储藏/有效期
EP003-10T	10T	室温/一年
EP003-20T	20T	室温/一年

产品介绍

本试剂盒采用独特的缓冲系统, 结合传统的异丙醇沉淀方法, 可快速地获得大量高纯度的质粒 DNA。使用本试剂盒提取的质粒 DNA 可适用于各种常规操作, 包括酶切、PCR、测序、连接、转化和转染多种细胞等实验。推荐每次菌液使用量: 高拷贝质粒推荐使用量为 100 ml, 得率一般在 200-1500 μg 左右; 低拷贝质粒推荐使用量为 200 ml, 得率一般在 100-400 μg 左右。

试剂盒组成

成分	EP003-10T	EP003-20T	Storage
RNase A	250 μl	500 μl	-20°C
Solution A	50 ml	100 ml	RT
Solution B	50 ml	100 ml	RT
Solution C	50 ml	100 ml	RT
MagPurp	250 μl	500 μl	RT
Elution Buffer	10 ml	20 ml	RT
过滤柱 S 柱	10 支	20 支	RT
说明书	1 份	1 份	RT

一、使用前准备

该试剂盒置于室温(15-25 $^{\circ}\text{C}$)干燥条件下, 可保存 12 个月, 更长时间的保存可置于 2-8 $^{\circ}\text{C}$ 。2-8 $^{\circ}\text{C}$ 保存条件下, 若溶液产生沉淀, 使用前应将试剂盒内的溶液在室温放置一段时间, 必要时可在 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中预热 10 min, 以溶解沉淀。

- Solution A: 向提供的 Solution A 中添加 RNase A 后, 请将 Solution A 置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。
- 使用前先检查 Solution B 和 C 是否出现结晶或者沉淀, 如有结晶或者沉淀现象, 可在 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中



ELK Biotechnology

For research use only.

加热几分钟，即可恢复澄清。

- c) 自备约 500 ml 异丙醇及 75%乙醇。
- d) 注意不要直接接触 Solution B 和 C，使用后应立即盖紧盖子。
- e) 使用过滤器时请将推柄小心缓慢地从过滤管中抽出，避免滤膜因压力而松动。
- f) 提取的质粒量与细菌培养浓度、质粒拷贝数等因素有关。如果所提质粒为低拷贝质粒或大于 10 kb 的大质粒，应加大菌体使用量，同时按比例增加 A、B、C 的用量；Elution Buffer 推荐在 65-70 °C 水浴中预热。
- g) **MagPurp** 的使用方法：MagPurp 是一种指示剂，用以指示整个操作的正确性，对人体无害。MagPurp 为可选试剂，客户根据需求选择是否添加。如果提取质粒后需要进行转染实验，不建议客户在实验中加入 MagPurp 试剂。使用时按照 MagPurp: Solution A=1:200 进行混合，彻底颠倒混匀，混匀后的溶液为澄清的紫红色。将混匀后的溶液加入到收集好的菌体中彻底混匀，由于菌体的存在，混匀后的溶液为浑浊的紫红色；添加 Solution B 之后彻底混匀后，溶液的颜色为澄清的紫色，则说明充分裂解；再添加 Solution C 至彻底混匀后，溶液为黄色，说明中和复性充分。

二、操作步骤

1. 取 100 ml (根据培养菌体的浓度选择合适的量，低拷贝推荐用 **200 ml**) 过夜培养的菌液，室温 10,000 rpm (~11,500×g) 离心 3 min 收集细菌，尽量吸去上清。为确保上清液全部吸取，请倒置干净的吸水纸上。
注意：菌液较多时，可多次离心并将菌体沉淀收集到一个离心管中。
2. 向留有菌体沉淀的离心管中加入 5 ml Solution A(请确保已加入 RNase A)，使用移液器或涡旋振荡器彻底悬浮细菌细胞沉淀。
注意：请务必彻底混悬，如果有未彻底混匀的菌块，会影响裂解，导致提取量和纯度偏低。MagPurp 试剂的加入对于后续 PCR、酶切和测序都没有影响。使用时按照 MagPurp: Solution A=1:200 进行混合，彻底颠倒混匀，混匀后的溶液为紫红色。将混匀后的溶液加入到收集好的菌体中彻底混匀，由于菌体的存在，混匀后的溶液为浑浊的紫色。如果提取质粒后需要进行转染实验，不建议客户在实验中加入 MagPurp 试剂。
3. 向离心管中加入 5 ml Solution B，立即温和地上下翻转 6-8 次，使菌体充分裂解，室温放置 5 min。
注意：动作轻缓，切勿剧烈震荡，以免污染基因组 DNA。此时菌液应变得清亮粘稠，如果未变得清亮，可能由于菌体过多，裂解不彻底，应减少菌体量。如果使用了 MagPurp，添加 Solution B 彻底混匀后，溶液的颜色为澄清的紫色。如果在紫色中混杂有浑浊的紫红色，则说明裂解不充分，继续混匀直至溶液颜色完全变为澄清的紫色。
4. 向离心管中加入 5 ml Solution C，立即温和地上下翻转 6-8 次，充分混匀，至溶液出现白色分散絮状沉淀。室温放置 10 min 左右。



ELK Biotechnology

For research use only.

5. 10,000 rpm (~11,500×g)离心 10 min, 使白色沉淀离至管底 (可适当增加离心时间), 转移到新的 50 ml 离心管中, 将全部溶液小心倒入过滤住 S 柱中 (请避免倒入大量沉淀而阻塞过滤器), 慢慢推动推柄过滤, 滤液收集在干净的 50 ml 的管中 (**客户自备**) .

注意: 加入 Solution C 后应立即混匀, 避免产生局部沉淀。如果菌体过多 (>100 ml), 推荐延长离心时间至 20-30 min。

如果使用了 MagPurp, 添加 Solution C 彻底混匀后, 溶液为淡黄色, 沉淀为黄色, 如果在黄色中混有紫色, 则说明复性不充分, 继续混匀至溶液颜色完全变为澄清的黄色。

6. 向滤液中加入 2/3 倍滤液体积的异丙醇, 上下颠倒充分混匀。
7. 4 °C 10,000 rpm (~11,500×g)离心 30 min, 轻轻倒掉上清液, 将其倒置在吸水纸上。
8. 向管中加入 6 ml 75%乙醇充分漂洗沉淀, 4 °C 10,000 rpm (~11,500×g)离心 10 min, 轻轻倒掉上清液, 将其倒置在吸水纸上。
9. 重复步骤 8。
10. 将离心管敞口室温放置 10-20 min, 使乙醇充分挥发后加入 0.3-1 ml (低拷贝数建议使用 0.2-0.5ml) Elution Buffer, 充分溶解沉淀。

注意: 洗脱液的 pH 值对于洗脱效率有很大影响。若用 ddH₂O 做洗脱液应保证其 pH 值在 7.5-8.0 范围内, pH 值低于 7.0 会降低洗脱效率。Elution Buffer 用量的多少主要是依据质粒的拷贝数以及实验所需要的浓度来确定。DNA 产物应保存在 -20 °C, 以防 DNA 降解。

三、DNA 浓度及纯度检测

得到的质粒 DNA 可用琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测浓度与纯度。电泳可能为多条带, 这些条带是质粒的多聚体造成的, 不影响后续的酶切、转染等实验。OD₂₆₀ 值为 1 相当于大约 50 µg/ml 双链 DNA。纯化的质粒 DNA OD₂₆₀/OD₂₈₀ 通常在 1.8-2.0 左右, 可直接应用于分子生物学等常规操作。如果溶解时不使用缓冲液, 而使用 ddH₂O, 比值会偏低, 但并不表示纯度低, 因为 pH 值和离子存在会影响光吸收值。

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,C, 相同体积的 70%乙醇和 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。



ELK Biotechnology

For research use only.

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、溶解液 pH 值不正确

建议：将 DNA 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 ddH₂O 或者其他溶液进行溶解，请确保 pH 在 7.0~8.5 之间。

F、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。