



珀罗汀生物
PLD TECHNOLOGY

PLD 质粒抽提试剂盒 (无细胞专用)

苏州珀罗汀生物技术有限公司
Suzhou PLD Technology, Co., Ltd.

修订日期: 2024 年 2 月 23 日

目录

试剂盒组成、贮存、稳定性	2
注意事项	3
实验准备	3
实验操作步骤	3
流程图	7
实验可能出现的问题及解决方案	8

一. 试剂盒组成、贮存、稳定性

制备次数	10 次
------	------

耗材	
核酸吸附柱	10 个
1.5ml 离心管	10 个
2ml 离心管	10 个
试剂	
S1	3ml
S2	3ml
S4	4ml
W2*2	1.5ml*2
ddH ₂ O	1ml

S1：细菌悬浮液，室温密闭贮存。

S2：细菌裂解液（含 SDS/NaOH），室温密闭贮存。

S4：中和液，室温密闭贮存。

W2：去盐液。使用前，按试剂瓶上指定的体积加入无水乙醇（可用 100%乙醇或 95%乙醇）。混合均匀，室温密闭贮存。

ddH₂O：洗脱液，室温密闭贮存。

二. 注意事项

S2、S4 含刺激性化合物,操作时要带乳胶手套和眼镜,避免沾染皮肤、眼睛和衣服,谨防吸入口鼻。若沾染皮肤、眼睛时,要立即用大量清水或生理盐水冲洗,必要时寻求医疗咨询。

三. 实验准备

- 1、准备无核酸和核酸酶污染的 Tip 头、离心管。
- 2、第一次使用前, W2 中加入指定体积的无水乙醇。
- 3、使用前,检查 Buffer S2 是否出现沉淀,应于 37℃ 温浴加热溶解并冷却至室温后在使用。

四. 实验操作步骤

A. 菌种扩增

准备: 取 1 支灭过菌 15mL 离心管、2YT 液体培养基、抗生素

- 1) 15mL 离心管中加入 4mL 2YT 液体培养基。
- 2) 培养基中加抗生素,混匀后加入菌种(接菌比例 1/1000)。
- 3) 37° C, 220 rpm, 培养 8h, 备用。

B. 养菌

准备：取 250 mL 灭过菌的锥形瓶、2YT 液体培养基、抗生素

1)250 mL 锥形瓶中加入 50 mL 2YT 液体培养基

2)培养基中加抗生素（例如：50 mL 2YT 液体培养基加 25 μ L Kan 抗生素，终浓度为 25 μ g/mL），混匀后加入菌种（接菌比例 1/1000）。

3)37° C, 220 rpm, 16h

C. 测 OD600 值、收菌

测 OD600 值（过夜菌稀释 10 倍测量）。取过夜的菌液 4 mL（以 D124 为例，4ml 菌液约收 0.07g 菌体），收到 1 个 2 mL 离心管里，12000g 离心 1min，弃尽上清。

D. 细菌重悬

加 250 μ L Buffer S1，悬浮细菌沉淀，悬浮需均匀，不应留有小的菌块。

E. 细菌裂解

加 250 μ L Buffer S2，温和并充分地上下翻转 4-6 次混合均匀使菌体充分裂解，直至形成透亮的溶液。此步骤不宜超过 5 min。

F. 中和

加 350 μ L Buffer S4，温和并充分地上下翻转混合 6-8 次，

12000g 离心 10min。

G. 结合

吸取步骤 F 中的离心上清并转移到核酸吸附柱(置于 2 mL 离心管 (试剂盒内提供) 中)，12000g 离心 1min，弃滤液。

H. 漂洗

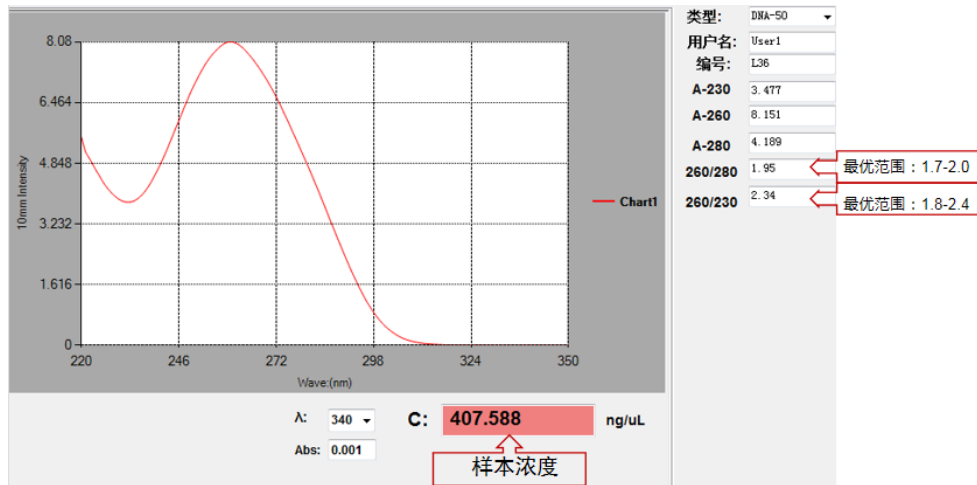
- 1) 将制备管置回离心管，加 700 μ L Buffer W2，12000g 离心 1min，弃滤液。
- 2) 以同样的方法 再用 700 μ L Buffer W2 洗涤一次。弃滤液。
- 3) 将制备管置回 2ml 离心管中，空甩 12000g 离心 1min。

I. 洗脱

将制备管移入新的 1.5 mL 离心管 (试剂盒内提供) 中，在制备管膜中央加 30 μ L ddH₂O (加入 65℃ 的 H₂O 可以提高质粒得率)，室温静置 1 min。12000g 离心 1min。

J. 浓度测定

取 2ul 样本，使用微量分光光度计 Nano-100 测定浓度。示例：

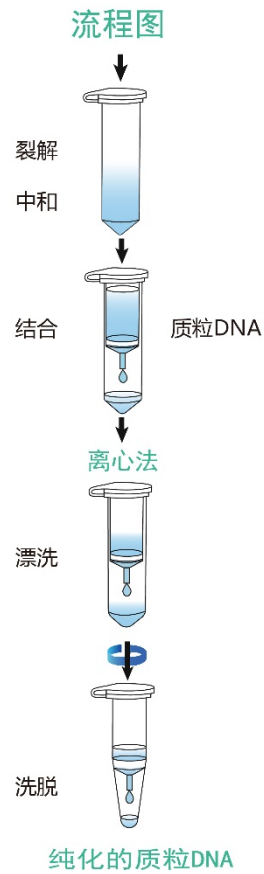


五. 流程图

加 250 μ L S1
加 250 μ L S2
加 350 μ L S4

加 700 μ L Buffer W2
加 700 μ L Buffer W2

加 30 μ L ddH₂O



六. 实验可能出现的问题及解决方案

问题	可能原因	解决方式
得率低或纯化不到质粒	质粒丢失	在含有新鲜抗生素的平板上重新划甘油菌培养。若当前使用的是氨苄青霉素，可以考虑试用羧苄青霉素。如果有必要，可重新转化质粒或使用不同的宿主菌。
	细菌裂解不完全	1) 菌量过多，将菌量减少为原先的一半（实际操作中可按实验情况相应调整）。 2) S2 过期，S2 中的 NaOH 被空气中的 CO ₂ 中和，使用完要立即拧紧瓶盖。
	细菌重悬不完全	在加入 S1 后注意观察细菌是否完全悬浮、是否有

		菌块残留。
	质粒过早的被洗脱	确保 W2 中已经加入正确体积的无水乙醇。
	洗脱效率低，膜过干	洗脱液 ddH ₂ O 65℃预热以及增加洗脱时间至 5min，都可提高洗脱效率。
DNA 纯度低 (高纯度的质粒 A260/280 比值通常在 1.7-1.9 之间。低于 1.7 考虑蛋白质污染，高于 1.9 考虑 RNA 污染。)	A260/280 比值过低，表现为琼脂糖凝胶电泳的背景底色亮和酶切效率低。	1) 菌量过多 2) 加入 S1 后菌体未完全悬起 3) 加入 S2 后裂解不完全 4) 加入 S4 后中和不完全
	A260/280 比值过高，表现为电泳时会出现 RNA 条带	1) 菌量过多 2) 加入 S1 后菌体没有完全悬起 3) 加入 S2 后裂解不完全



苏州珀罗汀生物技术有限公司

苏州工业园区界浦路69号维力医疗科创园1号楼302室

☎ 0512-67900128 ✉ sz_protein@163.com 🌐 www.cellfreeprotein.cn

