Version：AD 5.0（2024.02.22修订）

SPARKeasy Endofree Midi Plasmid Kit

无内毒素质粒小提中量提取试剂盒

（离心柱型）

目录号：AD0105

01/产品组分

序号	组分	50 次 AD0105
1	RNase A（10 mg/mL）	250 μL
2	溶液 P1	25 mL
3	溶液 P2	25 mL
4	溶液 P3	25 mL
5	去蛋白液 PE	16 mL 第一次使用前加入 9.4 mL 无水乙醇
6	内毒素清除剂	10 mL
7	漂洗液 WB	20 mL 第一次使用前加入 60 mL 无水乙醇
8	洗脱缓冲液 EB	15 mL
9	吸附柱 AC	50 个
10	收集管（2 mL）	50 个

02/保存条件

RNase A、内毒素清除剂于-20℃保存，其它组分室温保存。

03/产品概述

本试剂盒采用改进 SDS-碱裂解法裂解细胞，操作简单方便，可在 1 h 内完成单个样本的抽提工作。离心吸附柱内的硅基质膜在高盐、低 pH 值状态下选择性地结合溶液中的质粒 DNA，再通过去蛋白液和漂洗液将杂质和其它细菌成分去除，最后低盐、高 pH 值的洗脱缓冲液将纯净质粒 DNA 从硅基质膜上洗脱。

推荐使用量及产量：高拷贝质粒推荐使用量 5-15 mL，得率可多达 15-70 μg 左右；低拷贝质粒或大于 10 kb 的大质粒，应适当加大菌体量，同时按比例增加溶液 P1、溶液 P2、溶液 P3 的用量，其它步骤相同。

04/自备材料

无水乙醇、异丙醇

05/注意事项

请务必在使用本试剂盒之前阅读此注意事项

◇ 所有离心操作步骤，均在室温（15-25℃）下进行。

◇ 第一次使用时，将试剂盒所带的全部 RNase A 加入溶液 P1 后（终浓度 100 μg/mL）置于 4℃保存。如果溶液 P1 中 RNase A 失活，提取的质粒可能会有微量 RNA 残留，在溶液 P1 中补加 RNase A 即可。

◇ 环境温度低时溶液 P2 中 SDS 可能会析出浑浊或者沉淀，可在 37℃水浴加热几分钟，即可恢复澄清，不要剧烈摇晃，以免形成过量的泡沫

◇ 避免试剂长时间暴露于空气中产生挥发、氧化、pH 值变化，各溶液使用后应及时盖紧瓶盖。

◇ 第一次使用前请先在漂洗液 WB 瓶和去蛋白液 PE 瓶中加入指定量无水乙醇，充分混匀，加入后请及时在方框打钩标记已加入乙醇，以免多次加入！

06/使用方案

1. 取5-15 mL过夜培养的菌液，9,000 rpm（10,000×g）离心1-2 min，尽可能的倒干上清，收集菌体。
2. 用500 μL溶液P1重悬菌体沉淀，涡旋振荡或用移液器吹打至彻底悬浮，全部转入一个2 mL离心管。

   ▲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。
3. 加500 μL的溶液P2，温和地上下翻转6-8次使菌体充分裂解，室温放置4 min。

   ▲温和地混合，不要剧烈震荡，以免基因组DNA剪切断裂！所用时间不应超过5 min，以免质粒受到破坏。此时菌液应变得清亮粘稠，如果菌体少，很快清亮粘稠后就可以做下一步。
4. 加500 μL溶液P3，立即温和地上下翻转6-8次，充分混匀时会出现白色絮状沉淀。12,500 rpm（14,500×g）离心10 min，小心取上清至新管，避免吸取到漂浮白色沉淀。
5. 加入0.1体积（上清的体积的10%，约150 μL）的内毒素清除剂到上一步所得上清，颠倒旋转混匀，冰浴或者插入碎冰中（或冰箱冷冻室）放置5 min直到浑浊变清亮透明（或仍旧稍有浑浊），中间偶尔混匀几次。

   ▲内毒素清除剂加入上清后，上清会变得浑浊，但是冰浴后应恢复清亮（或稍浑浊）。
6. 常温放置3-5 min，温度恢复室温溶液很快变为浑浊，颠倒混匀。

   ▲如室内温度较低或者想加快速度可以在37-42℃水浴，将很快变浑浊，颠倒混匀。
7. 室温12,500 rpm（14,500×g）离心10 min分相。上层水相含DNA，下层蓝色油状相含内毒素和杂质。将含DNA的上层水相转移到新管（注意不要吸到蓝色油状层），弃油状层。

8. 向上层水相中加入0.5体积异丙醇（约700 μL）后充分颠倒混匀后分多次（每次不超过700 μL）转入吸附柱AC中（吸附柱放入收集管中），12,000 rpm（13,400×g）离心1 min，倒掉收集管中的废液。直到所有混合溶液通过此吸附柱。

9. 加入500 μL去蛋白液PE（确认已加入无水乙醇！），12,000 rpm（13,400×g）离心30 s，弃废液。

▲如此步骤为了去除痕量核酸酶等杂质，如所用菌株为JM系列、HB101等endA菌株或野生型菌株，核酸酶含量丰富，应加此步骤；如所用菌株为XL-1 Blue、Top10和DH5α等缺陷型菌株，核酸酶含量低，则可略过此步骤。

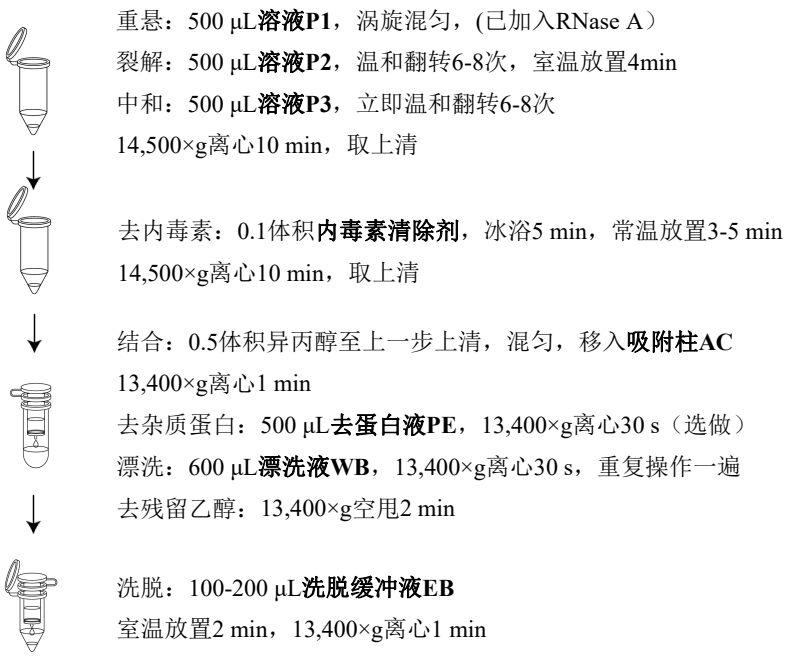
10. 加入600 μL漂洗液WB（请先检查是否已加入无水乙醇！），12,000 rpm（13,400×g）离心30 s，弃掉废液。重复此步骤。

11. 将吸附柱AC放回空收集管中，12,000 rpm（13,400×g）离心2 min，尽量除去漂洗液，以免漂洗液中残留乙醇抑制下游反应。

12. 取出吸附柱AC，放入一个干净的离心管中，在吸附膜的中间部位加100-200 μL洗脱缓冲液EB（事先在65-70℃水浴中加热效果更好），室温放置2 min，12,000 rpm（13,400×g）离心1 min。如果需要较多量质粒，可将得到的溶液重新加入离心吸附柱中，室温放置2 min，离心1 min。

▲洗脱体积越大，洗脱效率越高。如果需要质粒浓度较高，可以适当减少洗脱体积，但是最小体积不应少于100 μL，体积过小降低质粒洗脱效率，减少质粒产量。

07/流程简图



08/相关产品

AA0201 SPARKeasy 细菌基因组DNA快速提取试剂盒

AA1904-A RNase A（10 mg/mL）

AD0101 SPARKeasy 质粒小量极速提取试剂盒

AD0102 SPARKeasy 高纯度质粒小量快速提取试剂盒

AD0104 SPARKeasy 高纯度质粒小提中量试剂盒

AD0303 SPARKeasy 无内毒素高纯质粒大量提取试剂盒

AE0101 胶回收/PCR产物纯化试剂盒

AK0601 Spark HiFi Seamless Cloning Kit

AK0603 Spark HiFi Seamless Cloning Kit（单片段）

本产品仅用于科学研究！

Tel：0531-82387577

Web： http://www.sparkjade.com

Support： support@sparkjade.com