Version：AD 6.0（2025.03.31修订）

SPARKeasy Endofree Maxi Plasmid Kit

无内毒素高纯质粒大量提取试剂盒

（离心柱型）

目录号：AD0303

01/产品组分

序号	组分	10 次 AD0303
1	RNase A（10 mg/mL）	780 μL
2	溶液 P1	78 mL
3	溶液 P2	78 mL
4	溶液 P3	78 mL
5	内毒素清除剂	25 mL
6	去蛋白液 PE	68 mL 第一次使用前加入 40 mL 无水乙醇
7	漂洗液 WB	27 mL×2 第一次使用前加入 81 mL×2 无水乙醇
8	洗脱缓冲液 EB	20 mL
9	吸附柱 DC 和收集管	10 套
10	收集管（50 mL）	10 个

02/保存条件

本试剂盒所有组分室温（15-25℃）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 内完成单个样品的抽提工作。质粒 DNA 在高盐、低 pH 值状态下选择性地结合于离心吸附柱内的硅基质膜上，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 150-300 mL，得率可多达 0.2-1.5 mg；低拷贝质粒或大于 10 kb 的大质粒，应适当增加菌体量，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

异丙醇、无水乙醇

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。

◇ 初次使用时，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 可能会析出沉淀或出现混浊，可在 37 ℃水浴加热帮助恢复澄清，不要剧烈摇晃，以免形成过量泡沫。

◇ 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。

◇ 首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无水乙醇，以免多次加入！

06/使用方案

1. 取150-200 mL（最多不超过300 mL）过夜培养的菌液，10,000×g离心1-2 min，尽可能的倒干上清，收集菌体。

   ▲收集超过50 mL菌液，可以离心弃上清后，在同一个50 mL管内加入更多的菌液，重复步骤1，直到收集到足够的菌体。

2. 加入7.5 mL溶液P1重悬菌体沉淀，移液器吹打或者涡旋振荡至彻底悬浮。

   ▲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7.5 mL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，如果很浑浊，可能由于菌体过多，裂解不彻底，应减少菌体量。

4. 加7.5 mL溶液P3，立即温和地上下翻转6-8次，充分混匀，此时会出现白色絮状沉淀。12,000×g离心10-15 min，小心取上清至新管，避免吸取到白色沉淀。

   ▲加入溶液P3后应该立即混匀，以免产生SDS的局部沉淀。

5. 加入0.1倍体积（上清的体积的10%，约2.2 mL）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10,000-15,000×g离心15 min分相。上层水相含DNA，下层蓝色油状相含内毒素和其它杂质。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。

▲离心时间越长，内毒素含量越低。如果对内毒素含量要求较低，可适当缩短离心时间。

8. 向上层水相中加入0.5体积异丙醇（约10 mL）后充分颠倒混匀后分多次（每次不超过10 mL）转入吸附柱DC中（吸附柱放入收集管中），12,000×g离心2 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10 mL去蛋白液PE（请先检查是否已加入无水乙醇！），12,000×g离心2 min，弃掉废液。

▲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10 mL漂洗液WB（请先检查是否已加入无水乙醇！），12,000×g离心2 min，弃掉废液。再加入10 mL漂洗液WB，重复漂洗一次。

11. 将吸附柱DC放回空收集管中，12,000×g以上离心3 min以干燥基质膜上残留乙醇，用枪头吸除内圈压环和柱壁之间可能残留的乙醇，室温晾干4-5 min。

12. 取出吸附柱DC，放入一个干净的离心管中，在吸附膜的中间部位加1-2 mL洗脱缓冲液EB（事先在65-70℃水浴中预热可提高产量），室温放置3 min，12,000×g离心3 min。

▲为了增加质粒的回收效率，可将得到的溶液重新加入离心吸附柱中，室温放置3min，12,000×g离心3 min。洗脱两遍可提高浓度约10%。

▲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，但是需注意体积过小降低质粒洗脱效率，减少质粒产量（最小不应少于1 mL）。

07/流程简图

重悬：7.5 mL**溶液P1**，涡旋混匀（已加入RNase A）
裂解：7.5 mL**溶液P2**，温和翻转6-8次室温放置4 min
中和：7.5 mL**溶液P3**，立即温和翻转6-8次
12,000×g离心，10-15 min取上清

去内毒素：0.1 倍体积**内毒素清除剂**，冰浴 5 min，常温放置 3-5 min
室温 10,000-15,000×g，离心 15 min，取上清

结合：0.5体积异丙醇至上一步上清，混匀，移入**吸附柱DC**
12,000×g离心2 min
去杂质蛋白：10 mL**去蛋白液PE**，12,000×g离心2 min（选做）
漂洗：10 mL**漂洗液WB**，12,000×g离心2 min，重复操作一遍
去残留乙醇：12,000×g以上离心3 min

洗脱：1-2 mL**洗脱缓冲液EB**
室温放置3 min，12,000×g离心3 min

08/相关产品

AA0202 SPARKeasy 细菌基因组DNA快速提取试剂盒（含蛋白酶K）

AA1904-A RNase A（10 mg/mL）

AD0306 SPARKeasy 无内毒素高纯质粒大量快速提取试剂盒

AE0101 胶回收/PCR产物纯化试剂盒

AK0601 Spark HiFi Seamless Cloning Kit（1-5个片段）

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