

Version: AD 2.1 (2024.09.09修订)

# SPARKeasy Endofree Maxi Plasmid Kit

## 无内毒素高纯质粒大量快速提取试剂盒

### (离心柱型)

目录号: AD0306

## 01/产品组分

| 序号 | 组分                 | 10 次<br>AD0306                   |
|----|--------------------|----------------------------------|
| 1  | RNase A (10 mg/mL) | 750 µL                           |
| 2  | 平衡液                | 20 mL                            |
| 3  | 溶液 P1              | 75 mL                            |
| 4  | 溶液 P2              | 75 mL                            |
| 5  | 溶液 P3              | 75 mL                            |
| 6  | 漂洗液 WB             | 27 mL×2<br>第一次使用前加入 81 mL×2 无水乙醇 |
| 7  | 洗脱缓冲液 EB           | 20 mL                            |
| 8  | 过滤柱 CR             | 10 套                             |
| 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°C) 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 100-300 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。
- ◇ 平衡液在保存过程中可能有沉淀生成，可在 37℃ 水浴加热使沉淀完全消失后使用。
- ◇ 环境温度低时溶液 P2 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

柱平衡步骤：取吸附柱 DC 和收集管，向每个吸附柱硅胶膜中间部位加入 2 mL 的平衡液，10,000 rpm（12,000×g）离心 1 min，倒掉收集管中废液，将吸附柱重新放回收集管中，备用。

1. 取 100-200 mL（最多不超过 300 mL）过夜培养的菌液，10,000 rpm（12,000×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。10,000 rpm（12,000×g）离心 10-15 min，小心将上清倒入过滤柱 CR 中（过滤柱 CR 推杆应缓慢拔出，避免气压过大，过滤膜松动），避免倒入大量沉淀，慢慢推动推杆，收集滤液到干净的 50 mL 离心管中。
  - ▲ 加入溶液 P3 后应该立即混匀，以免产生 SDS 的局部沉淀；充分混匀后应颜色均一，否则应增加温和翻转混匀次数。
  - ▲ 过滤柱 CR 有一定阻力，使用时应缓慢下压推杆，直至液体全部滤过。
5. 准确估计过滤后溶液量，加入 0.5 倍体积异丙醇后充分颠倒混匀后分多次（每次不超过 10 mL）转入平衡过的吸附柱 DC 中（吸附柱放入收集管中），10,000 rpm（12,000×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。
6. 加入 10 mL 漂洗液 WB（请先检查是否已加入无水乙醇！），10,000 rpm（12,000×g）离心 1 min，弃掉废液。再加入 10 mL 漂洗

液WB，重复漂洗一次。

7. 加入3 mL无水乙醇，10,000 rpm (12,000×g) 离心1 min，弃掉废液。

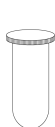
8. 将吸附柱DC放回空收集管中，10,000 rpm (12,000×g) 以上离心2 min以干燥基质膜上残留乙醇，用枪头吸除内圈压环和柱壁之间可能残留的乙醇，室温晾干1-2 min。

9. 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°C水浴中预热可提高产量），10,000 rpm (12,000×g) 离心1 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，10,000 rpm (12,000×g) 离心1 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

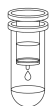


重悬：7.5 mL **溶液P1**，涡旋混匀（已加入RNase A）

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，过滤柱CR过滤



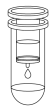
结合：0.5体积异丙醇至上一步上清，混匀，移入**吸附柱DC**

12,000×g离心1 min

漂洗：10 mL **漂洗液WB**，12,000×g离心1 min，重复操作一遍

3 mL无水乙醇，12,000×g离心1 min

去残留乙醇：12,000×g以上离心2 min



晾干：室温晾干1-2 min

洗脱：1-2 mL **洗脱缓冲液EB**

12,000×g离心1 min

## 08/相关产品

- AA0202 SPARKeasy 细菌基因组DNA快速提取试剂盒
- AA1904-A RNase A (10 mg/mL)
- AD0302 SPARKeasy 高纯度质粒大量快速提取试剂盒
- 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 (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](mailto:support@sparkjade.com)

