

Version: AD 1.0 (2025.03.21制定)

SPARKeasy Endofree Midi Plasmid Kit
无内毒素质粒小提中量快速提取试剂盒
(离心柱型)
目录号: AD0107

01/产品组分

序号	组分	50 次 AD0107
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	漂洗液 WB	20 mL
		第一次使用前加入 60 mL 无水乙醇
6	洗脱缓冲液 EB	15 mL
7	过滤柱 DR 和收集管	50 套
8	吸附柱 AC 和收集管	50 套

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 30 min 内完成单个样本的抽提工作。采用特殊的内毒素清除柱系统，能简单有效的去除内毒素等杂质。另外，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；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°C）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°C 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°C 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，12,000 rpm（13,400×g）离心 1-2 min，尽可能的倒干上清，收集菌体。
2. 用 450 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 450 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 450 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。13,500 rpm（17,500×g）离心 5 min。
 - ▲ 加入溶液 P3 后应该立即温和混匀，以免产生 SDS 的局部沉淀。
 - ▲ 离心时间和样本量相关，样本量小于 10 mL 可离心 3-5 min，样本量增加可适当增加离心时间。
 - ▲ 离心机离心转速可以达到的情况下可以适当增加离心转速至 15,000 rpm（21,500×g），适当减少离心时间；相反离心转速达不到适当增加离心时间。
5. 将所得的上清分两次转移至过滤柱 DR（过滤柱 DR 放入收集管中），避免吸收到漂浮白色沉淀，13,500 rpm（17,500×g）离心 30 s。取滤过液收集至新的 2 mL 离心管，加入 0.5 体积异丙醇（约 675 µL），充分混匀。
 - ▲ 过滤柱 DR 最大容量为 750 µL，建议每次过滤量不超过 750 µL，分两次过滤。
6. 取步骤 5 充分混匀后的溶液分多次（每次不超过 750 µL）转入吸附柱 AC 中（吸附柱放入收集管中），13,500 rpm（17,500×g）离心 30 s，倒掉收集管中的废液。直到所有混合溶液通过此吸附柱。

7. 加入600 μL漂洗液WB（请先检查是否已加入无水乙醇！），13,500 rpm（17,500×g）离心30 s，弃掉废液。重复此步骤。
8. 将吸附柱AC放回空收集管中，13,500 rpm（17,500×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。
9. 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，13,500 rpm（17,500×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吸附柱中，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，体积过小会降低质粒洗脱效率，减少质粒产量。

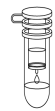
07/流程简图



重悬：450 μL **溶液 P1**，涡旋混匀，（已加入 **RNase A**）
裂解：450 μL **溶液 P2**，温和翻转 6-8 次，室温放置 4 min 左右
中和：450 μL **溶液 P3**，立即温和翻转 6-8 次，13500 rpm 离心 5 min



过滤：取上清分次加入**过滤柱 DR**，13500 rpm 离心 30 s，收集滤液，加入 0.5 倍体积的异丙醇
结合：混好异丙醇的溶液加入**吸附柱**，13500 rpm 离心 30 s，弃废液



漂洗：加入 600 μL **漂洗液 WB**（检查是否已加入无水乙醇！）
13500 rpm 离心 30 s，弃废液；重复该步骤
去残留乙醇：13500 rpm 离心 2 min



洗脱：加入 100-200 μL **洗脱缓冲液 EB**
13500 rpm 离心 1 min

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 高纯度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
AD0105	SPARKeasy 无内毒素质粒小提中量提取试剂盒
AD0303	SPARKeasy 无内毒素高纯质粒大量提取试剂盒
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

