

Version: AD 4.0 (2024.02.22修订)

SPARKclassic Midi Plasmid Kit

质粒中量提取试剂盒

(溶液型)

目录号: AD0201

01/产品组分

序号	组分	20次 AD0201
1	RNase A (10 mg/mL)	0.75 mL
2	溶液 P1	65 mL
3	溶液 P2	50 mL
4	溶液 PIII	50 mL
5	杂质清除剂 A	1.5 mL
6	杂质清除剂 B	15 mL
7	内毒素清除剂	5 mL

02/保存条件

RNase A、内毒素清除剂于-20°C保存，其它组分室温（15-25°C）保存。

03/产品概述

本试剂盒用碱裂解法从培养菌中提取质粒 DNA，1 h 内可完成单个样本的抽提工作，采用独特的溶液配方和内毒素清除试剂，只需要几次简单离心去除蛋白质、多糖、内毒素、RNA 等杂质，获得高质量的质粒 DNA。纯化 DNA 的 OD_{260/280} 通常在 1.8 左右，得到的质粒可直接应用于细胞转染甚至动物体内实验等对 DNA 纯度要求很高的工作中。纯化后期过程均在 1.5 mL 小离心管中操作，方法简单，不需特殊设备，无需过柱，不用酚氯仿抽提；基本可完全回收细菌裂解释放出的质粒，不必担心质粒 DNA 的丢失。本方法提取纯化质粒 DNA，对质粒损伤小，即使是 10 kb 甚至 100 kb 以上的大型质粒或超大型 BAC/PAC 质粒，只要碱裂解法能够提取，就可以有效纯化。可选择任意小体积溶解质粒，浓度可高达 5 µg/µL。超螺旋比例可高达 95%，无内毒素，转染效果好。

推荐使用量及产量：高拷贝质粒推荐使用量 50-70 mL，得率可多达 150-600 µg 左右；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 PIII 的用量，其它步骤相同。

04/自备材料

异丙醇、70%乙醇、纯水或者 TE 溶液

05/注意事项

请务必在使用本试剂盒之前阅读此注意事项

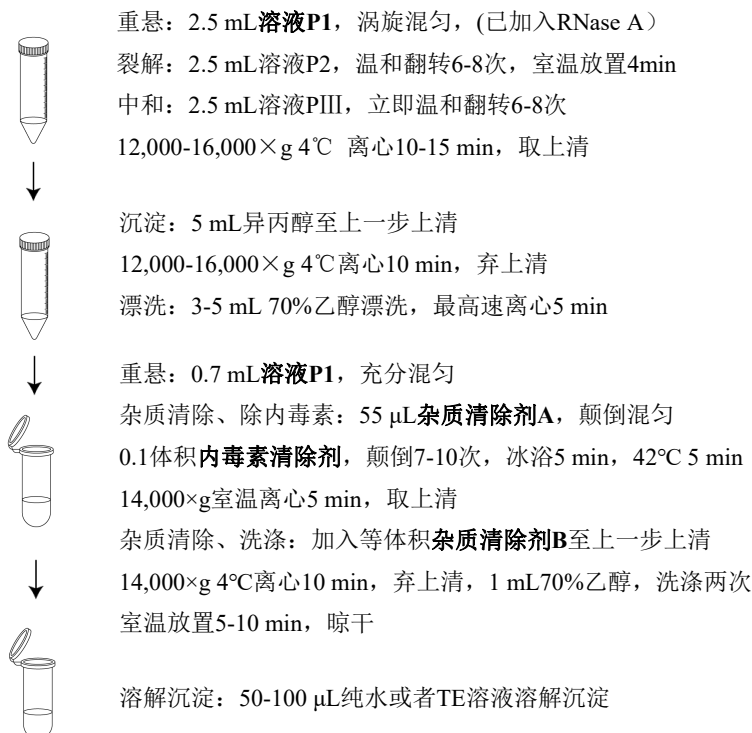
- ◇ 首次使用时，将试剂盒所带的全部 RNase A 加入溶液 P1 后（终浓度 100 µg/mL）置于 4°C 保存。如果溶液 P1 中 RNase A 失活，提取的质粒可能会有微量 RNA 残留，在溶液 P1 中补加 RNase A 即可。
- ◇ 环境温度低时溶液 P2 中 SDS 可能会析出浑浊或者沉淀，可在 37°C 水浴加热帮助溶解，不要剧烈摇晃，以免形成过量泡沫。
- ◇ 避免试剂长时间暴露于空气中产生挥发、氧化、pH 值变化，各溶液使用后应及时盖紧瓶盖。
- ◇ 提取大质粒时操作动作要轻柔，应该使用剪大了开口的吸头，防止机械剪切对 DNA 的损坏。

06/使用方案

1. 取过夜培养菌 40-60 mL（最大不超过 90 mL）菌液，装入 50 mL 离心管中，4,500-6,000×g 于 4°C 离心 5 min 沉淀菌体（也可 12,000×g 离心 2 min），完全弃除上清。
2. 加入 2.5 mL 溶液 P1，充分涡悬震荡或用移液器吹打菌体沉淀，使其完全分散开，至无絮块存在。室温放置 3-5 min。
 - ▲ 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. 加入 2.5 mL 溶液 P2，轻轻颠倒离心管 6-8 次，室温放置 4 min，使细菌完全裂解，溶液透明。
 - ▲ 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。如果未变得清亮，可能由于菌体过多，裂解不彻底，应减少菌体量。
4. 加入 2.5 mL 溶液 PIII，立即颠倒离心管 6-8 次，充分混匀，至白色絮状物产生。上述裂解液于 4°C 12,000-16,000×g 离心 10-15 min，小心吸出上清，移入新的 50 mL 离心管中。
 - ▲ 加入溶液 PIII 后应该立即混匀，以免产生 SDS 的局部沉淀。
5. 加入 5 mL 异丙醇，颠倒混匀溶液。
6. 于 4°C 12,000-16,000×g 离心 10 min，小心弃上清，倒置于吸水纸上轻轻沥干残余液体，加入 3-5 mL 70% 乙醇漂洗一遍，最高速离心 5 min，弃上清，晾干沉淀。
 - ▲ 异丙醇离心沉淀后，质粒大多吸附在管底和侧壁，可能看不见沉淀，但不影响产量，后续步骤仔细吹打管底和沉淀所在的侧壁涮洗溶解质粒。
7. 加入 0.7 mL 溶液 P1 完全溶解沉淀团块，注意附着在管底和侧壁上的质粒沉淀虽然可能看不见，也要吹打管底和沉淀所在的侧壁涮洗下来。然后将质粒溶液转入新的 1.5 mL 离心管中。

- ▲可选步骤：如果菌株RNA丰富有微量RNA残留，可在此步骤后将质粒溶液60°C孵育15 min消化RNA。
8. 加入55 μL杂质清除剂A，颠倒混匀后加入约0.1体积（约80 μL）冰预冷的内毒素清除剂，颠倒旋转7-10次（30 s左右）充分混匀，冰浴或者冰上放置5 min以上，中间偶尔颠倒混匀几次。
- ▲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。
- ▲如果不需要去内毒素用于转染，可在此步骤只加入 55 μL 杂质清除剂 A，充分混匀后冰上放置 5 min，离心后小心取上清转入一个新管，直接接步骤 11。
9. 42°C水浴，溶液又会变为浑浊，颠倒混匀后42°C温育5 min。
10. 室温 14,000×g 离心 5 min 分相（温度低时，内毒素清除剂无法分相，因此必须至少 20°C以上室温离心）。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，弃油状层。溶液必须分为上下两相，否则应重复步骤 9-10。
11. 将上一步所得上层水相中加入等体积杂质清除剂 B（约 750 μL），轻柔混匀，4°C 14,000×g 离心 10 min，弃上清，轻轻加入 1 mL 70%乙醇洗涤，离心弃上清，用 70%乙醇漂洗两次，室温倒置晾干 5-10 min 使乙醇完全挥发。
12. 加适量 TE 或者纯水（50-100 μL）溶解沉淀（可在 37°C水浴中振荡以辅助溶解）。要注意很多质粒 DNA 可能附着在离心管侧壁上，即使看不见，也应该充分吹打侧壁溶解回收质粒 DNA。
- ▲最后沉淀可以根据需要选择任意小体积溶解，这样可以得到很高浓度的转染级质粒 DNA（高达 5-10 μg/μL）。如果有需要，也可以选择更大体积溶解。

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
- 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
- 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

