



λ 噬菌体基因组 DNA 快速提取试剂盒

(离心柱型)

目录号: ZP317

试剂盒内容:

试剂盒组成	ZP317-01 (50 次)	ZP317-02 (100 次)
RNase A	20 mg	20 mg X 2
DNase I	50 mg	50 mg X 2
噬菌体沉淀液	100 ml	200 ml
裂解缓冲液	30 ml	60 ml
杂质沉淀液	5 ml	10 ml
结合液 LB	20 ml	40 ml
漂洗液 WB	15 ml	2×15ml
洗脱缓冲液 EB	15 ml	30 ml
吸附柱 AC	50 个	100 个
收集管 (2ml)	50 个	100 个
说明书	1 份	1 份

本试剂盒在室温储存 12 个月不影响使用效果。

储存事项:

在 RNase A 管和 DNase I 管分别加入 1 毫升的裂解缓冲液吹打,颠倒混匀,充分溶解 RNase A 和 DNase I 后,按照每次使用量分装 - 20℃ 冻存,有效期 6 个月。

产品介绍:

λ 噬菌体载体广泛用于文库筛选,目的克隆培养获得大量的噬菌体颗粒需要提取 λ 噬菌体 DNA 来开展测序等后续工作。λ 噬菌体裂解培养物离心后的上清,首先用 RNase A /DNase I 混合酶消化去除残留的宿主菌 DNA/RNA,沉淀收集噬菌体,噬菌体被 SDS 裂解,残留碎片通过沉淀离心去除掉。裂解物上清中的 λ 噬菌体 DNA 在高离子盐状态下选择性吸附于离心柱内硅基质膜,再通过一系列快速的漂洗 - 离心的步骤,将盐、细胞代谢物、蛋白等杂质去除,最后低盐的洗脱缓冲液将 λ 噬菌体 DNA 从硅基质膜上洗脱。

产品特点:

1. 不需要使用有毒的苯酚等试剂,也不需要乙醇沉淀等步骤。
2. 节省时间,简捷,可用于液体培养裂解物和固体培养板的提取,单个样品操作一般可在 1.5 小时内完成。
3. 产量高,典型的产量 10ml λ 噬菌体裂解培养物上清可以提取约 10μg λ 噬菌体 DNA。
4. 多次柱漂洗确保高纯度,OD260/OD280 典型的比值达 1.7 ~ 1.9。可以直接用来酶切和测序。

注意事项:

1. 使用转速可以达到13,000rpm的冷冻离心机。
2. 开始实验前将需要的水浴先预热到 37℃ 备用。
3. 需要自备氯仿, 20% SDS。
4. 结合液 LB 含有刺激性化合物,操作时要戴乳胶手套,避免沾染皮肤,眼睛和衣服。若沾染皮肤、眼睛时,要用大量清水或者生理盐水冲洗。

操作步骤：（实验前请先阅读注意事项）

以 10 ml 噬菌体感染细菌培养上清提取举例：

提示：

⇒ 第一次使用前请先在 15ml 漂洗液 WB 中加入 60ml 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！

⇒ 将噬菌体沉淀液放在冰上预冷。

1. 将 0.5% 氯仿处理后的 λ 噬菌体感染的液体培养物 10,000g (约 12,000rpm) 4°C 离心 10 分钟去除细胞碎片和残渣。
转速不能过高，时间不能过长，否则噬菌体可能和碎片一起沉淀，降低产量。
2. 取 10ml 上清，加入 20 μ l RNase 和 20 μ l DNase 充分混匀 37°C 温育 30 分钟。
每个噬菌体培养上清因生长和裂解情况不同而残留 RNA/DNA 量不等。RNase/DNase 消化过头，可能减少产量；消化不完全，可能未消化的 DNA/RNA 和细胞碎片粘去部分噬菌体减低产量并/或者导致最后污染宿主菌 DNA，因此应该根据实际情况适当调节用量和消化时间。
3. 加入 2 ml 冰预冷的噬菌体沉淀液，轻柔充分混匀后置冰上冷却（培养板裂解物必须在冰上放置 30 分钟）。
4. 10,000g (12,000rpm) 4°C 离心 10 分钟，弃上清，干燥 1 分钟。沉淀下来的噬菌体外观为透亮或者稍白的沉淀。
5. 加入 500 μ l 裂解缓冲液，吹打重悬噬菌体，加入 100 μ l 20% SDS，立即轻柔颠倒混匀 4-6 次后，70°C 温育 10 分钟，然后置冰上冷却。
6. 加入 100 μ l 杂质沉淀液，立即轻柔颠倒混匀 4-6 次，最高速 13,000g 4°C 离心 10 分钟。

7. 仔细将上清转入新的离心管，加入 350 μ l 结合液 LB，轻柔涡旋混匀。
8. 将上述混合物加入一个吸附柱 AC 中，（吸附柱放入收集管中）12,000rpm 离心 30 秒，倒掉收集管中的废液。
吸附柱一次最多只可以容纳大约 700 μ l 混合物，因此需要分次把混合物上到吸附柱内，重复步骤 8。
9. 加入 700 μ l 漂洗液 WB (请先检查是否已加入无水乙醇!)，12,000rpm 离心 30 秒，弃废液。
10. 可选步骤：重复步骤 9 一遍。
11. 将吸附柱 AC 放回空收集管中，13,000rpm 离心 2 分钟，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 μ l 洗脱缓冲液 EB（洗脱缓冲液事先在 50°C 水浴中预热），室温放置 1 分钟，12,000rpm 离心 1 分钟。如果想得到较多量的 DNA，可将得到的溶液重新加入离心吸附柱中，12,000rpm 离心 1 分钟。
洗脱体积越大，洗脱效率越高，如果需要 DNA 浓度较高，可以适当减少洗脱体积，但是最小体积不应少于 40 μ l，体积过小降低 DNA 洗脱效率，减少 DNA 产量。
13. DNA 可以存放在 2-8°C，如果要长时间存放，可以放置在 -20°C。