

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	ZP317-1 (50次)	ZP317-2 (100次)
RNase A(10mg/ml)	600ul × 2	1.2ml × 2
DNase I	250ul	500ul
噬菌体沉淀液	2 × 150 ml	3 × 200 ml
裂解缓冲液	30 ml	60 ml
SDS 溶液	5 ml	10 ml
缓冲液 B	30 ml	60 ml
蛋白酶 K	0.5ml	1ml
漂洗液 W2	30 ml	30 ml × 2
洗脱缓冲液 TE	15 ml	30 ml
吸附柱 AC	50 个	100 个
收集管 (2ml)	50 个	100 个
说明书	一份	一份

本试剂盒在室温储存 12 个月不影响使用效果。

储存事项: DNase I 按照每次使用量分装 -20°C 冻存, 有效期 12 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。

❖ 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°C 备用。
3. 需要自备氯仿
4. 缓冲液 B 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 8 ml 噬菌体感染细菌培养上清提取举例：

⇒ 第一次使用前请先在 30ml 漂洗液 W2 中加入 90ml 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。

A 收集纯化噬菌体颗粒

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 8ml 上清，加 20 μ l RNase 和 5 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 4 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，吸弃上清；2000g 离心 30 秒，彻底吸干上清，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。

B 提取纯化噬菌体 DNA

5. 加入 400 μ l 裂解缓冲液，吹打重悬噬菌体，加入 50 μ l SDS 溶液，立即颠倒混匀 4-6 次；
 6. 加入 10 μ l 蛋白酶 k，56°C 温育 60 分钟，期间颠倒混匀 2-3 次；
 7. 加入 500 μ l 缓冲液 B，立即涡旋振荡 5 秒；
- 注：有白色沉淀物为正常现象。**
8. 加入 500 μ l 无水乙醇，立即涡旋振荡 10 秒，如果有比较多的沉淀可以 12000rpm 离心 3min；

9. 仔细将上清加入到一个基因组吸附柱 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 800 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 9。

10. 加入 700 μ l 漂洗液 W2（请先检查是否已加入无水乙醇！），12,000rpm 离心 30 秒，弃废液。
 11. 重复步骤 10 一遍。
 12. 将吸附柱 AC 放回空收集管中，12,000rpm 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。
 13. 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 TE（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。**
14. DNA 可以存放在 2-8°C，如果要长时间存放，可以放置在 -20°C。

注意：洗脱缓冲液 TE (5mM Tris-HCl, pH8.0) 中不含有 EDTA，如果需要快速样品，或长期 -20°C 保存样品；并且 EDTA 不影响下游实验；建议加入终浓度 1mM 的 EDTA。