



λ 噬菌体基因组 DNA 提取试剂盒

(离心柱型)

适用范围：适用于快速提取λ噬菌体基因组DNA

Cat. #: AB1141(50preps)
AB1142(100preps)
AB1143(200preps)



λ噬菌体基因组 DNA 提取试剂盒（离心柱型）

❖ 适用范围：

适用于快速提取λ噬菌体DNA，提取纯度高，浓度高，适合低滴度噬菌体！

❖ 试剂盒组成、储存、稳定性：

| 试剂盒组成 | 保存 | 50 次 | 100 次 | 200 次 |
|------------|------|-----------------------------|-----------|---------|
| RNase A | -20℃ | 20 mg | 20 mg×2 | 20mg×4 |
| DNase I | -20℃ | 50mg | 50 mg ×2 | 50mg×4 |
| 噬菌体沉淀液 | 室温 | 100 ml | 100 ml ×2 | 100ml×4 |
| 裂解缓冲液 | 室温 | 30 ml | 60 ml | 120ml |
| 杂质沉淀液 | 室温 | 5 ml | 10 ml | 20ml |
| 结合液 LB | 室温 | 20 ml | 40 ml | 80ml |
| 漂洗液 WB | 室温 | 20ml | 20 ml×2 | 20ml×3 |
| | | <i>第一次使用前按说明加指定量乙醇（4 倍）</i> | | |
| 洗脱缓冲液 EB | 室温 | 10 ml | 20 ml | 40ml |
| 吸附柱 AC | 室温 | 50 个 | 100 个 | 200 个 |
| 收集管（2ml） | 室温 | 50 个 | 100 个 | 200 个 |
| 新配 20% SDS | 室温 | 12ml | 20ml | 40ml |

本试剂盒在室温储存 12 个月不影响使用效果。

储存事项:

1. 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。
2. 结合液 LB 低温时可能出现析出和沉淀, 可以在 37℃ 水浴几分钟帮助重新溶解, 恢复澄清透明后冷却到室温即可使用。
3. 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盖子。

❖ 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-20 μg 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。
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漂洗液 WB 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！
 - ⇒ 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℃ 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 20μl RNase A 和 20μl DNase I 充分混匀 37℃ 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℃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 500μl 裂解缓冲液，吹打重悬噬菌体，加入 100μl 20%SDS，立即轻柔颠倒混匀 4-6 次后，70℃温育 10 分钟，然后置冰上冷却。
6. 加入 100μl 杂质沉淀液，立即轻柔颠倒混匀 4-6 次，最高速 12,000g 4℃离心 10 分钟。
7. 仔细将上清（大约 350μl）转入新的离心管，加入 350μl 结合液 LB，轻柔涡旋混匀。（一定要混匀，以免影响产量，加入结合液的时候要缓慢吸取）
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 60 秒，倒掉收集管中的废液。
吸附柱一次最多只可以容纳大约700μl混合物，如果离心不下去，可弃废液，再离心1min，重复步骤 8。
9. 加入 700μl 漂洗液 WB（请先检查是否已加入无水乙醇!），12,000rpm 离心 60 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，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。

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 50-100 μ l 洗脱缓冲液 EB（洗脱缓冲液事先在 50 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ C，如果要长时间存放，可以放置在 -20 $^{\circ}$ C。

❖ 问题与解决方法:

| 问题 | 评论与建议 |
|--------------------|---|
| 低核酸产量 或者纯度不高 | <ul style="list-style-type: none">* 试剂盒储存在非最佳条件-建议: 收到试剂盒后总是存放在室温 (15°C-20°C)。* 缓冲液或者试剂暴露于减少它们有效性的条件下-建议: 储存在室温 (15°C-20°C), 每次用完后立刻盖紧盖子, 以免溶液蒸发, pH 改变和污染。* 漂洗液 WB 中忘记加无水乙醇-建议: 第一次实验时, 在漂洗液 WB 中加入指定量无水乙醇。* 试剂和样品没有充分混匀-建议: 加入每个试剂后都要充分混匀。* 噬菌体上清滴度太低-建议: 1.确认λ噬菌体已经完全裂解了宿主菌 (加入 0.5%的氯仿可以帮助完全裂解); 2.离心去除宿主菌碎片残渣时间不能超过 10 分钟, 转速不超过 10,000g, 否则否则噬菌体也可能和碎片一起沉淀丢失; 3.重新培养一次噬菌体感染细菌。* DNase I/RNaseA 消化不足或者过头-建议: 消化过头, 可能减少产量并导致最后污染宿主菌 DNA; 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, 因此可以适当调节用量。 |
| 宿主菌基因组 DNA 残留过高 | <ul style="list-style-type: none">* DNase I/RNaseA 失活或者反应条件不佳-建议: DNase I/RNaseA 必须溶解在裂解缓冲液中, 必须分装冻存。λ噬菌体必须用 LM(含镁离子)培养, 在其它培养肉汤中, DNase I 消化活性可能受到影响。 |

加入噬菌体
沉淀剂后未见到
 λ 噬菌体沉淀

- * 不适合的离心温度和离心力。-**建议**：10,000g（12,000rpm）4℃离心 10 分钟。
 - * 上清中含 λ 噬菌体太少-**建议**：离心前，样品置冰上冷却。参见前面滴度太低解决办法
-