



北京艾德莱生物科技有限公司

Aidlab Biotechnologies Co., Ltd

- ◆ **λ噬菌体基因组DNA快速提取试剂盒**
 - ◆ 目录号 **DN22**
 - ◆ 使用手册
 - ◆ 实验室使用，仅用于体外
-

λ噬菌体基因组 DNA 快速提取试剂盒

目录号：DN22

| 目录编号 | 包装单位 |
|---------------|-------------|
| DN2201 | 50次 |
| DN2202 | 100次 |

❖ **适用范围：**

适用于快速λ噬菌体DNA

❖ 试剂盒组成、储存、稳定性:

| 试剂盒组成 | 保存 | 50 次 | 100 次 |
|-----------------|-------------|-----------------|------------------|
| RNase A | -20℃ | 20 mg | 20 mg X 2 |
| DNase I | -20℃ | 50 mg | 50 mg X 2 |
| 噬菌体沉淀液 | 室温 | 100 ml | 100ml X 2 |
| 裂解缓冲液 | 室温 | 30 ml | 60 ml |
| 杂质沉淀液 | 室温 | 5 ml | 10 ml |
| 结合液 LB | 室温 | 20 ml | 40 ml |
| 漂洗液 WB | 室温 | 15 ml | 25 ml |
| | | 第一次使用前按说明加指定量乙醇 | |
| 洗脱缓冲液 EB | 室温 | 10 ml | 15 ml |
| 吸附柱 AC | 室温 | 50 个 | 100 个 |
| 收集管 (2ml) | 室温 | 50 个 | 100 个 |

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 在高离序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 10 μ g 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 20 μ l RNase 和 20 μ l DNase 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 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℃ 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℃ 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 $^{\circ}$ 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/RNase 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/RNase 失活或者反应条件不佳-建议: DNase I/RNase 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 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 | <ul style="list-style-type: none">* 不适合的离心温度和离心力。-建议: 10,000g (12,000rpm) 4°C 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 |





| 问题 | 评论与建议 |
|------------------------|---|
| DNA 下游酶切不能切开或者酶切不完全 | <p>*忘记做步骤 11，乙醇抑制了酶切反应-建议：做步骤 10，然后在空气中晾几分钟，让残留乙醇挥发。</p> <p>*一些硅基质膜成分一起洗脱下来，抑制了酶切反应-建议：将洗脱的基因组 DNA 溶液 13,000rpm 再离心一分钟，小心取上清使用。</p> <p>*使用了错误的培养基培养λ噬菌体-建议：λ噬菌体必须用 LM(含镁离子)培养，在其它培养肉汤中，DNA 酶切活性可能受到影响。培养板培养必须用琼脂糖 Agarose 板，如果用琼脂 Agar 板，可能抑制酶切。</p> |
| 纯化的 DNA 产物 D260 数值异常偏高 | <p>*一些硅基质膜成分一起洗脱下来，干扰了分光光度计读数-建议：将洗脱的回收 DNA 溶液 13,000rpm 再离心一分钟，小心取上清使用。</p> |

