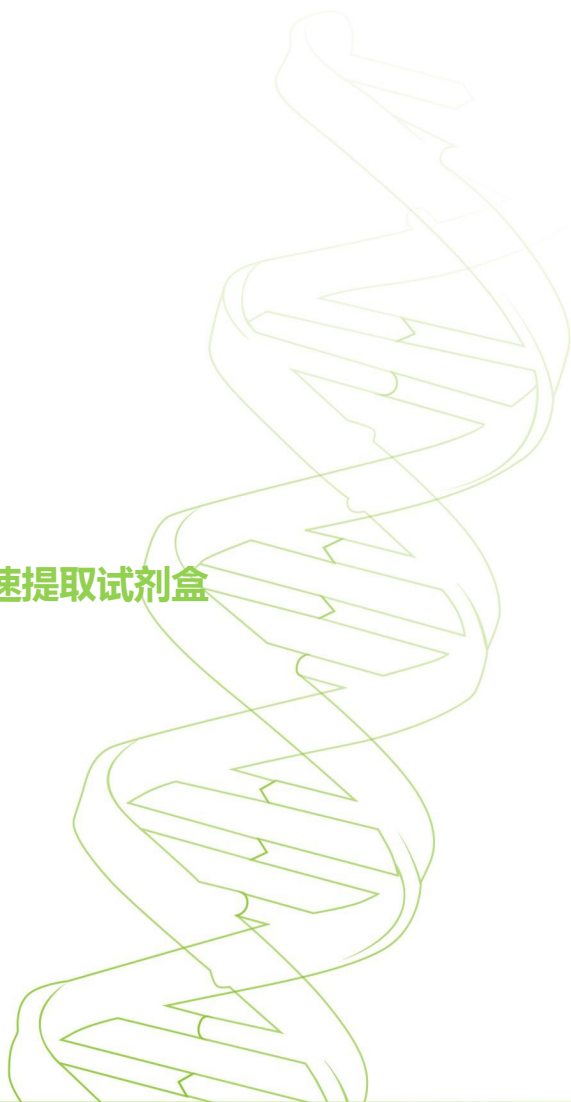


Imagene®

λ Phage DNA Kit λ噬菌体基因组 DNA 快速提取试剂盒



CODONX
RESEARCH & ANSWER MORE

FOR RESEARCH USE ONLY
NOT INTENDED FOR DIAGNOSTIC PURPOSES

λ噬菌体基因组 DNA 快速提取试剂盒

目录号 DE126

使用说明书

网站: www.codonx.com
咨询电话: 010-56315162
技术支持 QQ: 3090544158

- 1/适用范围
- 2/试剂盒组成、储存、稳定性
- 3/储存事项
- 4/产品介绍
- 5/产品特点
- 6/注意事项
- 7/操作步骤
- 8/问题与解决方法

1/适用范围:

适用于快速λ噬菌体DNA。

2/试剂盒组成、储存、稳定性:

| 试剂盒组成 | 保存 | 50 次 (DE126-01) | 100 次 (DE126-02) |
|--------------|------|--------------------|---------------------------------|
| RNase A | -20℃ | 20 mg | 20 mg X 2 |
| DNase I | -20℃ | 50 mg | 50 mg X 2 |
| 噬菌体沉淀液 PB | 室温 | 100 ml | 100ml X 2 |
| 裂解缓冲液 LS | 室温 | 30 ml | 60 ml |
| 杂质沉淀液 IP | 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 <i>第一次使用前按说明加指定量乙醇</i> |
| 洗脱缓冲液 EB | 室温 | 10 ml | 15 ml |
| 吸附柱 DA | 室温 | 50 个 | 100 个 |
| 收集管 CT (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。

3/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 LS 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。

4/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。

5/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。

6/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, 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。**

7/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 PB 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 PB，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 LS，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 IP，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 DA 中，（吸附柱放入收集管 CT 中）12,000rpm 离心 30 秒，倒掉收集管 CT 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移到吸附柱内，重复步骤 8。
9. 加入 600 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 DA 放回空收集管 CT 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 DA，放入一个干净的离心管中，**在吸附膜的中间部位**加 100μl 洗脱缓冲液 EB（洗脱缓冲液事先在 50℃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40μl，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℃，如果要长时间存放，可以放置在-20℃。

8/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℃-20℃）。 * 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℃-20℃），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 LS 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

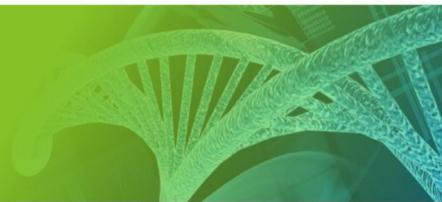
- * 不适合的离心温度和离心力。**-建议:** 10,000g (12,000rpm) 4℃离心 10 分钟。
- * 上清中含λ噬菌体太少**-建议:** 离心前, 样品置冰上冷却。参见前面滴度太低解决办法

DNA 下游酶切不
能切开或者酶切
不完全

- * 忘记做步骤 11, 乙醇抑制了酶切反应**-建议:** 做步骤 10, 然后空气中晾几分钟, 让残留乙醇挥发。
- * 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。
- * 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。

纯化的 DNA
产物 D260
数值异常偏高

- * 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。



CodonX(China) Biotechnology Co., Ltd

Yizhuang Biomedical Park
Building 6, No.88 6th Kechuang St.Economic-Technological Development Area,Beijing,China
Tel: 010-56315162 www.codonx.com