

λ噬菌体基因组 DNA 提取试剂盒

Lambda phage Genomic DNA Kit

(离心柱型)

目录号: SD12

产品内容

试剂盒组成	保存	SD12-1 10 次	SD12-2 50 次	SD12-3 100 次
Buffer A (沉淀液)	室温	20 ml	100 ml	200 ml
Buffer B (裂解液)	室温	6 ml	30 ml	60ml
Buffer C (杂质去除液)	室温	1 ml	5 ml	10 ml
Buffer D (结合液)	室温	4 ml	20 ml	40 ml
Buffer WB	室温	5 ml	25 ml	25 ml
第一次使用前请加入 4 倍体积的无水乙醇				
Buffer TE	室温	2 ml	10 ml	20 ml
DNA Columns & Collection Tubes	室温	10T	50T	50T×2
新配 20%SDS	室温			
RNA 酶 (终浓度 20 mg/ml)	-20℃	4 mg	20 mg	2×20 mg
DNA 酶 (终浓度 50 mg/ml)	-20℃	10 mg	50 mg	2×50 mg

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

储存条件

该试剂盒置于室温 (15-25 °C) 干燥条件下可保存 12 个月; 更长时间的保存可置于 2-8 °C。在 2-8 °C 保存条件下, 若产生沉淀, 使用前应先将试剂盒内的溶液在室温中放置一段时间, 必要时可在 37 °C 水浴中预热 10 min, 以溶解沉淀。避免试剂长时间暴露于空气中发生挥发、氧化、pH 值变化, 各溶液使用后应及时盖紧盖子。

产品简介

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. 不需使用有毒的苯酚，无需乙醇沉淀
2. 操作便捷，纯度高
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-20 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（请在使用本试剂盒前务必仔细阅读此项）

1. 自备试剂：氯仿
2. 开始实验前将需要的水浴先预热到 37 °C 备用
3. 洗脱液 EB 不含有螯合剂 EDTA，不影响下游酶切、连接等反应。也可以使用水洗脱，但应该确保 pH 大于 7.5，pH 过低影响洗脱效率。

操作步骤

使用前请先在 Buffer WB 中加入指定量无水乙醇，充分混匀并做上标记；
请将 BufferA（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 10,000 \times g（约 12,000 rpm）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 10 ml 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 Buffer A，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. 10,000 \times g（12,000 rpm）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 μl BufferB, 吹打重悬噬菌体, 加入 100 μl 20%SDS, 立即轻柔颠倒混匀 4-6 次后, 70 $^{\circ}\text{C}$ 温育 10 分钟, 然后置冰上冷却。
 6. 加入 100 μl Buffer C, 立即轻柔颠倒混匀 4-6 次, 最高速 12,000 $\times g$ 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 10 分钟。
 7. 仔细将上清 (大约 350 μl) 转入新的离心管, 加入 350 μl Buffer D, 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中 (吸附柱放入收集管中), 12,000 rpm 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700 μl 混合物, 如果离心不下去, 可弃废液, 再离心1 min, 重复步骤8。
 9. 加入 700 μl Buffer WB (请先检查是否已加入无水乙醇!), 12,000 rpm 离心 60 秒, 弃废液。
 10. 可选步骤: 重复步骤 9 一遍。
 11. 将吸附柱放回空收集管中, 12,000 rpm 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, 放入一个干净的离心管中, 在吸附膜的中间部位加 100 μl Buffer TE (洗脱缓冲液事先在 50 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中预热), 室温放置 1 分钟, 12,000 rpm 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, 12,000 rpm 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 μl , 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 $^{\circ}\text{C}$, 如果要长时间存放, 可以放置在 -20 $^{\circ}\text{C}$ 。

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。* Buffer WB 中忘记加无水乙醇-建议：第一次实验时，在 Buffer 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 10,000×g，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：10,000×g（12,000 rpm）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