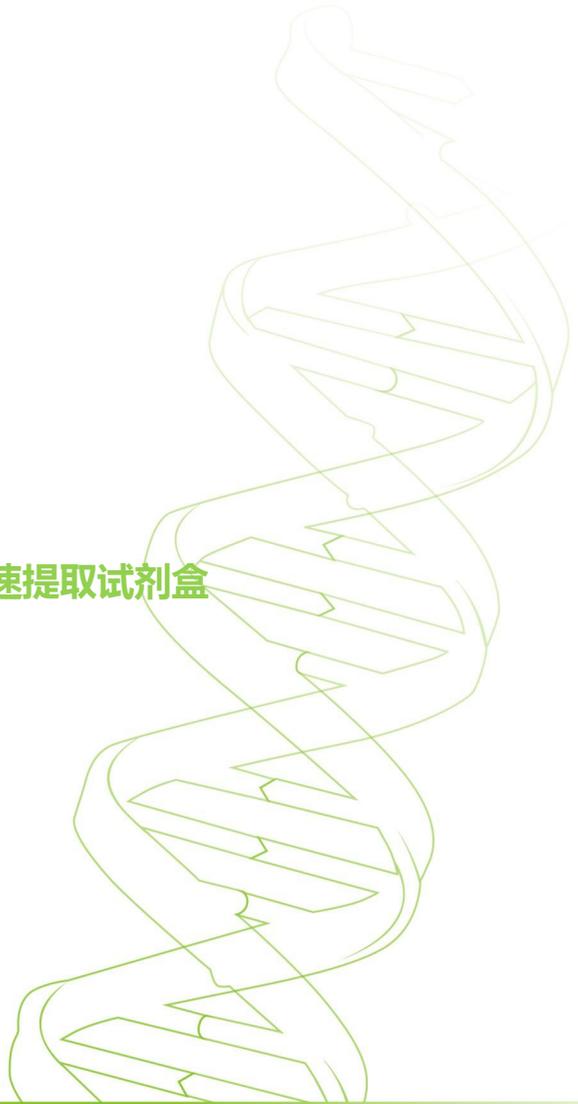


# Imagene®

## λ Phage DNA Kit λ噬菌体基因组 DNA 快速提取试剂盒



**CODONNX**  
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](http://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 $\lambda$ 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:

$\lambda$ 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 $\lambda$

噬菌体 DNA 来开展测序等后续工作。 $\lambda$ 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 $\lambda$ 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 $\lambda$ 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  $\lambda$ 噬菌体裂解培养物上清可以提取约 10 $\mu$ g  $\lambda$ 噬菌体 DNA。
4. 多次柱漂洗确保高纯度, OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 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 $\lambda$ 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 $\mu$ l RNase 和 20 $\mu$ 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 $\mu$ l 裂解缓冲液 LS，吹打重悬噬菌体，加入 100 $\mu$ 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 $\mu$ 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 $\mu$ 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 $\mu$ 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 $\mu$ 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"> <li>* 试剂盒储存在非最佳条件-<b>建议</b>: 收到试剂盒后总是存放在室温 (15℃-20℃)。</li> <li>* 缓冲液或者试剂暴露于减少它们有效性的条件下-<b>建议</b>: 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。</li> <li>* 漂洗液 WB 中忘记加无水乙醇-<b>建议</b>: <b>第一次实验时，在漂洗液 WB 中加入指定量无水乙醇。</b></li> <li>* 试剂和样品没有充分混匀-<b>建议</b>: <b>加入每个试剂后都要充分混匀。</b></li> <li>* 噬菌体上清滴度太低-<b>建议</b>: 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。</li> <li>* DNase I/RNase 消化不足或者过头-<b>建议</b>: 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。</li> </ul>
宿主菌基因组 DNA 残留过高	<ul style="list-style-type: none"> <li>* DNase I/RNase 失活或者反应条件不佳-<b>建议</b>: 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。</li> </ul>

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](http://www.codonx.com)