

Version: AA 3.2 (2021.04.01修订)

SPARKeasy λ Phage DNA Kit
 λ 噬菌体基因组DNA快速提取试剂盒
(离心柱型)
目录号: AA1802

01/产品组分

序号	组分	50 次 AA1802-A	100 次 AA1802-B
1	RNase A	20 mg	20 mg×2
2	DNase I	50 mg	50 mg×2
3	噬菌体沉淀液	100 mL	100 mL×2
4	裂解缓冲液	30 mL	60 mL
5	杂质沉淀液	5 mL	10 mL
6	结合液 LB	20 mL	40 mL
7	漂洗液 WB	15 mL 第一次使用前按说明加指定量无水乙醇	25 mL
8	洗脱缓冲液 EB	10 mL	15 mL
9	吸附柱 AC	50 个	100 个
10	收集管 (2 mL)	50 个	100 个

02/保存条件

RNase A、DNase I 于-20℃保存，其它组分室温（15-25℃）保存。

03/产品概述

本试剂盒适用于快速提取 λ 噬菌体 DNA，可在 2 h 内完成单个或多个样品的提取。 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，进一步将盐、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。典型产量：10 mL λ噬菌体裂解培养物上清可以提取约 10 μg λ噬菌体 DNA，OD260/OD280 典型比值达 1.7-1.9。可以直接用来酶切和测序。

04/自备材料

无水乙醇、0.5%氯仿、20% SDS

05/注意事项

请务必在使用本试剂盒之前阅读此注意事项

- ◇ 满足实验步骤要求的高速冷冻离心机。
- ◇ 开始实验前根据需要将水浴预热到 37℃ 备用。
- ◇ 在 RNase A 管和 DNase I 管分别加入 1 mL 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。
- ◇ 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。
- ◇ 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。
- ◇ 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瓶盖。
- ◇ 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。

06/使用方案（以10 mL噬菌体感染细菌培养上清提取举例：）

1. 将0.5%氯仿处理后的λ噬菌体感染的液体培养物12,000 rpm（13,400×g）4℃离心10 min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 μL RNase A和20 μL DNase I充分混匀37℃温育30 min。
▲ 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 A/DNase I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 min）。
4. 12,000 rpm（13,400×g）4℃离心10 min，弃上清，干燥1 min。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裂解缓冲液，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℃温育10 min，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4℃离心10 min。
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），12,000 rpm（13,400 $\times$ g）离心30 s，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。转子不同，离心机转速对应的离心力也不同。
9. 加入600 μ L漂洗液WB（请先检查是否已加入无水乙醇！），12,000 rpm（13,400 $\times$ g）离心30 s，弃废液，重复漂洗一遍。
10. 将吸附柱AC放回空收集管中，12,500 rpm（14,500 $\times$ g）离心2 min，尽量除去漂洗液，以免漂洗液中残留乙醇抑制下游反应。
11. 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（事先在50℃水浴中预热），室温放置1 min，12,000 rpm（13,400 $\times$ g）离心1 min。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（13,400 $\times$ g）离心1 min。
▲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。
12. DNA可以存放在2-8℃，如果要长时间存放，可以放置在-20℃。

07/相关产品

- AC1709 RNase Free and DNase Free纯水
- AJ0101 Spark 2000 DNA Marker
- AJ0102 Spark 5000 DNA Marker
- AJ0206 Spark 50 $\times$ TAE Buffer
- AJ0208 Spark GoldView

本产品仅用于科学研究！

Tel: 0531-82387577

Web: <http://www.sparkjade.com>

Support: support@sparkjade.com

