

M5 M13 噬菌体单链基因组 DNA 快速提取试剂盒使用说明书

产品名称	单位	货号
M5 M13 噬菌体单链基因组 DNA 快速提取试剂盒	50T	M665-01

【储存条件】

室温储存。

【产品简介】

M13 和其它的丝状噬菌体载体，在文库构建和为序列测序提供单链 DNA 和引人突变方面十分有用。将适量 M13 丝状噬菌体或者相关噬粒（M13 来源）感染的液体培养物离心，上清中的单链噬菌体 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纯净噬菌体单链 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，单个样品操作一般可在 10 分钟内完成。
3. 产量高，典型的产量 800 μ l M13 丝状噬菌体上清可以提取 3 μ g 噬菌体单链 DNA。
4. 多次柱漂洗确保高纯度，OD260/OD280 典型的比值达 1.7~1.9。可以直接用来测序，一般典型可辨认读长达 650bp。

【产品组份】

试剂盒组成	保存	50T
结合液 MB	室温	25 ml
漂洗液 WB	室温	15 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
吸附柱 AC	室温	50 个
收集管 (2ml)	室温	50 个

本试剂盒在室温储存 12 个月不影响使用效果。

1. 结合液 MB 低温时可能出现析出和沉淀，可以在 37°C 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。
2. 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。

【注意事项】

1. 所有的离心步骤均在室温完成，使用转速可以达到 13,000rpm 的传统台式离心机，如 Eppendorf 5415C 或者类似离心机。
2. 开始实验前将需要的水浴先预热到 50°C 备用。
3. 结合液 MB 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】

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！

以 800 μ l 噬菌体感染细菌培养上清提取举例：

1. 将 M13 丝状噬菌体或者相关噬粒（M13 来源）感染的液体培养物分装在 1.5 毫升离心管，12,000rpm 离心 5 分钟沉淀菌体。
2. 小心取 800 μ l 上清转入新的 1.5ml 离心管，加入 400 μ l 结合液 MB，充分混匀。

如果使用的上清大于或者小于 800 μ l，则结合液 MB 的用量需要按照比例增加或者减少。

3. 将上述混合物加入一个吸附柱 AC 中，（吸附柱放入收集管中）13,000rpm 离心 15 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加到吸附柱内，重复步骤 3。

4. 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。
5. 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。
6. 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 60 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，10,000rpm 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，体积小降低 DNA 洗脱效率，减少 DNA 产量。

7. 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。

附录（M13 噬菌体感染细菌培养上清准备过程）：

下面举例说明 M13 噬菌体感染细菌培养上清准备过程，详细的 M13 噬菌体（或 M13 来源噬粒）培养和上清准备过程请参见『分子克隆』第二版。

1. 37 $^{\circ}$ C 振摇过夜培养合适的噬菌体宿主菌（如 JM109）。
2. 使用 6% 的过夜培养菌接种新鲜的 LB 培养液，37 $^{\circ}$ C 振摇培养一个小时。
3. 根据 M13 噬菌体的储存液的浓度（滴度）按照 0.5-1.5%(V/V) 的比例加入噬菌体来感染宿主菌。37 $^{\circ}$ C 振摇培养 5-6 个小时。
4. 将上面 M13 丝状噬菌体或者相关噬粒（M13 来源）感染的液体培养物分装在 1.5 毫升离心管，12,000rpm 离心 5 分钟沉淀菌体。
5. **可选步骤：**小心取 1 毫升上清转入新的 1.5ml 离心管，重复步骤 4 离心 5 分钟。

这步有助于去除上清中残留的微量宿主菌 RNA 或者 DNA。

6. 小心取 800 μ l 上清转入新的 1.5ml 离心管。
7. 现在可以按照操作步骤提取噬菌体单链 DNA 了。

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	<p>*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)</p> <p>*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。</p> <p>*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。</p> <p>*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</p> <p>*噬菌体上清滴度太低-建议: 离心取噬菌体感染细菌培养物上清时离心最好不要超过 5 分钟, 转速不要超过 12,000rpm, 否则噬菌体上清也可能离心下来。重新培养一次噬菌体感染细菌</p> <p>*洗脱效率不高-建议: 确保做了步骤 5, 否则残留乙醇会影响洗脱效率, 仔细阅读步骤 6 和只使用洗脱缓冲液 EB 洗脱</p>
DNA 下游酶切 不能切开或者 酶切不完全	<p>*忘记做步骤 5, 乙醇抑制了酶切反应-建议: 做步骤 5, 然后空气中晾几分钟, 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>
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>

【备注】

本产品仅供科研使用。在确认产品质量出现问题时, 本公司承诺为客户免费更换等量的质量合格产品。