

**AipBest M13 噬菌体单链基因组 DNA 快速提取试剂盒(离心柱型)**  
AipBest M13 Phage Genomic DNA Rapid Extraction Kit(Centrifugal Column)

**使用说明书**

◆目录号：OD201

目录编号	包装单位
OD201-01	50次
OD201-02	100次
OD201-03	200次

◆试剂盒组成、储存、稳定性：

试剂盒组成	保存	50 次 (OD201-01)	100 次 (OD201-01)	200 次 (OD201-01)
结合液 MB	室温	25mL	50mL	100mL
漂洗液 WB	室温	13mL 第一次使用前按说明加指定量乙醇	25mL	50mL
洗脱缓冲液 EB	室温	10mL	20mL	40mL
吸附柱 AC 和收集管(2mL)	室温	50 套	100 套	200 套

◆适用范围：适用于快速提取 M13 噬粒单链 DNA。

◆产品储存：本试剂盒在室温储存 12 个月不影响使用效果。

◆储存事项：

- 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。
- 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。

◆产品介绍：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 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 一 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. 操作安全, 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, 快速简捷, 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 $\mu$ L M13 丝状噬菌体上清可以提取 3 $\mu$ g 噬菌体单链 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。可以直接用来测序, 一般典型可辨认读长达 650bp。

◆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(实验前请先阅读注意事项):

以 800 $\mu$ L 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, 加入后请及时在方框打钩标记已加入乙醇, 以免多次加入!

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 1.5mL 离心管, 12,000rpm 离心 5 分钟沉淀菌体。
2. 小心取 800 $\mu$ L 上清转入新的 1.5mL 离心管, 加入 400 $\mu$ L 结合液 MB, 充分混匀。  
**注:** 如果使用的上清大于或者小于 800 $\mu$ 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。  
**注** 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加到吸附柱内, 重复步骤 3。
4. 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。
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 $\mu$ L 洗脱缓冲液 EB(洗脱缓冲液事先在 50°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。

**注：**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 40uL，体积过小降低 DNA 洗脱效率，减少 DNA 产量。

7. DNA 可以存放在 2-8°C，如果要长时间存放，可以放置在一 20°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。

- 37°C 振摇过夜培养合适的噬菌体宿主菌(如 JM109)。
- 使用 6% 的过夜培养菌接种新鲜的 LB 培养液，37°C 振摇培养一个小时。
- 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°C 振摇培养 5-6 个小时。
- 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 1.5mL 离心管，12,000rpm 离心 5 分钟沉淀菌体。
- 可选步骤：**小心取 1mL 上清转入新的 1.5mL 离心管，重复步骤 4 离心 5 分钟。

**注：**这步有助于去除上清中残留的微量宿主菌 RNA 或者 DNA。

- 小心取 800uL 上清转入新的 1.5mL 离心管。
- 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	*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°C-20°C)。
	*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°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。
	*漂洗液 WB 中忘记加无水乙醇- <b>建议:</b> 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- <b>建议:</b> 加入每个试剂后都要充分混匀。
	*噬菌体上清滴度太低- <b>建议:</b> 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。
	*洗脱效率不高- <b>建议:</b> 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。

---

DNA 下游酶不能  
切开或者酶切  
不完全

\*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。  
\*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。

---

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。

---

