

目 录

简 介 ----- 2

原 理 ----- 2

组 成 ----- 3

保 质 期 ----- 4

准 备 工 作 ----- 5

方 案 1: HiPure Lambda Mini Kit 离心方案 ----- 6

方 案 2: HiPure Lambda Midi Kit 离心方案 ----- 8

方 案 3: HiPure Lambda Maxi Kit 离心方案 ----- 10

常 见 问 题 回 答 ----- 1 2

版本: 2024-01

简介

HiPure Lambda Kits 为 Lambda 噬菌体 DNA 制备提供了一种简单且经济的方法。试剂盒采用硅胶柱纯化技术，整个操作过程不需接触酚氯仿等有机物抽提，也不需用到耗时的醇类沉淀。纯化的 DNA 可直接用于自动测序，酶切，PCR，标记等。

	Mini Kit	Midi Kit	Maxi Kit
产品编号	P1161	P1162	P1163
培养液用量	5ml	30ml	100ml
柱子结合能力	30µg	150µg	500µg
使用的离心机	小型离心机	中型离心机	桶状离心机
柱子类型	1.5ml 柱子	15ml 柱	50ml 柱子
产量	2-30µg	10-150µg	200-500µg
洗脱体积	30-100µl	300-500µl	0.5-1ml

原理

HiPure 硅胶柱是采用高结合力的玻璃纤维滤膜为基质。滤膜在高浓度离子化剂(如盐酸胍或异硫氰酸胍)条件下，可通过氢键和静电等物理作用吸附核酸，而蛋白质或其它杂质不被吸附而去除。吸附了核酸的滤膜经洗涤去除蛋白质和盐，最后可以用低盐缓冲液(如 Elution Buffer)或水，洗脱出滤膜上吸附的核酸。得到的核酸纯度高，可直接用于各种下游实验。

HiPure Lambda DNA Kits 采用硅胶柱纯化方式。Lambda 噬菌体感染液核酸酶消化去除宿主细胞的核酸，加入 Buffer MP1 沉淀收集噬菌体颗粒；加入 Buffer ATL、蛋白酶 K 和 Buffer DL 裂解噬菌体；加入乙醇结合，把混合液转移至柱子中吸附 Lambda DNA，而蛋白质则不被吸附而去除；滤膜经洗涤液去除杂质后，最后 DNA 被低盐缓冲液(10Mm Tris, pH8.5)洗脱。纯化的 DNA 可直接用于自动测序，酶切，PCR，标记等。

组 成

HiPure Lambda Mini Kit

Cat.No.	P1161-01	P1161-02	P1161-03
Package	10 次	50 次	250 次
Buffer MP1	60 ml	270 ml	3 x 500 ml
Buffer ATL	5 ml	30 ml	100 ml
Buffer DL	5 ml	30 ml	100 ml
DNase I	120 µl	600 µl	5 x 600 µl
Proteinase K	6 mg	12 mg	60 mg
Protease Dissolve Buffer	1.8 ml	1.8 ml	5 ml
Buffer PV2*	6 ml	20 ml	100 ml
Elution Buffer	5 ml	20 ml	100 ml
HiPure DNA Mini Column II	10	50	250
2 ml Collection Tube	10	50	250

HiPure Lambda Midi Kit

Cat.No.	P1162-01	P1162-02	P1162-03
Package	2 次	10 次	50 次
Buffer MP1	80 ml	400 ml	3 x 550 ml
Buffer ATL	5 ml	20 ml	90 ml
Buffer DL	5 ml	20 ml	90 ml
DNase I	120 µl	600 µl	5 x 600 µl
Proteinase K	6 mg	12 mg	60 mg
Protease Dissolve Buffer	1.8 ml	1.8 ml	5 ml
Buffer PV2*	6 ml	20 ml	3 x 20 ml
Elution Buffer	5 ml	20 ml	60 ml
HiPure DNA Midi Column II	2	10	50
1.5 ml Collection Tube	2	10	50

组 成

HiPure Lambda Maxi Kit

Cat.No.	P1163-01	P1163-02	P1163-03
Package	2 次	6 次	20 次
Buffer MP1	220 ml	700 ml	4 x 550 ml
Buffer ATL	15 ml	40 ml	150 ml
Buffer DL	15 ml	40 ml	150 ml
DNase I	120 µl	600 µl	5 x 600 µl
Proteinase K	6 mg	12 mg	60 mg
Protease Dissolve Buffer	1.8 ml	1.8 ml	5 ml
Buffer PW2*	6 ml	50 ml	3 x 50 ml
Elution Buffer	5 ml	20 ml	60 ml
HiPure DNA Maxi Column C	2	6	20
50 ml Collection Tube C	4	12	40

保 质 期

HiPure Lambda Kits 提取试剂盒除 DNase I 外，其它组分可在室温下（15-25℃）干燥保存 18 个月。DNase I 必须保存于-20℃。

准备工作

- 无水乙醇
- 小型离心机(~12,000 × g)
- 1.5ml 灭菌离心管和灭菌枪头
- 溶解 Proteinase K (20mg/ml): 加入适量的 Protease Dissolve Buffer 溶解 Proteinase K 至终浓度为 20mg/ml, 轻轻颠倒让蛋白酶 K 充分溶解。Proteinase K 干粉可在室温下保存一年, 但溶解的 Proteinase K 须保存于-20~8℃。
- 用无水乙醇稀释 Buffer PW2

P1163-01	加入 24ml 无水乙醇
P1163-02	加入 200ml 无水乙醇
P1163-03	每瓶加入 200ml 无水乙醇

1. HiPure Lambda Mini Kit 离心方案(P1161)

该方案采用离心方法，适合于从 5 ml Lambda 噬菌体培养液中提取 3-30 μ g 高纯度的 Lambda DNA。以下离心条件都必须在室温下进行操作。

1. 按分子克隆指南（第 1, 2 或 3 册），培养 Lambda 噬菌体/细菌培养液。
2. **加入 0.02 倍体积的氯仿至培养液中**，37°C 再温浴 15 分钟提高细菌裂解效果。
3. 13,000 $\times$ g 离心 10 分钟去除细菌的残片。
4. 转移 5ml 上清液至新的离心管中。加入 10 μ l DNase I 至上清液中，颠倒混匀，37°C 水浴 30 分钟，其间偶尔颠倒混匀。（这一步可消化去除细菌的 DNA 和 RNA。）
5. **加入 5ml Buffer MP1 至样品中，颠倒 15-20 次混匀**。冰上放置 30~60 分钟。
6. 13,000 $\times$ g 离心 10 分钟收集噬菌体颗粒，小心倒弃上清液。
7. **加入 0.4ml Buffer ATL 和 10 μ l Proteinase K**，涡旋重悬沉淀，55°C 水浴 30 分钟裂解噬菌体颗粒。
8. **加入 0.4ml Buffer DL 和 0.4ml 无水乙醇，颠倒 15-20 次混匀**。
9. 将 HiPure DNA Mini Column II 柱子套在 2ml 收集管中。**转移一半混合液至柱子中**。8,000 $\times$ g 离心 30 秒。
10. 倒弃滤液把柱子套在收集管。**转移剩余混合液至柱子中**。8,000 $\times$ g 离心 30 秒。
11. 倒弃滤液把柱子套在收集管。**加入 0.6ml Buffer PW2 (已用无水乙醇稀释)至柱子中**。8,000 $\times$ g 离心 30 秒。
注：使用前 Buffer PW2 必须用无水乙醇稀释。稀释条件请按瓶子上的标签指示。若低温保存，请恢复至室温后使用。
12. 倒弃滤液把柱子套在收集管。**加入 0.6ml Buffer PW2 (已用无水乙醇稀释)至柱子中**。8,000 $\times$ g 离心 30 秒。
13. 倒弃滤液把柱子套在收集管。10,000 $\times$ g 离心 2 分钟。
注：不要忽略此步。这一步可去除残留在柱子的乙醇。残留的乙醇会影响下游的实验。
14. 把柱子套回新的 1.5ml 离心管。**加入 30-50 μ l 预热至 65°C Elution Buffer 至膜中央**。

静置 3 分钟， $10,000 \times g$ 离心 1 分钟以洗脱 DNA。

15. 弃去柱子。把 DNA 保存于 -20°C 。

2. HiPure Lambda Midi Kit 离心方案(P1162)

该方案采用离心方法，适合于从 50 ml Lambda 噬菌体培养液中提取 10-150 µg 高纯度的 Lambda DNA。以下离心条件都必须在室温下进行操作。

1. 按分子克隆指南（第 1, 2 或 3 册），培养 Lambda 噬菌体/细菌培养液；
2. 加入 0.02 倍体积的氯仿至 Lambda 培养液中。37°C 继续培养 15 分钟以提高细菌裂解效果。
3. 13,000 × g 离心 10 分钟去除细菌的残片。转移 30ml 上清液至新的离心管中。
4. 加入 50µl DNase I 至上清液中，颠倒混匀。37°C 水浴 30~60 分钟，其间偶尔颠倒混匀。
5. 加入 30ml Buffer MP1 至样品中，颠倒 15-20 次混匀。冰上放置 60 分钟。
6. 13,000 × g 离心 10 分钟收集噬菌体颗粒。小心倒弃上清液并把离心管反扣于吸水纸上 1 分钟去除残液。
7. 加入 1.5ml Buffer ATL 和 50µl Proteinase K，涡旋充分重悬噬菌体颗粒。55°C 水浴 60 分钟裂解噬菌体颗粒。
8. 加入 1.5ml Buffer DL 和 1.5ml 无水乙醇，颠倒 15-20 次混匀。
9. 将 Lambda Midi 柱子套在 15ml 收集管中。转移一半混合液至柱子中。4,000 × g 离心 3 分钟。
10. 倒弃滤液把柱子套在收集管。转移剩余混合液至柱子中。4,000 × g 离心 3 分钟。
11. 倒弃滤液把柱子套在收集管。加入 2ml Buffer PW2 (已用无水乙醇稀释)至柱子中。4,000 × g 离心 3 分钟。
注：使用前 Buffer PW2 必须用无水乙醇稀释。稀释条件请按瓶子上的标签指示。若低温保存，请恢复至室温后使用。
12. 倒弃滤液把柱子套在收集管。加入 2ml Buffer PW2 (已用无水乙醇稀释)至柱子中。4,000 × g 离心 3 分钟。
13. 倒弃滤液把柱子套在收集管。4,000 × g 离心 15 分钟。
注：不要忽略此步。这一步可去除残留在柱子的乙醇。残留的乙醇会影响下游的

实验。

14. 把柱套回新的 15ml 离心管。加入 400 μ l 预热至 65°C Elution Buffer 至膜中央。静置 3 分钟，4,000 $\times$ g 离心 3 分钟以洗脱 DNA。
15. 再加入 400 μ l 预热至 65°C Elution Buffer 至膜中央。静置 3 分钟，4,000 $\times$ g 离心 3 分钟以洗脱 DNA。
16. 弃去柱子。把 DNA 保存于-20°C。

3. HiPure Lambda Maxi Kit 离心方案(P1163)

该方案采用离心方法，适合于从 300 ml Lambda 噬菌体培养液中提取 200-400 µg 高纯度的 Lambda DNA。以下离心条件都必须在室温下进行操作。

1. 按分子克隆指南（第 1, 2 或 3 册），培养 Lambda 噬菌体/细菌培养液；
2. 加入 0.02 倍体积的氯仿至 Lambda 培养液中。37°C 继续培养 15 分钟以提高细菌裂解效果。
3. 13,000 × g 离心 10 分钟去除细菌的残片。转移 100ml 上清液至新的离心管中。
4. 加入 100µl DNase I 至上清液中，颠倒混匀。37°C 水浴 30 分钟，其间偶尔颠倒混匀。
5. 加入 100ml Buffer MP1 至样品中，颠倒 15-20 次混匀。冰上放置 60 分钟。
6. 13,000 × g 离心 10 分钟收集噬菌体颗粒。小心倒弃上清液并把离心管反扣于吸水纸上 1 分钟去除残液。
7. 加入 6ml Buffer ATL 和 100µl Proteinase K，涡旋充分重悬噬菌体颗粒。55°C 水浴 60 分钟裂解噬菌体颗粒。
8. 加入 6ml Buffer DL 和 6ml 无水乙醇至上清液中，颠倒 15-20 次混匀。室温静置 2 分钟。
9. 将 Lambda Maxi 柱子套在 50ml 收集管中。转移混合液至柱子中。4,000 × g 离心 3 分钟。
10. 倒弃滤液把柱子套在收集管。加入 10ml Buffer PW2 (已用无水乙醇稀释)至柱子中。4,000 × g 离心 3 分钟。
注：使用前 Buffer PW2 必须用无水乙醇稀释。稀释条件请按瓶子上的标签指示或说明书第 9 页。若低温保存，请恢复至室温后使用。
11. 倒弃滤液把柱子套在收集管。加入 10ml Buffer PW2 (已用无水乙醇稀释)至柱子中。4,000 × g 离心 3 分钟。
12. 倒弃滤液把柱子套在收集管。4,000 × g 离心 15 分钟。
注：不要忽略此步。这一步可去除残留在柱子的乙醇。残留的乙醇会影响下游的实验。

13. 把柱套回新的 15ml 离心管。加入 800 μ l 预热至 65°C Elution Buffer 至膜中央。静置 10 分钟，4,000 $\times$ g 离心 3 分钟以洗脱 DNA。
14. 再加入 800 μ l 预热至 65°C Elution Buffer 至膜中央。静置 10 分钟，4,000 $\times$ g 离心 3 分钟以洗脱 DNA。
15. 弃去柱子。把 DNA 保存于-20°C。

常见问题回答

该列表可能有利于解决提取过程所碰到的问题。此外，Magen 的技术人员也可以随时为您提供服务，若您对试剂盒存在问题或建议，或您在分子生物学碰到问题，都请您联系我们。我们将竭尽能力为您排忧解难。

现 象	原因及解决方法
产量低或无产量	
DNA 溶解不充分	增加洗脱液体积或增加洗脱次数。
Lambda 噬菌体起始滴度太低	重新培养细菌。
培养条件有问题	检查培养条件，抗生素用量等。
Buffer ATL 有沉淀或失效	因 Buffer ATL 含有 SDS，在低温时可能会有沉淀析出，使用前需水浴使用溶解。
细菌没有彻底重悬	细菌沉淀团必须在 Buffer MPX1 中充分重悬，成团的细菌因无法裂解会降低产量。
Buffer PW2 没有用乙醇稀释	Buffer PW2 在使用前须用无水乙醇进行稀释。收到试剂盒后，应尽快把乙醇加到 Buffer PW2 中，以防止微生物的污染。
洗脱时有问题	洗脱核酸最好使用 Elution Buffer (10mM Tris, pH8.5)，灭菌水因 pH 较低，呈酸性，而导致洗脱效率下降。洗脱液必须加到柱子的膜的中央。
下游实验结果不理想	
盐分污染	加入 Buffer PW2 后，静置 5 分钟后，再离心。
乙醇污染	确保空柱离心速度高于或等于 12,000xg，离心时间为 2 分钟。
膜材料脱落	硅胶膜在离心过程中可能会发生脱落。脱落到质粒中的硅胶膜是不溶解的，可以通过 12,000xg 离心 2 分钟去除。