

## 七、疑难解答 (Trouble shooting)

出现的问题	可能的原因	建议解决方法
低核酸产量或者纯度不高	试剂盒储存在非最佳条件下	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	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>第一次实验时, 在漂洗液 WB 中加入指定量无水乙醇。</b>
	试剂和样品没有充分混匀	<b>加入每个试剂后都要充分混匀。</b>
	噬菌体上清滴度太低	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	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 下游酶切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	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	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 D <sub>260</sub> 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	将洗脱的回收 DNA 溶液 13, 000rpm 再离心一分钟, 小心取上清使用,

## 二、原理简介

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 和引入突变方面十分有用。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, 得到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。

## 三、试剂盒特点

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 800μl M13 丝状噬菌体上清可以提取 3μg 噬菌=
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。

## 四、注意事项 (实验前必须首先阅读这部分!)

1. 所有的离心步骤均在室温完成, 使用转速可以达到 13, 000 rpm 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。

## 五、操作步骤 (以 800μl 噬菌体感染细菌培养上清提取举例)

\* 第一次使用前请先在 25ml 漂洗液 WB 中加入 100ml 无水乙醇!

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 $\mu$ 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。  
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) 10,000 rpm 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 $\mu$ l 混合物, 因此需要分次把混合物上到吸附柱内, 重复步骤 3。
4. 加入 700 $\mu$ l 漂洗液 WB (请先检查是否已加入无水乙醇!), 12,000 rpm 离心 30 秒, 弃废液。
5. 将吸附柱 AC 放回空收集管中, 12,000 rpm 离心 1 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 $^{\circ}$ C 水浴中预热), 室温放置 1 分钟, 10,000 rpm 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, 10,000 rpm 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 $\mu$ l, 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 $^{\circ}$ C, 如果要长时间存放, 可以放置在 -20 $^{\circ}$ C。

## 六、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的 RNA 或者 DNA。
6. 小心取 800 $\mu$ 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。