

CHEF Genomic DNA Plug Kits 簡易中文操作手冊

一、器材與藥品配製：

1. 微量吸管
2. 水浴槽
3. 分光光度計
4. 1.5 ml 和 50 ml 離心管
5. 離心機
6. **Lysozyme Solution** (for 1 ml plug solution) :
100 μ l Lysozyme Stock + 2.5 ml Lysozyme Buffer (新鮮配製)
7. **Proteinase K Solution** (for 1 ml plug solution) :
100 μ l Proteinase K Stock + 2.5 ml Proteinase K Reaction Buffer (新鮮配製)
8. **1X Wash Buffer** :
以 2d H₂O 10 倍稀釋 10X Wash Buffer
9. **0.1X Wash Buffer** :
以 2d H₂O 100 倍稀釋 10X Wash Buffer

二、Plug 製作流程：

1. 隔夜培養 3 ml 菌液。
2. 以分光光度計測量菌液濃度，**OD₆₀₀ 吸光值 0.8~1.0 為佳。**
3. 將 2% CleanCut Agarose Solution 和 Cell Suspension Buffer 置於 50°C 水浴槽中預熱。
4. 將 3 ml 菌液以 1000 xg，4 °C 離心 5 min，吸除上清液。
5. 以 500 μ l Cell Suspension Buffer 懸浮細菌沉澱 **(即每 plug 總 OD 為 0.3)。**
6. 加入 500 μ l 2% CleanCut Agarose Solution 至細菌懸浮液中 (總體積 1 ml)，混合均勻。 **(mammalian : 5x10⁷/ml, bacteria : 5x10⁸/ml, yeast : 6x10⁸/ml)**
7. 將混合好的膠體細菌溶液注入 plug mode (100 μ l/well)，可置於 4 °C 10~15 min 加速膠體凝固。

8. 將 plug 置於適量 Lysozyme Solution 中 (260 µl/plug), 37 °C反應 2 小時。

(若為革蘭氏陽性菌可於 Lysozyme Solution 中加入 lysostaphin (5mg/ml))

9. 去除 Lysozyme Solution, 過 2d H₂O 清洗 plug。

10. 將 plug 置於適量 Proteinase K Solution 中 (260 µl/plug), 50 °C反應隔夜。

11. 去除 Proteinase K Solution。

12. 以二次水清洗 plug, 震盪清洗 10 min, 2 次

13. 以 1X Wash Buffer **(或 TE buffer) 清洗 plug, 於室溫搖晃 30 min, 3 次。**

14. 將清洗完成的 plug 浸泡於 1X Wash Buffer, 可於 4 °C環境下可保存 3 個月。

三、限制酵素作用

1. 去除 1X Wash Buffer, 以 0.1X Wash Buffer 清洗 plug (1 ml/plug), 於室溫搖晃 1 hr, 並重複 2 次。

2. 去除 0.1X Wash Buffer, 將 plug 移至 1.5 ml 離心管。

3. 以 1 ml 1X Restriction Enzyme Reaction Buffer 浸泡 plug, 於室溫靜置 1 小時

4. 去除 1X Restriction Enzyme Reaction Buffer, 加入新的 1X Restriction Enzyme Reaction Buffer, 蓋過 plug 即可。

5. 加入限制酵素 (30~50 U/plug), 於酵素作用溫度下反應隔夜。

6. 去除 Enzyme Reaction Buffer, 加入 1 ml 1X Wash Buffer 於室溫下搖晃 1 hr。

※ 酵素作用後的 DNA 不耐長期保存, 須儘快使用。

四、進行脈衝式電泳

1. 上機前, 將 plug 浸泡於電泳 running buffer (如 0.5X TBE 或 1X TAE)。

2. 裁切適當大小 plug, 塞入樣品槽中。

有任何疑問與意見, 歡迎隨時來電詢問

正茂生物科技有限公司 免費諮詢專線: 0800-213-029