

Purification of λ -DNA from liquid cultures

- add 1 ml chloroform (CHCl_3) to 200 ml O/N lysed phage liquid culture
- 10 min, 37 °C, vigorously shaking
- cool to RT and add DNase and RNase to final conc. 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$
- incubate for 30 min at RT
- add NaCl to a final conc. of 1M (5,8 g/100 ml) and dissolve well
- incubate for 1 h on ice
- 10 min, 10 000 g, 4 °C
- transfer SN to fresh tube and add 10g PEG 8000/100 ml
- dissolve well by slow stirring (Rührfisch) at RT
- cool in ice water and let stand for at least 1 h on ice (may also stand O/N)
- 10 000 g, 10 min, 4 °C
- remove SN carefully
- resuspend pellet very smoothly in 1,6 ml SM buffer/100 ml original phage-culture (especially smear along tube wall!)
- for further concentration: add $\frac{1}{4}$ Vol of a solution containing 20% PEG 8000 and 2,5M NaCl
- spin as above (you can also leave the solution O/N)
- dissolve the pellet in 1 ml SM buffer
- add SDS to a final conc. of 0,2 % and EDTA to a final conc. of 20 mM, mix by inverting!
- heat for 10 min at 70 °C
- extract 2x with 1 Vol phenol (equilib. with 50 mM Tris, pH 8,0) /chloroform (1:1)
- extract 1x with 1 Vol chloroform
- add 1/10 (or (1/20) 3M NaAc
- add 2 Vol EtOH (or 0,7 Vol Isopropanol)
- $\frac{1}{2}$ h, RT (may be omitted)
- 12 000 g, 2 min, 4 °C
- wash pellet 2x with 70% EtOH
- wash pellet 1x with abs. EtOH
- dry pellet at RT
- add 100 –200 μl TE (pH 7,6) and let stand for $\frac{1}{2}$ h at RT, then redissolve pellet smoothly, store DNA at 4 °C.

Alternative procedure with detergent CTAB

Phagen 4-5 h aufwachsen. Zu 5 ml Kultur etwa 0.1 ml Chloroform zugeben. 5 min weiterschütteln.

Zelltrümmer 10 min bei 5 000 rpm (4°C) abzentrifugieren.

3,6 ml des Überstandes in neues Röhrchen überführen (Pipette) und 0.9 ml 20 % PEG 6000/2.5 M NaCl zugeben. Mischen und 10 min auf Eis inkubieren.

5 min bei 12 000 rpm (4°C) abzentrifugieren. Überstand verwerfen.

Noch einmal kurz zentrifugieren. PEG/NaCl vollständig entfernen.

Phagensediment in 450 ul TE aufnehmen (Pipette/Vortex) und in 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführen.

25 ul 5% CTAB zugeben, mischen und 5 min bei 65°C erhitzen.

5 min bei 14 000 rpm (RT) zentrifugieren, Überstand verwerfen.

Sediment in 400 ul 1.2 M NaCl/TE lösen (Pipette).

5 min bei RT inkubieren, dann 1 ml Ethanol zugeben und mischen.

10 min bei 14 000 rpm (RT) zentrifugieren, Überstand sorgfältig abnehmen und verwerfen.

Sediment mit 500 ul 70 % Ethanol versetzen, 1 min wie zuvor zentrifugieren und Überstand vollständig entfernen.

DNA trocknen und in 50 ul TE aufnehmen. 5- 10 ul für Restriktion einsetzen.

Puffer:

CTAB: Hexadecyl-trimethyl-ammoniumbromid, 5 % in Wasser.

TE: 10 mM Tris-HCl pH 8, 0.1 mM EDTA.