

环境水体样本 DNA 小量提取试剂

(离心柱法)

产品简介

本试剂盒是为水体中环境微生物 DNA 提取而设计的。试剂盒采用经典离心柱纯化技术，并结合独创的腐殖酸吸附剂技术，广泛的从各种环境水体中提取高纯度 DNA；腐殖酸吸附剂可高效地吸附土壤样品中的腐殖酸和其他抑制因子；确保纯化的 DNA 可直接用于 PCR、酶切，Southern 杂交等实验。

产品编号	提取次数
111604-50	50
111604-100	100

原理

磁珠法是采用高结合力的玻璃纤维膜为基质。玻璃纤维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因素吸附核酸而形成磁珠核酸复合物，而蛋白质或其它杂质不被吸附而去除。吸附了核酸的磁珠经洗涤去除蛋白质和盐，最后可以用低盐缓冲液（如 Buffer TE）或水，洗脱出纳米磁珠上吸附的核酸。得到的核酸纯度高，可直接用于各种下游实验。此外，S3-Cleanup Buffer 溶液是我们独创的腐殖酸吸附剂，该吸附剂可选择性吸附 DNA 样品中的腐殖酸等抑制因子，提高 DNA 纯度。

一、 试剂盒组成， 储存条件

试剂盒组成	111604-50	111604-100	储存条件
纯化次数	50 次	100 次	
S1-Lysis Buffer	50 ml	110 ml	
S2-Lysis Enhancer *	10 ml	10 ml	
S3-Cleanup Buffer	25 ml	45 ml	
S4-Binding Buffer	60 ml	125 ml	常温储存
S5-Wash Buffer 1	36 ml	72 ml	
S6-Wash Buffer 2	12 ml	24 ml	
S7-Elution Buffer	5 ml	10 ml	
Dry Bead Tubes	50 个	100 个	
吸附柱 A1	50 个	100 个	
说明书	1 份	1 份	

▲ 实验前请先逐一检查试剂!

本试剂盒在常温下干燥保存 12 个月不影响使用效果。长期保存时需放置 2-8℃。低温时，* S2-lysis Enhancer 溶液可能会有白色沉淀形成，70℃水浴让沉淀完全溶解后混匀使用。

二、 实验前准备

实验前请准备好水浴锅或金属浴、涡旋振荡、器掌心离心机、涡旋仪 (Qiagen Cat.NO.13000-V1-24)或珠磨仪、1.5ml、2ml 离心管等试剂盒内没有提供的设备和耗材。

按标签所示，向 S5、66 瓶内加入相对应量的无水乙醇，混匀后备用。

	K3125-S	K3125-L
S5-Wash Buffer 1	36 ml	72 ml
无水乙醇	24 ml	48 ml

	K3125-S	K3125-L
S6-Wash Buffer 2	12 ml	24ml
无水乙醇	48 ml	96 ml

三、 操作步骤

- 1、使用合适体积的离心管 10000 rpm 离心 10min 收集微生物。
(若样品体积大于 5ml, 适当延长离心时间, 确保收集到菌体, 根据实验水体的情况, 适当增大使用样品的量, 可以从 1ml 到 500ml; 不同样品, 体积不同, 不同型号离心机根据实际情况调整离心时间。)
- 2、小心吸弃上清, 避免因吸取上清时, 吸取到微生物而使得率降低; 加入 800 μ l S1-Lysis Buffer, 使用移液器反复抽打沉淀, 转移全部的液体到 Dry Bead Tube 中。
- 3、加入 100 μ l S2-Lysis Enhancer , 涡旋振荡器开到最高频率, 剧烈涡旋震荡 1 min。
- 4、65 $^{\circ}$ C 孵育 10 min。
(如果得率过低, 可选 95 $^{\circ}$ C 孵育 5 min~10 min)
- 5、剧烈涡旋震荡 10min。
(此步骤可选用研磨仪, 频率: **70HZ** , 处理时间: **30S**, **3** 个循环)
- 6、12000 rpm 离心 2 min, 转移全部上清液 (约 800 μ l) 到新的 2 ml 的离心管中。
- 7、加入 1200 μ l S4-Binding Buffer, 涡旋混匀后, 转移 700 μ l 到离心柱中, 14000 rpm 离心 1 min, 弃滤液。
- 8、转移剩下的全部混合液体至离心柱中, 12000 rpm 离心 1 min, 弃滤液。
- 9、吸取 600 μ l S5-Wash Buffer 1 (已确保加入无水乙醇稀释)到离心柱上, 12000 rpm 离心 1 min, 弃滤液。
- 10、重复一次步骤 9。
- 11、吸取 600 μ l S6-Wash Buffer 2 (已确保加入无水乙醇稀释)到离心柱上, 12000 rpm 离心 1 min, 弃滤液。
- 12、重复一次步骤 11。
- 13、将离心柱装回收集管中, 12000 rpm 离心 1 min, 弃收集管。
(此步骤, 是除去漂洗液中多余的乙醇)
- 14、将离心柱转移到干净的 1.5 ml 离心管中, 加入 100 μ l Elution Buffer, 放置 1min 后, 12000 rpm 离心 1 min, 弃离心柱, 将收集的 DNA 存放-20 $^{\circ}$ C 或立即使用。
(**Elution Buffer** 可以事先 **70 $^{\circ}$ C** 预热, 提高洗脱效率。)

常见问题解答

该列表可能有利于解决提取过程中所碰到的问题。我们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。我们将竭尽所能为您排忧解难，24 小时热线：18926136067

现象	原因及解决方法
DNA 有颜色	
样品用量太多	森林土壤或草地土壤富含腐殖酸，土壤用量减少一半。
加入 S2 溶液后没有充分混匀	加入 S2 溶液后要充分涡旋混匀，以充分去除杂质
DNA 降解严重	
土壤样品富含核酸酶或二价金属离子	省略 70°C 或 90°C 水浴加热的步骤。底泥或富含水份的土壤尽量去除后再进行操作。
用珠磨仪代替手工涡旋	手工涡旋时间长，会造成 DNA 的断裂
样品用量太多	森林土壤和草地土壤富含腐殖酸，土壤用量减少一半
DNA 产量低	
土壤 DNA 含量低	土壤样品核酸含量低，采用难提取方案进行抽提
裂解不充分	用珠磨仪来代替手工涡旋。或手工涡旋时把涡旋仪速度调到最高，不间断充分涡旋 5-10min。
洗脱效率不够	增加洗脱体积和洗脱次数。由于基因组 DNA 片段大，水溶性较差。建议进行第三次洗脱以提高产量或提高洗脱液的体积。
S5\S6 溶液中乙醇没有加入或加入量不够	按照说明书或者瓶子标签所示，加入适量的无水乙醇至 S5\S6 溶液中。
S4 溶液加入体积不准	得到上清后，加入 1200ul 的 S4 溶液。
RNA 污染	
延长 RNase 消化时间	加入 RNase A 至裂解液中消化去除 RNA 污染
OD260/280 或 OD260/230 比值不正常	
RNA 污染	加入 RNase A 至裂解液中消化去除 RNA 污染
核酸浓度太低	核酸浓度很低时，OD 比值偏差较大
OD _{260/230} <0 或 OD _{260/230} >3	在漂洗步骤中，请自行配制 70% 的无水乙醇，使用 70% 的无水乙醇漂洗，代替试剂盒内 S6-Wash Buffer2，根据结果，可适当增加漂洗次数 1-2 次。