

HiPure Water DNA Kit

水体 DNA 小提试剂盒

产品简介

HiPure Water DNA Kit 是专门为水体 DNA 提取而设计的。试剂盒适合于从各种水体样品，如自来水，河水，养殖池塘水，污水等样品中提取高纯度的基因组 DNA，此外试剂盒也适应于固体含量多的液体样品如各种培养液，发酵液，沼气发酵液等。试剂盒采用硅胶柱纯化技术和高效的腐殖酸吸附剂。整个过程无需酚氯仿抽提。纯化的 DNA 可直接用于 PCR、Southern 杂交、酶切等实验。

产品组份

产品编号	D3145-01	D3145-02	D3145-03
纯化次数	10 次	50 次	250 次
HiPure DNA Mini Columns II	10	50	250
2ml Collection Tubes	10	50	250
Buffer SOL	15 ml	60 ml	250 ml
Buffer SDS	1.0 ml	5 ml	15 ml
Reagent DX	1.0 ml	1.0 ml	1.5 ml
Buffer PS	5 ml	20 ml	80 ml
Buffer GDP	15 ml	100 ml	2 × 200 ml
Buffer DW1	6 ml	30 ml	150 ml
Buffer GW2*	6 ml	20 ml	50 ml
Buffer AE	5 ml	15 ml	60 ml
Glass Beads (0.1~0.6mm)	6 g	30 g	140 g
塑料小勺子	2 个	4 个	10 个
说明书	1	1	1

保存条件

HiPure Water DNA Kit 组份可在室温下(15-25°C)干燥保存 18 个月。

准备事项

- 无水乙醇(96-100%)
- 70°C 水浴锅或振荡金属浴
- Buffer GW1 使用前，须按瓶子标签所示，加入无水乙醇进行稀释。
- Buffer GW2 使用前，须按瓶子标签所示，加入无水乙醇进行稀释。

实验步骤

- **配制 Buffer SOL Plus:** 按 1ml Buffer SOL 加入 50 μ l Buffer SDS 和 5 μ l Reagent DX 的比例进行预先混匀，使用前颠倒混匀后使用。低温下 Buffer SOL Plus 会有沉淀析出，55 度温育使之溶解。由于 Reagent DX 不溶解水，放置过程中会浮在表面，SOL Plus 使用前要颠倒充分。
1. **水体微生物的收集:** 用 0.45 μ m 滤膜或 0.22 μ m 滤膜过滤收集水体微生物。样品的体积取决于水体中颗粒含量和滤膜的孔径。采用 0.45 μ m，直径为 9cm 时，一次可处理 5-10L 的自来水。

可处理水样最大体积取决于样品（如来源和质量）和过滤膜（如类型、直径和孔径）。由于水样的浊度可以从清澈到高度浑浊不等。一般来说，可以处理大量的透明饮用水或饮用水，因为过滤器堵塞的可能性较低，可以处理 100 mL 到几升的体积。含有沉积物或悬浮颗粒的浊水样，如粘土、淤泥或其他无机或有机物，可能导致过滤器堵塞，对于这些样本类型，建议使用 0.45 μ m 的过滤器。使用合适的过滤器，用直径为 25 mm 的过滤膜(0.2 μ m 或 0.45 μ m)过滤富集水体中微生物。使用无菌镊子从过滤装置取下过滤装置滤膜，将滤膜卷入圆柱体（含菌的一面朝内）并插入 15ml 匀浆管，按步骤 2 进行操作。
 2. **用灭菌镊子取下滤膜，卷成圆柱状（含菌的一面朝内）或剪成碎片装在 2ml 离心管或螺口离心管中。**

若滤膜面积比较大，可以把滤膜转移至 15ml 离心管中。
 3. **加入一勺 0.5g 玻璃珠(0.1-0.6mm)至 2.0ml 离心管中，然后再加入 0.6ml Buffer SOL Plus。**

若滤膜转移至 15ml 离心管中，加入 2 勺玻璃珠和 1.2ml Buffer SOL Plus。

4. 根据实验室条件，选择涡旋仪或珠磨仪进行珠磨裂解。

- 涡旋仪：推荐使用美基涡旋仪 MagMix A，这台涡旋仪带 2ml 或 15ml 离心管的夹具，可一次高效处理 10~20 个样品。根据样品的不同，使用涡旋仪时，珠磨裂解时间增加到 15~30 min 可能是有利的，可以根据目标菌群特性和下游应用来调整。
- Powerlyzer 珠磨仪：建议 2000rpm 珠磨 30 秒，暂停 30 秒，再 2000rpm 珠磨 30 秒。
- FasiPrep24 珠磨仪：建议 5m/s，珠磨 30 秒，暂停 30 秒，再 5m/s 珠磨 30 秒。
- Tissue Lysis II 珠磨仪：建议 25Hz 珠磨 5 分钟，重新调整位置后再 25Hz 珠磨 5 分钟。

5. (可选) 70°C 水浴 10 分钟进一步裂解。

处理某些样品时(如富含有机质的底泥)，70°C 加热也可能会引起 DNA 的片段化，此时可省略这一步，DNA 的片段化不会影响常规的 PCR 运用。

6. 加入 0.2ml Buffer PS 至样品中。涡旋混匀 10 秒。4,000~5,000 × g 离心 10 分钟。

若滤膜转移至 15ml 离心管中，加入 0.4ml Buffer SOL Plus。

7. 转移上清液至新的离心管中，加入等倍体积 Buffer GDP，颠倒混匀 6-8 次。

8. 把 HiPure DNA Mini Column II 装在 2ml 收集管中。转移一半体积的混合液至柱子中。12,000 × g 离心 30~60 秒。

9. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中，转移余下混合液至柱子。12,000 × g 离心 1 分钟。

10. 倒弃滤液把柱子装回收集管中。加入 500µl Buffer DW1 至柱子。12,000 × g 离心 1 分钟。

11. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。加入 600µl Buffer GW2 至柱子中。12,000 × g 离心 1 分钟。

Buffer GW2 须用无水乙醇稀释。按瓶子标签或说明书指示进行稀释。

12. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。加入 600µl Buffer GW2 至柱子中。12,000 × g 离心 1 分钟。

13. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。12,000 × g 离心 2 分钟甩干柱子。

14. 将柱子装在 1.5ml 离心管中。加入 30-50µl 预热至 70°C Buffer AE 至柱子的膜中央。放置 3 分钟。12,000 × g 离心 1 分钟。

15. 再加入 30~50µl 预热至 70°C 的 Buffer AE 至柱子的膜中央。放置 3 分钟。12,000 × g 离心 1 分钟。丢弃 DNA 结合柱，把 DNA 保存 2-8°C，长期保存需保存于-20°C。

常见问题

1. DNA 有颜色

- **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。
- 加入 Buffer PS 和 Absorber Solution 后没有充分混匀。
- **Absorber Solution 没有充分摇匀**：使用 Absorber Solution 时，要充分摇匀。剪去移液枪枪头的头部的一部分，防止堵塞枪头。
- **样品用量太多**：减少样品量，处理复杂粪便样品，样品量控制在 50mg。
- **进一步纯化**：取纯化的 DNA，按第 5 步进行第二次纯化。

2. DNA 降解严重

- **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，富含水份的底泥富含有机质，处理这些样品时，土壤用量减半操作。

3. DNA 产量低

- **土壤 DNA 含量低**：提高样品用量，可准备多个
- **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 5-10 分钟。
- **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。建议进行第二次洗脱以提高产量或提高洗脱液的体积。
- **Buffer GDP 加入的体积不准**：得到的上清后，Buffer GDP 的体积与上清体积相同。