

环境微生物（广谱型）DNA 小量提取试剂

（离心柱型）

产品简介

本试剂盒是为环境微生物 DNA 提取而设计的。试剂盒采用硅胶柱纯化技术，并结合独创的腐殖酸吸附剂技术，适合于从各种环境拭子、土壤、粪便、尿液、唾液以及运送培养基中微生物，目前广泛应用的例子：如森林土壤，草地土壤，矿区土壤，底泥以及各种粪便，如小鼠粪便、人粪便、狗、猫等粪便；从此类样品中提取高产量高纯度的总 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，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
111603-50	50
111603-100	100

原理

硅胶柱是采用高结合力的玻璃纤维滤膜为基质。滤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，而蛋白质或其它杂质不被吸附而去除。吸附了核酸的滤膜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，洗脱出滤膜上吸附的核酸。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	111603-50	111603-100	储存条件
纯化次数	50 次	100 次	
S1-Lysis Buffer	50 ml	110 ml	
S2-Lysis Enhancer	5 ml	10 ml	
S3-Cleanup Buffer	25 ml	45 ml	
S4-Binding Buffer	60 ml	125 ml	
S5-Wash Buffer 1	36 ml	72 ml	常温储存
S6-Wash Buffer 2	12 ml	24 ml	
S7-Elution Buffer	5 ml	10 ml	
Dry Bead Tubes	50 个	100 个	
离心柱	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。

	111603-50	111603-100
S5-Wash Buffer 1	36 ml	72 ml
无水乙醇	24 ml	48 ml

	111603-50	111603-100
S6-Wash Buffer 2	12 ml	24ml
无水乙醇	48 ml	96 ml

三、 操作步骤（离心法）

3.1 从粪便中提取宿主 DNA

本方案是通过优化实验步骤，达到从粪便中快速的提取回收宿主细胞 DNA。

1、按照下表，根据样本的量加入适量的 S1-Lysis Buffer 到 Dry Bead Tube 中，按照实验室的常规操作，将样本转移到 Dry Bead Tube 中，涡旋彻底、混匀。

样品类型	样本量	Volume
		S1-lysis Buffer
人及其他大型动物粪便	0.2g±0.05g	800 µl
老鼠及其他小型动物粪便	0.1g±0.05g	900 µl

2、加入 100 µl S2-Lysis Enhancer ， 涡旋振荡器开到最高频率，剧烈涡旋震荡 1 min。

3、14000 rpm 离心 5 min, 转移上清 600 µl 到新的 1.5 ml 的离心管中。

（注意：离心后上清表面可能出现一层杂质，避免吸取这些杂质，因为这些杂质会影响下游的扩增）

4、加入 400 µl S3-Cleanup Buffer，立即彻底混匀。

（加入 S3 后，根据实验的情况，可选择冰上孵育 10 min，可以最大限度的去除抑制剂）

5、14000 rpm 离心 2 min，转移全部上清液（约 800 µl）到新的 2 ml 的离心管中。

6、加入 1200 µl S4-Binding Buffer，涡旋混匀后，转移 700 µl 到离心柱中，14000 rpm 离心 1 min，弃滤液。

7、转移剩下的全部混合液体至离心柱中，14000 rpm 离心 1 min，弃滤液。

8、吸取 600 µl S5-Wash Buffer 1 （已确保加入无水乙醇稀释）到离心柱上，14000 rpm 离心 1 min，弃滤液。

9、重复一次步骤 8。

10、吸取 600 µl S6-Wash Buffer 2 （已确保加入无水乙醇稀释）到离心柱上，14000 rpm 离心 1 min，弃滤液。

11、重复一次步骤 10。

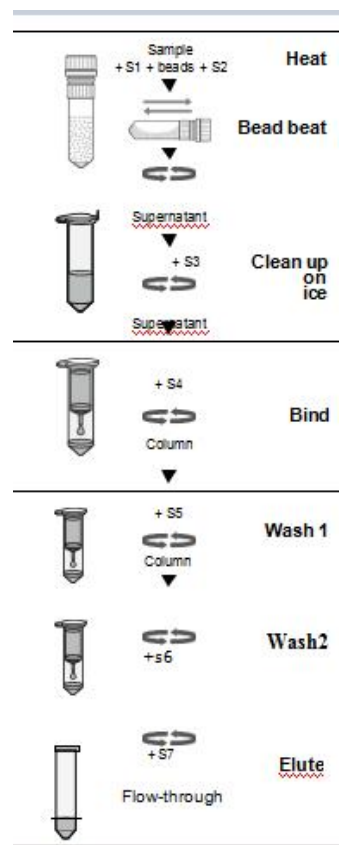
12、将离心柱装回收集管中，14000 rpm 离心 1 min，弃收集管。

（此步骤，是除去漂洗液中多余的乙醇）

13、将离心柱转移到干净的 1.5 ml 离心管中，加入 100 µl Elution Buffer，放置 1min 后，14000 rpm 离心 1 min，弃离心柱，将收集的 DNA 存放-20 °C 或立即使用。

（Elution Buffer 可以事先 70 °C 预热，提高洗脱效率。）

流程图



3.2 从粪便中提取微生物和宿主 DNA

本方案是通过优化实验步骤，达到从粪便中快速的提取回收粪便中微生物和宿主细胞 DNA。

1、按照下表，根据样本的量加入适量的 S1-Lysis Buffer 到 Dry Bead Tube 中，按照实验室的常规操作，将样本转移到 Dry Bead Tube 中，涡旋彻底、混匀。

样品类型	样本量	Volume
		S1-lysis Buffer
人及其他大型动物粪便	0.2g±0.05g	800 µl
老鼠及其他小型动物粪便	0.1g±0.05g	900 µl

2、加入 100 µl S2-Lysis Enhancer，涡旋振荡器开到最高频率，剧烈涡旋震荡 1 min。

3、65 °C 孵育 10 min。

4、剧烈涡旋震荡 10min。

（此步骤可选用研磨仪，频率：6.5 m/sec，处理时间：30S，10 个循环）

5、14000 rpm 离心 5 min，转移上清 600 µl 到新的 1.5 ml 的离心管中。

（注意：离心后上清表面可能出现一层杂质，避免吸取这些杂质，因为这些杂质会影响下游的扩增）

6、加入 400 µl S3-Cleanup Buffer，立即彻底混匀。

（加入 S3 后，根据实验的情况，可选择冰上孵育 10 min，可以最大限度的去除抑制剂）

7、14000 rpm 离心 2 min，转移全部上清液（约 800 µl）到新的 2 ml 的离心管中。

8、加入 1200 µl S4-Binding Buffer，涡旋混匀后，转移 700 µl 到离心柱中，14000 rpm 离心 1 min，弃滤液。

9、转移剩下的全部混合液体至离心柱中，14000 rpm 离心 1 min，弃滤液。

10、吸取 600 µl S5-Wash Buffer 1（已确保加入无水乙醇稀释）到离心柱上，14000 rpm 离心 1 min，弃滤液。

11、重复一次步骤 10。

12、吸取 600 µl S6-Wash Buffer 2（已确保加入无水乙醇稀释）到离心柱上，14000 rpm 离心 1 min，弃滤液。

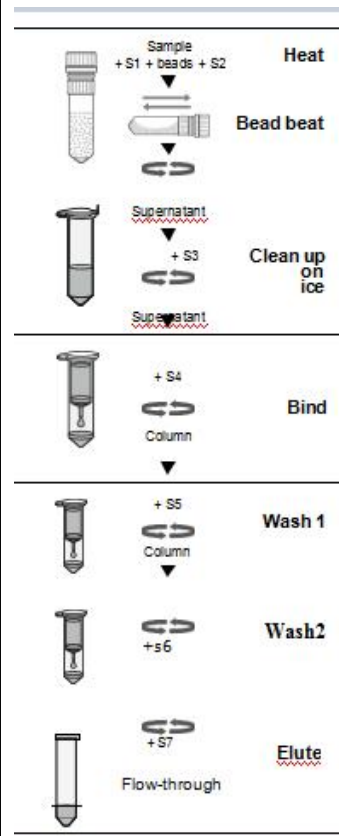
13、重复一次步骤 12。

14、将离心柱装回收集管中，14000 rpm 离心 1 min，弃收集管。（此步骤，是除去漂洗液中多余的乙醇）

15、将离心柱转移到干净的 1.5 ml 离心管中，加入 100 µl Elution Buffer，放置 1min 后，14000 rpm 离心 1 min，弃离心柱，将收集的 DNA 存放 -20 °C 或立即使用。

（Elution Buffer 可以事先 70 °C 预热，提高洗脱效率。）

流程图



3.3 从尿液、唾液中提取微生物和宿主 DNA

本方案是通过优化实验步骤，达到从尿液或唾液中快速的提取回收宿主细胞 DNA。

1、使用合适体积的离心管按照下表 14000 rpm 离心 10min 收集微生物及细胞。

(若样本体积大于 5 ml，可适当延长离心时间)

样品类型	样本量
唾液	1-2 ml
尿液	1-10 ml

2、小心吸弃上清，避免因吸取上清时，吸取到微生物或细胞而使得率降低；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：6.5 m/sec，处理时间：**30S**，**10** 个循环)

6、14000 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，14000 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，14000 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，14000 rpm 离心 1 min，弃滤液。

12、重复一次步骤 11。

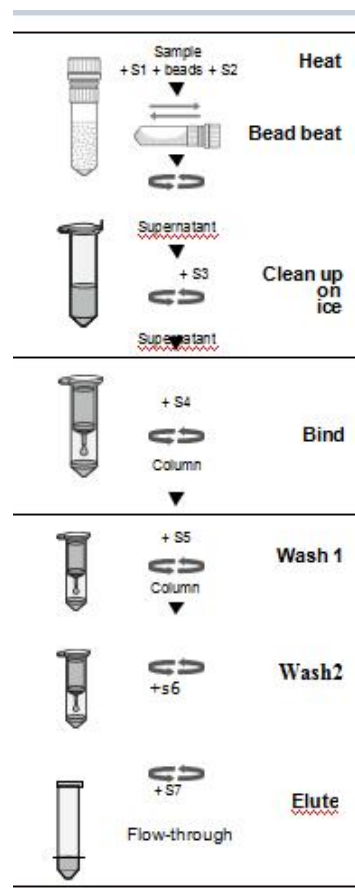
13、将离心柱装回收集管中，14000 rpm 离心 1 min，弃收集管。

(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，14000 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。)

流程图

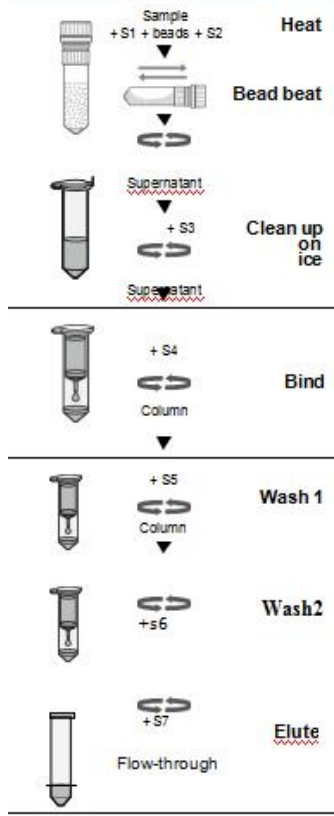


3.4 从土壤中提取微生物 DNA

本方案是通过优化实验步骤,达到从土壤中提取微生物总 DNA 的目的。

- 1、加入 800 μ l S1-Lysis Buffer 到 Dry Bead Tube 中,加入 0.2 \pm 0.05g 土壤样本,旋紧盖子,剧烈涡旋振荡。
- 2、加入 100 μ l S2-Lysis Enhancer,旋紧盖子,涡旋振荡器开到最高频率,剧烈涡旋震荡。
- 3、65 $^{\circ}$ C 孵育 10 min。
- 4、剧烈涡旋震荡 10min。
(此步骤可选用研磨仪,频率: 6.5 m/sec,处理时间: 30S, 10 个循环)
- 5、14000 rpm 离心 5 min,转移上清 600 μ l 到新的 1.5 ml 的离心管中。
(注意:离心后上清表面可能出现一层杂质,避免吸取这些杂质,因为这些杂质会影响下游的扩增)
- 6、加入 400 μ l S3-Cleanup Buffer,立即彻底混匀。
- 7、冰上孵育 10 min。
- 8、14000 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。
- 9、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。
- 10、转移剩下的全部混合液体至离心柱中,14000 rpm 离心 1 min,弃滤液。
- 11、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,14000 rpm 离心 1 min,弃滤液。
- 12、重复一次步骤 11。
- 13、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,14000 rpm 离心 1 min,弃滤液。
- 14、重复一次步骤 13。
- 15、将离心柱装回收集管中,14000 rpm 离心 1 min,弃收集管。
(此步骤,是除去漂洗液中多余的乙醇)
- 16、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,14000 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。)

流程图

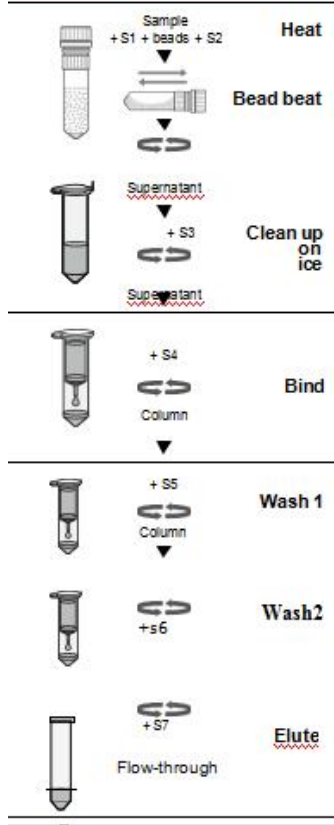


3.5 从直肠拭子或环境拭子中提取微生物 DNA

本方案是通过优化实验步骤，达到从直肠拭子或带有环境样品的拭子中快速的提取回收微生物 DNA。

- 1、加 900 μ l 的 S1-Lysis Buffer 到 Dry Bead Tube 中，将拭子头折断后转移 1 个到 Dry Bead Tube。
- 2、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。
- 3、65 $^{\circ}$ C 孵育 10 min。
- 4、剧烈涡旋震荡 10min。
(此步骤可选用研磨仪，频率：6.5 m/sec，处理时间：30S，10 个循环)
- 5、14000 rpm 离心 1 min，转移上清 600 μ l 到新的 1.5 ml 的离心管中。
(注意：离心后上清表面可能出现一层杂质，避免吸取这些杂质，因为这些杂质会影响下游的扩增)
- 6、加入 400 μ l S3-Cleanup Buffer，立即彻底混匀。
(加入 S3 后，根据实验的情况，可选择冰上孵育 10 min，可以最大限度的去除抑制剂)
- 7、14000 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。
- 8、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。
- 9、转移剩下的全部混合液体至离心柱中，14000 rpm 离心 1 min，弃滤液。
- 10、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，14000 rpm 离心 1 min，弃滤液。
- 11、重复一次步骤 10。
- 12、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，14000 rpm 离心 1 min，弃滤液。
- 13、重复一次步骤 12。
- 14、将离心柱装回收集管中，14000 rpm 离心 1 min，弃收集管。
(此步骤，是除去漂洗液中多余的乙醇)
- 15、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，14000 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。)

流程图

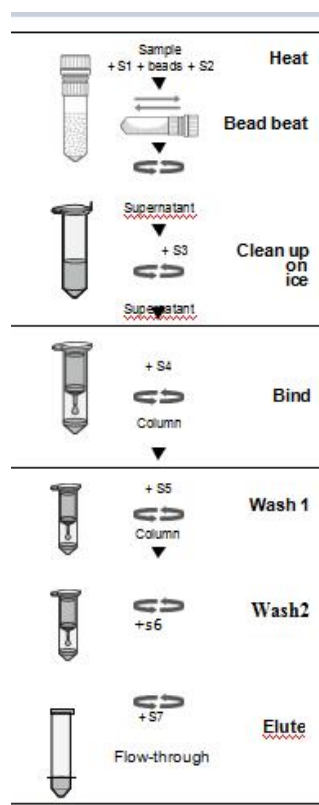


3.6 从阴道拭子、口腔拭子、皮肤拭子中提取微生物 DNA

本方案是通过优化实验步骤，达到从阴道拭子、口腔拭子、皮肤拭子等样品中提取微生物或脱落细胞 DNA 的目的。

- 1、加 900 μ l 的 S1-Lysis Buffer 到 Dry Bead Tube 中，将拭子头折断后转移 1 个到 Dry Bead Tube。
- 2、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。
- 3、65 $^{\circ}$ C 孵育 10 min。
- 4、剧烈涡旋震荡 10min。
(此步骤可选用研磨仪，频率：6.5 m/sec，处理时间：30S，10 个循环)
- 5、14000 rpm 离心 1 min，转移上清 600 μ l 到新的 1.5 ml 的离心管中。
(注意：离心后上清表面可能出现一层杂质，避免吸取这些杂质，因为这些杂质会影响下游的扩增)
- 6、加入 400 μ l S3-Cleanup Buffer，立即彻底混匀。
(加入 S3 后，根据实验的情况，可选择冰上孵育 10 min，可以最大限度的去除抑制剂)
- 7、14000 rpm 离心 2 min，转移全部上清液（约 800 μ l）到新的 1.5ml 的离心管中。
- 8、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。
- 9、转移剩下的全部混合液体至离心柱中，14000 rpm 离心 1 min，弃滤液。
- 10、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，14000 rpm 离心 1 min，弃滤液。
- 11、重复一次步骤 10。
- 12、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，14000 rpm 离心 1 min，弃滤液。
- 13、重复一次步骤 12。
- 14、将离心柱装回收集管中，14000 rpm 离心 1 min，弃收集管。
(此步骤，是除去漂洗液中多余的乙醇)
- 15、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，14000 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。)

流程图



3.7 从运送培养基或培养单菌落中提取高纯度 DNA

本方案是通过优化实验步骤，达到从单菌落培养基及批量培养的菌液中或者运送样品的培养基中提取微生物 DNA 的目的。

1、使用合适体积的离心管 14000 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)

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: 6.5 m/sec, 处理时间: 30S, 10 个循环)

6、14000 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, 14000 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, 14000 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, 14000 rpm 离心 1 min, 弃滤液。

12、重复一次步骤 11。

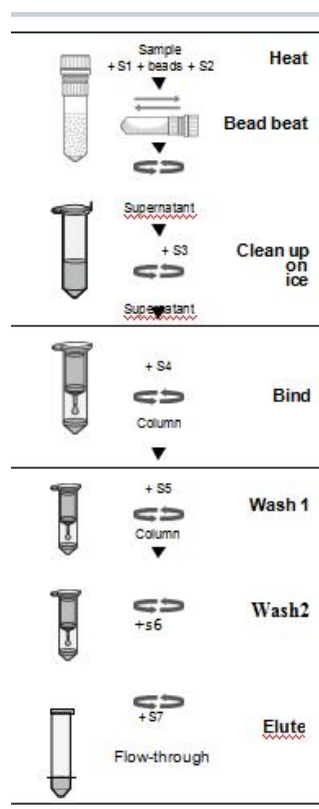
13、将离心柱装回收集管中, 14000 rpm 离心 1 min, 弃收集管。

(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, 14000 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。

流程图



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。