

HiPure Microbial DNA Kit B

微生物总 DNA 试剂盒

HiPure MicroBiome DNA Kit B 为寄生微生物 DNA 提取提供了可靠的解决方案。试剂盒基于硅胶柱纯化技术，提取过程中无需使用有毒的酚氯仿抽提，也无需进行耗时的醇类沉淀，整个提取过程只需 60 分钟。试剂盒适合于从抗凝血液、组织、肠道微生物中富集提抽微生物 DNA，并高效去除细胞 DNA。得到的 DNA 可直接用于 PCR、酶切、Southern blot 等实验。

组 成

产品编号	D3148-01B	D3148-02B	D3148-03B
纯化次数	10 次	50 次	250 次
HiPure DNA Mini Columns I	10	50	250
2ml Collection Tubes	10	50	250
2ml Beads Tubes	10	50	250
Buffer ES	1 ml	3 ml	15 ml
Buffer AL	10 ml	20 ml	80 ml
Buffer GW1	4.4 ml	22 ml	110 ml
Buffer GW2*	5 ml	20 ml	2 x 50 ml
Elution Buffer	5 ml	30 ml	180 ml
Proteinase K	12 mg	24 mg	120 mg
Protease Dissolve Buffer	2 ml	1.8 ml	15 ml
说明书	1	1	1

版本号：2021-04

保质期

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

需要准备材料和工具

- 无水乙醇(96-100%)
- 无 DNase 酶的 1.5ml 离心管和无 DNase 酶的枪头
- 小型离心管(<12,000 xg)
- 溶解 Proteinase K (20mg/ml): 加入 Protease Dissolve Buffer 溶解 Proteinase K 至终浓度为 20mg/ml。Proteinase K 干粉在 2-8°C 保存一年，但溶解的 Proteinase K 须保存于-20°C。
- 用无水乙醇稀释 Buffer GW2，并于室温保存。
- 用无水乙醇稀释 Buffer GW1，并于室温保存。

方案 1. 从生物样品中抽提总 DNA

1. 在 2ml 匀浆管中，先加入 50µl Buffer ES。
2. 转移 300~500µl 血水样品、匀浆液、血浆、腹水、脑积液、拭子浸泡液、离心浓缩后液体等样品至匀浆管中，在涡旋仪上最高速度涡旋混匀 10 分钟裂解细胞或转移至珠磨仪进行珠磨。

痰液：取适量的痰液，加入适量的生理盐水或 Buffer PBS 和适量的 DTT 至样品中进行液化，液化后，于 13,000 x g 离心 10 分钟收集微生物和细胞，余下 300~500µl 液体和沉淀，涡旋重悬后转移至匀浆管中。

3. 静置 1 分钟，取 250µl 上清液至新的离心管中。
4. 加入 250µl Buffer AL 和 20µl Proteinase K 至上清液中，涡旋混匀。70°C 温育 10 分钟。
5. 加入 250µl 无水乙醇至裂解液中。涡旋混匀 15 秒。
6. 把 HiPure DNA Mini Column I 装在 2ml 收集管中。转移一半体积的混合液(包括沉淀)转移至

柱子中。10,000 × g 离心 1 分钟。

7. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。**转移余下的混合液(包括沉淀)转移至柱子中。**10,000 × g 离心 1 分钟。
8. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。**加入 600µl Buffer GW1(已用乙醇稀释)至柱子中。**10,000 × g 离心 1 分钟。
9. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。**加入 600µl Buffer GW2(已用乙醇稀释)至柱子中。**10,000 × g 离心 1 分钟。
10. 倒弃流出液，把柱子装回收集管中。10,000 × g 离心 2 分钟。
11. 将柱子装在新的 1.5ml 离心管中。**加入 50µl Elution Buffer 至柱子膜中央。**放置 3 分钟。10,000 × g 离心 1 分钟。
12. 丢弃 DNA 结合柱，把 DNA 保存 2-8℃，长期保存需保存于-20℃。

附加流程 1: 从 1~2ml 全血中提取微生物总 DNA

1. 取 1~2ml 全血至 15ml 离心管，加入 3 倍体积的 1 × Buffer RBC 中，颠倒 10-15 次混匀。

注：10 × Buffer RBC 使用前须用灭菌水稀释 10 倍。

2. 室温放置 5 分钟，期间颠倒混匀 2-3 次。
3. 室温下，4,000~5,000 × g 离心 20 分钟收集细胞和微生物 DNA。
4. 倒弃或吸弃上清液，剩余~500µl 溶液和白细胞沉淀，涡旋重悬细胞，按方案 1 进行操作。

附加流程 2: 从 1~2ml 液体样品中提取微生物总 DNA

1. 取 1~2ml 血清、血浆、尿液等样品至 15ml 离心管。
2. 室温下，10,000 × g 离心 3 分钟收集细胞和微生物 DNA。
3. 倒弃或吸弃上清液，剩余~500µl 溶液和沉淀，涡旋重悬细胞，按方案 1 进行操作。

常见问题解答

该列表可能有利于解决提取过程所碰到的问题。Magen 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。

现象	原因及解决方法
柱子堵塞	
需要离心去除不消化物质	若样品消化后仍在明显的颗粒，于 10,000 xg 离心 5 分钟去除未消化的物质。
样品用量太多	减少样品用量。
DNA 产量低	
细菌数量计算不对	用平板计算法计算细菌数量
柱子堵塞	参照上述情况
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。
GW2 中乙醇没有加入或加入量不够	按说明书或瓶子标签所示，加入适量的无水乙醇至 Buffer GW1 和 Buffer GW2 中。
柱子没有空甩	柱子必须空甩 2-3 分钟以去除膜上残留的乙醇。
RNA 污染	
延长 RNASE 消化时间	延长 RNase 消化时间
OD260/OD280 比值不正常	
RNA 污染	加入 RNASE 酶消化，或延长 RNASE 酶的消化时间
Proteinase K 活性下降	重新制备 Proteinase K。使用后 Proteinase K 必须立即保存于 -20°C。分装保存 Proteinase K，避免反复冻融。
加入 Buffer DL 后混匀不充分	重新提取，加入 Buffer DL 后立即颠倒混匀 3-5 次，然后以最高速度涡旋让样品与 Buffer DL 充分混匀。
GW2 中乙醇没有加入或加入量不够	按说明书或瓶子标签所示，加入正确的乙醇。