

目 录

简 介	2
原 理	2
试剂盒组成	3
保质期	3
准备工作	4
方案 1:血液等液体样品的微生物 DNA 提取	5
方案 2:动植物样品的微生物 DNA 提取	6
方案 3:肠道微生物 DNA 提取	7
方案 4:总 DNA 提取	7
常见问题回答	8

版本: 2018-01

简介

HiPure MicroBiome DNA Kit 为寄生微生物 DNA 富集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。

原理

HiPure 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。

HiPure MicroBiome DNA Kit 基于硅胶柱纯化方式。样品在裂解液 CLB 作用下，真核细胞会快速裂解，而细菌/真菌含细胞壁不会裂解，离心得到微生物细胞，经 DNASE 消化进一步去除真核细胞 DNA，然后在裂解液和蛋白酶作用下裂解消化，DNA 释放到裂解液中。加入乙醇后，转移至柱子中过滤，DNA 被吸附上柱子的膜上，而蛋白质则不被吸附而去除。柱子经 Buffer GW2 洗涤去除盐分，最后 DNA 被低盐缓冲液(Buffer TE)洗脱。洗脱的 DNA 可直接用于 PCR、酶切、Southern blot 等实验。

组 成

HiPure MicroBiome DNA Kit

产品编号	D3148-01	D3148-02	D3148-03
纯化次数	10 次	50 次	250 次
HiPure DNA Mini Columns I	10	50	250
2ml Collection Tubes	10	50	250
Buffer CLB	20 ml	80 ml	2 x 200 ml
Buffer MTL	10 ml	30 ml	150 ml
Buffer DL	10 ml	30 ml	150 ml
Buffer GW2*	5 ml	20 ml	2 x 50 ml
Buffer AE	5 ml	30 ml	180 ml
Proteinase K	6 mg	12 mg	60 mg
Protease Dissolve Buffer	2 ml	1.8 ml	5 ml
DNase Mixture	-	10 mg	5 x 10 mg
DNase Buffer	1.8 ml	15 ml	60 ml
说明书	1	1	1

版本号：2019-06

保 质 期

HiPure MicroBiome DNA Kit 除 Proteinase K 和 DNase Mixture 外，可在室温下(15-25℃)干燥保存 18 个月。长期保存时需置于 2-8℃。低温下，Buffer ATL 可能会有沉淀形成，需 37℃水浴让沉淀完全溶解。收到产品后，把 Proteinase K 和 DNase Mixture 后请保存于-20~8℃，把 Buffer CLB 放置于 2-8℃保存。

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℃ 保存一年，但溶解的 Proteinase K 须保存于-20℃。

D3148-01	加入 0.3 ml Protease Dissolve Buffer
D3148-02	加入 0.6 ml Protease Dissolve Buffer
D3148-03	加入 3 ml Protease Dissolve Buffer

- 用无水乙醇稀释 Buffer GW2，并于室温保存。

D3148-01	加入 20 ml 无水乙醇
D3148-02	加入 80 ml 无水乙醇
D3148-03	每瓶中加入 200 ml 无水乙醇

- 溶解 DNase Mixture: 每管 DNase Mixture，每管加入 0.6ml Protease Dissolve Buffer，颠倒混匀使之充分溶解，溶解后须保存于-20℃。

方案 1. 从血液等液体样品中富集抽提微生物 DNA

1. 转移 0.4ml 抗凝血液、培养血液或其它液体样品至 2ml 离心管中。
2. 加入 1.2ml Buffer CLB 至样品中，颠倒混匀 5~10 次，室温静置 10 分钟让细胞充分裂解。
3. $13,000 \times g$ 离心 10 分钟收集微生物，小心吸弃上清液，余下 50 μ l 残液。
4. 加入 150 μ l DNase Buffer 和 10 μ l DNase Mixture 至残液中，用移液枪吸打 3~5 次打散沉淀，室温静置 15~20 分钟进一步消化去除残留的细胞 DNA。
5. 加入 350 μ l Buffer MTL 和 10 μ l Proteinase K 至样品中，涡旋打散样品。55 $^{\circ}$ C 水浴 30 分钟。
6. 95 $^{\circ}$ C 水浴 20 分钟或转移珠磨管进行珠磨。
7. 加入 500 μ l Buffer DL 和 500 μ l 无水乙醇至裂解液中。涡旋混匀 15 秒。
8. 把 HiPure DNA Mini Column I 装在 2ml 收集管中。把第 7 步获得的混合液(包括沉淀)转移至柱子中。10,000 $\times g$ 离心 1 分钟。
9. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。加入 500 μ l Buffer GW2(已用乙醇稀释)至柱子中。10,000 $\times g$ 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。
10. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。加入 500 μ l Buffer GW2(已用乙醇稀释)至柱子中。10,000 $\times g$ 离心 1 分钟。
11. 倒弃流出液，把柱子装回收集管中。10,000 $\times g$ 离心 2 分钟。
12. 将柱子装在新的 1.5ml 离心管中。加入 30 μ l Buffer AE 至柱子膜中央。放置 3 分钟。10,000 $\times g$ 离心 1 分钟。
13. 丢弃 DNA 结合柱，把 DNA 保存 2-8 $^{\circ}$ C，长期保存需保存于-20 $^{\circ}$ C。

方案 2. 从组织样品中富集抽提微生物 DNA

1. 称取 0.1g 动植物组织样品，加入 1ml Buffer PBS，用玻璃匀浆器或带转头的机械匀浆器充分组织，让组织块充分匀浆。
2. 室温静置 2 分钟让大块的组织样品自然沉降到管底，转移 0.4ml 上层溶液至 2ml 离心管中。
3. **加入 1.2ml Buffer CLB 至样品中，颠倒混匀 5~10 次**，室温静置 10 分钟让细胞充分裂解。
4. 13,000 × g 离心 10 分钟收集微生物，小心吸弃上清液。
5. **加 150µl DNase Buffer 和 10µl DNase Mixture 至残液中**，用移液枪吸打 3~5 次打散沉淀，室温静置 15-20 分钟进一步消化去除残留的细胞 DNA。
6. **加入 350µl Buffer MTL 和 10µl Proteinase K 至样品中，涡旋打散样品**。55℃水浴 30 分钟。
7. 95℃水浴 20 分钟或转移珠磨管进行珠磨。
8. 13,000 × g 离心 3 分钟。
9. 转移 500µl 上清液至新的离心管中。**加入 500µl Buffer DL 和 500µl 无水乙醇至裂解液中**。涡旋混匀 15 秒。
10. **把 HiPure DNA Mini Column I 装在 2ml 收集管中。把第 9 步获得的混合液转移至柱子中**。10,000 × g 离心 1 分钟。
11. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。**加入 500µl Buffer GW2(已用乙醇稀释)至柱子中**。10,000 × g 离心 1 分钟。
12. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。**加入 500µl Buffer GW2(已用乙醇稀释)至柱子中**。10,000 × g 离心 1 分钟。
13. 倒弃流出液，把柱子装回收集管中。10,000 × g 离心 2 分钟。
14. 将柱子装在新的 1.5ml 离心管中。**加入 30µl Buffer AE 至柱子膜中央**。放置 3 分钟。10,000 × g 离心 1 分钟。

方案 3. 从肠道等内容物中富集抽提微生物 DNA

1. 称取 100~200mg 动物肠道内容液至 2ml 离心管中，加入 1ml Buffer PBS 进行匀浆或涡旋打散样品。室温静置 1 分钟让大块的组织样品自然沉降到管底。
2. 转移 0.5ml 上层溶液至 2ml 离心管中。加入 1.3ml Buffer CLB 至样品中，颠倒混匀，室温静置 10 分钟。
3. 13,000 × g 离心 10 分钟收集微生物，吸弃上清液。
4. **加 150µl DNase Buffer 和 10µl DNase Mixture 至残液中**，用移液枪吸打 3~5 次打散沉淀，室温静置 15-20 分钟进一步消化去除残留的细胞 DNA。
5. **加入 350µl Buffer MTL 和 10µl Proteinase K 至样品中，涡旋打散样品**。55℃ 水浴 30 分钟。
6. 95℃ 水浴 20 分钟或转移珠磨管进行珠磨。
7. 13,000 × g 离心 10 分钟。
8. 转移 500µl 上清液至新的离心管中。**加入 500µl Buffer DL 和 500µl 无水乙醇至裂解液中**。涡旋混匀 15 秒。按方案 1 的第 8~13 步进行操作。

方案 4: 总 DNA 提取

1. 称取 20~50mg 组织（如肠道、肌肉等）至 2ml 离心管中。
2. **加入 500µl Buffer MTL 和 10µl Proteinase K 至样品中，涡旋打散样品**。55℃ 水浴 60~120 分钟。
3. 95℃ 水浴 20 分钟或转移珠磨管进行珠磨。
4. 13,000 × g 离心 3 分钟。
5. 转移 500µl 上清液至新的离心管中，**加入 500µl Buffer DL 和 500µl 无水乙醇至裂解液中**。涡旋混匀 15 秒。按方案 1 的第 8~13 步进行操作。

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℃。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。