

## HiPure Water DNA Kit

### 水体 DNA 小提试剂盒

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	2 ml	6 ml	22 ml
Buffer PS	5 ml	20 ml	80 ml
Buffer GDP	15 ml	100 ml	2 x 200 ml
Buffer GW1 *	6.6 ml	13 ml	66 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
说明书	1	1	1

### 保存条件

HiPure Water DNA Kit 组份可在室温下(15-25℃)干燥保存 18 个月。长期保存时需放置于 2-8℃。

## 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

1. **水体微生物的收集:** 用 0.45 $\mu$ m 滤膜或 0.22 $\mu$ 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 $\mu$ m, 直径为 9cm 时, 一次可处理 5-10L 的自来水。  
有机质含量高的水体含有大量的悬浮粒子或沉淀物。这些颗粒会很快引起滤膜的堵塞。在 0.45 $\mu$ m 或 0.22 $\mu$ m 滤膜上放置一些更大孔径的滤膜, 如在 0.45 $\mu$ m 或 0.22 $\mu$ m 滤膜上放置一层 1 $\mu$ m 滤膜和一层 3-8 $\mu$ m 滤膜, 可减少堵塞现象。
2. 用灭菌镊子取下滤膜, 卷成圆柱状或剪成碎片装在 2~15ml 离心管中。**加入 0.9ml Buffer SOL、90 $\mu$ l Buffer SDS 和 0.5g 玻璃珠(0.1-0.6mm)**。在涡旋仪上最高速度不间断涡旋 5~10 分钟。
3. 70°C水浴 10 分钟。  
部分细菌或真菌带有很厚的细胞壁而极难裂解, 如葡萄球菌。用 90°C水浴 15 分钟可提高难裂解细菌裂解效果, 但 90°C水浴会引起 DNA 的片断化。推荐先用 70°C水浴来提取 DNA, 再根据结果, 调整下一次的水浴温度。
4. **加入 0.3ml Buffer PS 至样品中。**涡旋混匀 15 秒, 冰上放置 5 分钟。
5. 4,000~6,000rpm 离心 10 分钟。
6. 转移上清液至新的 2ml 离心管中。**加入等倍体积 Buffer GDP 至上清液。**颠倒混匀。
7. 把 DNA 柱装在收集管中。**转移 0.75ml 混合液至柱子中。**8,000  $\times$  g 离心 1 分钟。
8. 倒弃滤液把柱子装回收集管。继续转移剩余混合液至柱子中。8,000  $\times$  g 离心 1 分钟。重复此步直到所有混合液都转移至柱子中离心过滤。

9. **倒弃流出液，把柱子装回收集管中。加入 500 $\mu$ l Buffer GW1 至柱子上。**8,000  $\times$  g 离心 1 分钟。
10. **倒弃滤液，把柱子装回收集管中。加入 600 $\mu$ l Buffer GW2(已用乙醇稀释)至柱子中。**8,000  $\times$  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。
11. **倒弃滤液，把柱子装回收集管中。加入 600 $\mu$ l Buffer GW2(已用乙醇稀释)至柱子中。**8,000  $\times$  g 离心 1 分钟。
12. 倒弃流出液，把柱子装回收集管中。10,000  $\times$  g 离心 2 分钟空甩柱子。
13. 将柱子装在 1.5ml 离心管中。**加入 30 $\mu$ l Buffer AE 至柱子的膜中央。**放置 3 分钟。10,000  $\times$  g 离心 1 分钟。
14. **再加入 30 $\mu$ l 预热至 65 $^{\circ}$ C 的 Buffer AE 至柱子的膜中央。**放置 3 分钟。12,000  $\times$  g 离心 1 分钟。
15. 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。

## 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 后没有充分混匀。
- **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。

### 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，富含水分的底泥富含有机质，处理这些样品时，土壤用量减半操作。

### 3. DNA 产量低

- **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。