

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:总 DNA 提取	5
方案 2:大体积微生物 DNA 富集提取	7
常见问题回答	8

版本: 2024-01

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
2ml Beads Tubes	10	50	250
Buffer LB1	15 ml	60 ml	270 ml
DNase Buffer	5 ml	15 ml	60 ml
Buffer TL	5 ml	15 ml	60 ml
Buffer MLB	10 ml	30 ml	150 ml
Buffer DCW1	4.4 ml	22 ml	110 ml
Buffer DCW2*	5 ml	20 ml	2 x 50 ml
Buffer AVE	3 ml	10 ml	30 ml
Proteinase K	0.3 ml	1.2 ml	6 ml
Protease Dissolve Buffer	1.8 ml	1.8 ml	5 ml
DNase I (Powder)	3 mg	10 mg	4 x 10 mg
说明书	1	1	1

版本号：202408

保 质 期

HiPure MicroBiome DNA Kit 除 Proteinase K 和 DNase I 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℃。收到产品后，把 Proteinase K 和 DNase I 保存于 -20~8℃。

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)
- 用无水乙醇稀释 Buffer DCW2，并于室温保存。

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

- 用无水乙醇稀释 Buffer DCW1，并于室温保存。

D3148-01B	加入 5.6 ml 无水乙醇
D3148-02B	加入 28 ml 无水乙醇
D3148-03B	加入 140 ml 无水乙醇

- 溶解 DNase I: 加入 Protease Dissolve Buffer 溶解 DNase I 至终浓度为 10mg/ml。溶解后保存于-20℃。

D3148-01B	加入 0.3 ml Protease Dissolve Buffer
D3148-02B	加入 1.0 ml Protease Dissolve Buffer
D3148-03B	每管加入 1.0 ml Protease Dissolve Buffer

方案 1. 从生物样品中抽提总 DNA

1. 在 2ml 匀浆管中，先加入 150 μ l Buffer TL 和 20 μ l Proteinase K。然后转移 300 μ l 全血、血水、组织匀浆液、血浆、腹水、脑积液、拭子浸泡液、细胞悬液等样品至匀浆管中。
 - 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 \times g 离心 10 分钟收集微生物和细胞，余下 300 μ l 液体和沉淀，涡旋重悬后转移至匀浆管中。
 - 固体样品：转移 30-50mg 糊状物、组织块，肠道内容物或其它固体样品至匀浆管中，再补加入 300 μ l Buffer TE 至匀浆管中，然后再加入 150 μ l Buffer TL 和 20 μ l Proteinase K。
2. 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 90 秒。
 - Powerlyzer 珠磨仪：建议 2000rpm 珠磨 30 秒，暂停 30 秒，再 2000rpm 珠磨 30 秒。
 - FastPrep24 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。
 - 净信研磨仪：4500~5000rpm，振荡 45s，间停 20s，重复 2 次，共振荡 3 次，时间共 135s；
3. 13,000 \times g 离心 3 分钟。
4. 转移 250 μ l 上清液至新的离心管中，加入 500 μ l Buffer MLB，颠倒混匀 6-8 次。
5. 把 HiPure DNA Mini Column I 装在 2ml 收集管中。转移全部混合液移至柱子中。10,000 \times g 离心 1 分钟。
6. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。加入 500 μ l Buffer DCW1(已用乙醇稀释)至柱子中。10,000 \times g 离心 1 分钟。
7. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。加入 500 μ l Buffer DCW2(已用乙醇稀释)至柱子中。10,000 \times g 离心 1 分钟。
8. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。加入 500 μ l Buffer DCW2(已用乙醇稀释)至柱子中。10,000 \times g 离心 1 分钟。
9. 倒弃流出液，把柱子装回收集管中。10,000 \times g 离心 2 分钟。

10. 将柱子装在新的 1.5ml 离心管中。加入 50 μ l 洗脱液 AVE 至柱子膜中央。放置 3 分钟。
10,000 \times g 离心 1 分钟。
11. 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. 从大体积液体样品中富集抽提微生物 DNA

1. 转移 1.0~1.8ml 全血、血水、组织匀浆液、腹水、积液、浸泡液、细胞悬液等样品至 2ml 离心管中，13,000 \times g 离心 10 分钟收集微生物细胞，小心吸弃上清液，余下不超过 0.7ml 的残液和细胞沉淀，涡旋重悬细胞。
 - 固体组织样品：取 50-200mg 样品，加入 1.0ml Buffer PBS 进行匀浆或研磨，制成均一的组织悬液，静置 3 分钟，转移 0.5ml 上清液按第二步进行操作。
 - 痰液：取适量体积的痰液，加入适量的 PBS 和 DTT 进行液化。10,000 \times g 离心 10 分钟收集脱落细胞和微生物，倒弃上清液，加入 0.5ml PBS 重悬细胞按第 2 步进行操作。
 - 全血样品，建议不要超过 1.0ml，以免产生大量的沉淀。
2. 加入 1.0ml Buffer LB1 和 5 μ l Proteinase K 至样品中，颠倒混匀 10-15 秒。室温放置 10 分钟，其间颠倒混匀数次。13,000 \times g 离心 10 分钟收集微生物细胞。小心吸弃上清液，余下 50 μ l 溶液和沉淀，涡旋充分重悬沉淀。
3. 加入 200 μ l DNase Buffer 和 10 μ l DNase I，颠倒混匀，室温振荡温育 15 分钟消化 DNA。
4. 加入 200 μ l Buffer TL 和 15 μ l Proteinase K 混匀，全部转移至 2ml 匀浆管中。在涡旋仪上高速涡旋 10 分钟裂解微生物或珠磨仪上珠磨 1 分钟。
 - Powerlyzer 珠磨仪：建议 2000rpm 珠磨 30 秒，暂停 30 秒，再 2000rpm 珠磨 30 秒。
 - FastPrep24 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。
 - 净信研磨仪：4500~5000rpm，振荡 45s，间停 20s，重复 2 次，共振荡 3 次，时间共 135s；
5. 13,000 \times g 离心 3 分钟。

6. 转移 250 μ l 上清液至新的离心管中，加入 500 μ l Buffer MLB，颠倒混匀 6-8 次。
7. 把 HiPure DNA Mini Column I 装在 2ml 收集管中。转移全部混合液移至柱子中。10,000 \times g 离心 1 分钟。
8. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。加入 500 μ l Buffer DCW1(已用乙醇稀释)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 DCW2(已用乙醇稀释)至柱子中。10,000 \times g 离心 1 分钟。
10. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。加入 500 μ l Buffer DCW2(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 30~50 μ l 洗脱液 AVE 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。

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。
DCW1/DCW2 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 DCW1 和 Buffer DCW2 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。
DCW2 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。