

GF-1 土壤/粪便 DNA 提取试剂盒说明书

版本 4.1

产品简介:

GF-1 土壤/粪便 DNA 提取试剂盒, 可从高达 1g 的土壤样品中快速有效地提取细菌 DNA, 而不需要进行沉淀或有机提取法。该试剂盒采用一个经特殊处理的硅基材料固定到柱子中, 在高盐状态下有效地结合 DNA。试剂盒采用核酸纯化柱技术, 使用最佳缓冲液, 以确保只有 DNA 被分离, 而细胞蛋白质, 胡敏酸, 代谢物, 盐和其它低分子量的杂质将在随后的洗涤步骤中去除。高品质 DNA 在低盐缓冲液或水中被洗脱, 用于接下来的实验, 如酶切, PCR 扩增和其他操作。

试剂盒组成成份

	5 次	25 次	100 次	200 次
产品目录号	样品	CN/GF-SD-025	CN/GF-SD-100	CN/GF-SD-200
组份				
GF-1DNA 吸附柱(GF-1 DNA Binding Columns)	5	25	100	200
收集管 (Collection tubes)	10	50	200	400
玻璃珠 (Glass Beads)	3g	15g	55g	110g
HTR 试剂 (HTR Reagent)	1.2ml	6ml	22ml	45ml
缓冲液 DS (Buffer DS)	0.6ml	3ml	11ml	22ml
缓冲液 SLX Mlus (Buffer SLX Mlus)	6ml	30ml	110ml	220ml
P2 缓冲液 (P2 Buffer)	2 × 1.5ml	12.5ml	30ml	60ml
XP1 缓冲液 (XP1 Buffer)	4ml	20ml	80ml	160ml
SPW 洗涤液* (SPW Wash Buffer*)	2ml	10ml	2 × 18ml	3 × 25ml
洗脱液 (Elution Buffer)	2 × 1.5ml	15ml	60ml	120ml
使用说明 (Handbook)	1	1	1	1

注意: 标*的请参照配制方案以及其储存条件和稳定性。

GF-1 土壤粪便 DNA 提取试剂盒有 25 次、100 次、200 次包装。

本试剂盒仅供研究使用。

自备材料

无水乙醇 (>95%)

异丙醇

RNA 酶 A(25mg/ml)

配制方案

贴有 SPW 洗涤液标签标签的浓缩液, 在使用前需用无水乙醇 (>95%) 稀释。

样品 (5 次):

在 SPW 洗涤液中加入 6ml 无水乙醇。

CN/GF-SD-025 (25 次):

在 SPW 洗涤液中加入 40ml 无水乙醇。

CN/GF-SD-100 (100 次):

在 SPW 洗涤液中加入 72ml 无水乙醇。

使用完后再以同样的方法稀释第二瓶洗涤液。

CN/GF-SD-200 (200 次):

在 SPW 洗涤液中加入 100ml 无水乙醇。

使用完后再以同样的方法稀释第二瓶洗涤液。

储存及稳定性

● 所有溶液 20 °C-30 °C 保存。

● 有些缓冲液在室温过低时易出现结晶, 使用前请置于 55 °C-65 °C 环境中至晶体完全溶解。

化学危害

XP1 缓冲液含有胍盐, 当接触皮肤或吞服时可能造成危害。使用时一定要戴上手套并做好安全防护措施。不能将含有漂白剂或任何形式的酸性溶液加入到含有胍盐的提取废料中来进行消毒。清洁沾染试剂的物品, 不需要用漂白剂和酸性溶液清洗, 只需浸泡在洗涤剂和水中即可除去胍盐。

操作步骤

提示

● 所有操作均在室温下进行, 除非另有说明。

● SPW 洗涤液 (浓缩液) 在使用前务必用无水乙醇稀释, 请参照配制方案。

● 漩涡振荡 30 秒, 充分混匀 HTR 试剂, 使颗粒全部重新悬浮。

● 预先设定 70 °C 水浴锅。

● 预先设定另一 95 °C 水浴锅 (为革兰氏阳性菌选用)。

1、在含有 500mg 玻璃珠的 2ml 微量离心管中加入 0.2-1g 土壤样品, 加入 1ml Buffer SLX Mlus, 最大速度漩涡振荡 3-5 分钟, 使样本充分均匀, 然后加入 100ul 缓冲液 DS, 漩涡振荡, 70 °C 温育 10 分钟。在温育过程中, 漩涡混匀样本两次。对于从革兰氏阳性菌中分离 DNA, 样本需再 95 °C 温育 2 分钟。

2、室温, 5,000 x g (8,000rpm) 离心 3 分钟。取上清 800ul 到一新的 1.5ml 微量离心管, 加入 270ul P2 缓冲液到样品管中, 漩涡振荡充分混匀。冰上静置 5 分钟。

3、14,000 x g (15,000rpm) 离心 3 分钟, 沉淀土壤颗粒。转移全部上清至一新的 2ml 微量离心管。

注: 转移上清时应小心, 不要将杂质转移至新的离心管中。

4、加入 0.7 倍体积的异丙醇, 颠倒混匀 20-30 次。如果土壤样本中 DNA 含量低, 需 -20 °C 温育 1 小时。

5、在 4 °C 下, 以最大转速离心 10 分钟, 小心弃去上清, 不要吸到 DNA 沉底。将离心管倒置在纸巾上 1 分钟使剩余液体流出, 不需要干燥 DNA 沉底。

6、加入 200ul 洗脱液, 脉冲漩涡振荡混匀。70 °C 温育 10-20 分钟溶解 DNA 沉底。

7、加入 100ul HTR 试剂, 漩涡振荡 10 秒, 充分混匀。室温静置 2 分钟。

注: HTR 试剂使用前应用力振荡混匀。

8、最大转速离心 2 分钟。

9、转移上清至一个干净的 1.5ml 微量离心管中。如果这时候上清仍显示样品般深色, 再次进行 HTR 提取, 重复步骤 7-9。

RNA 的去除 (可选)

如果要求DNA中无RNA污染,在样品中加入 2ul RNA酶A(25mg/ml),漩涡振荡充分混匀, 37℃温育 10 分钟。

10、加入等体积的XP1 缓冲液到清澈的上清液中,漩涡振荡充分混匀。如果在第 9 步骤中,上清液体积是 300ul,那么加入 300ul XP1 缓冲液。

11、将亲和柱放入一新的收集管中,取 600ul 步骤 10 中的液体至亲和柱中, 10000×g (11,000 rpm) 离心 1 分钟,弃去废液。重复操作步骤 10 中剩余样品。

12、加入 300ul XP1 缓冲液, 10000×g (11,000 rpm) 离心 1 分钟,丢弃废液和收集管。

13、将亲和柱放入另一新的收集管中,加入 700ul SPW洗涤液, 10000×g (11,000 rpm) 离心 1 分钟,弃去废液。重复洗涤一次。弃去废液。

注:使用前确保SPW洗涤液已用无水乙醇稀释(参照配制方案)。

14、以最大转速离心柱子 2 分钟,除去所有残留的乙醇。

15、将亲和柱放入一新的收集管中,取 30-100ul洗脱液直接加入至亲和柱的膜中央, 70℃温育 5 分钟。以最大转速离心 1 分钟以洗脱DNA。再加入 30-100ul洗脱液重复洗脱一次。

注:确保洗脱液被直接加入到亲和柱的膜中央以完全洗脱DNA。TE缓冲液中的EDTA可能抑制酶反应,但仍可洗脱DNA。如果用水洗脱DNA, PH为 7.0-8.5 时洗脱效果最好。当没有缓冲剂的情况下, DNA可能降解,故DNA最好 -20℃保存。

故障排除

不按照给定的说明进行操作将会出现不符合标准的结果,将影响 DNA 的得率和质量,如果出现此类问题,请参照以下内容处理:

问题	可能的原因	建议
DNA 得率低	土壤样本没有正确保存	土壤样本应 4℃-20℃ 保存。
	样本均裂不完整	确保样本在缓冲液 SLX 和玻璃珠中充分混匀。
		延长玻璃珠跳动的时 间,以确保样品完全均 质。
	SPW 洗涤液未稀释	请参照“ 配制方案 ”。 重新提取新的样本。
	柱子堵塞	检查离心力并延长离 心时间。
		确保 XP1 缓冲液已加 入到柱子中。
	加入洗脱液之前柱子不 干	柱子洗涤液步骤结束 后,确保柱子在最大速 度下甩干 2 分钟。
没有正确洗脱	加入洗脱液后, 65℃温 育柱子 5 分钟。	
	确保洗脱液为低盐缓 冲液或PH7.0-8.5 的水。	

问题	可能的原因	建议
DNA 得率低	储存期间,柱子的硅胶 膜失去结合能力	装载样本前先在柱子 中加入 100 μl 3M NaOH。10,000 x g (11000rpm) 离心 30 秒,弃去废液。
纯度低 (A260/280)	样本均裂不完整	请参照“DNA 得率 低”。
洗脱的 DNA 在下游应用 中性能差	洗脱下来的 DNA 含有 残留乙醇。	在洗涤步骤结束后,以 最大转速离心柱子 2 分 钟。
	抑制剂没有去除。	确保样品用HTR试剂 充分混匀。 用新样品重新提取
	用TE缓冲液洗脱DNA, TE缓冲液中的EDTA可 能抑制酶反应。	用洗脱液或 PH 为 7.0-8.5 的水洗脱DNA。

上海凯斯泰尔生物科技有限公司

地址: 上海市浦东新区康新公路 3377 号 2 号楼 604 室

电话: 021-68060114

传真: 021-68060114

邮箱: info@kestrel-china.com

网址: www.kestrel-china.com

Vivantis Technologies Sdn Bhd

1012 S.Coast Highway Suite 1,Oceanside CA 92054, USA.

Tel: +6 03 8025 1603

Fax: +6 03 8025 1637

Email: info@vivanttechnologies.com

international@vivanttechnologies.com

Web: www.vivanttechnologies.com