

**UltraClean® Microbial DNA Isolation kit****细菌 DNA 提取试剂盒**

货号	提取次数
12224-50	50 次
12224-250	250 次

提醒： Solution MD3 使用前先摇匀。

简介

UltraClean® Microbial DNA Isolation Kit 专门设计用于提取高质量细菌基因组 DNA。实验检验证明适用于包括细菌、酵母等所有种类的细菌类型。

操作预览

用研磨缓冲液重悬细菌细胞，加入到含有研磨珠的研磨珠套管中，再加入裂解缓冲液。细菌细胞在加热、去垢剂以及机械物理作用力共同作用下崩解。释放出来的 DNA 吸附到离心柱滤膜上，经过冲洗去除杂质，最后经验证 DNA-Free 的 Tris 缓冲液洗脱获得最终 DNA。

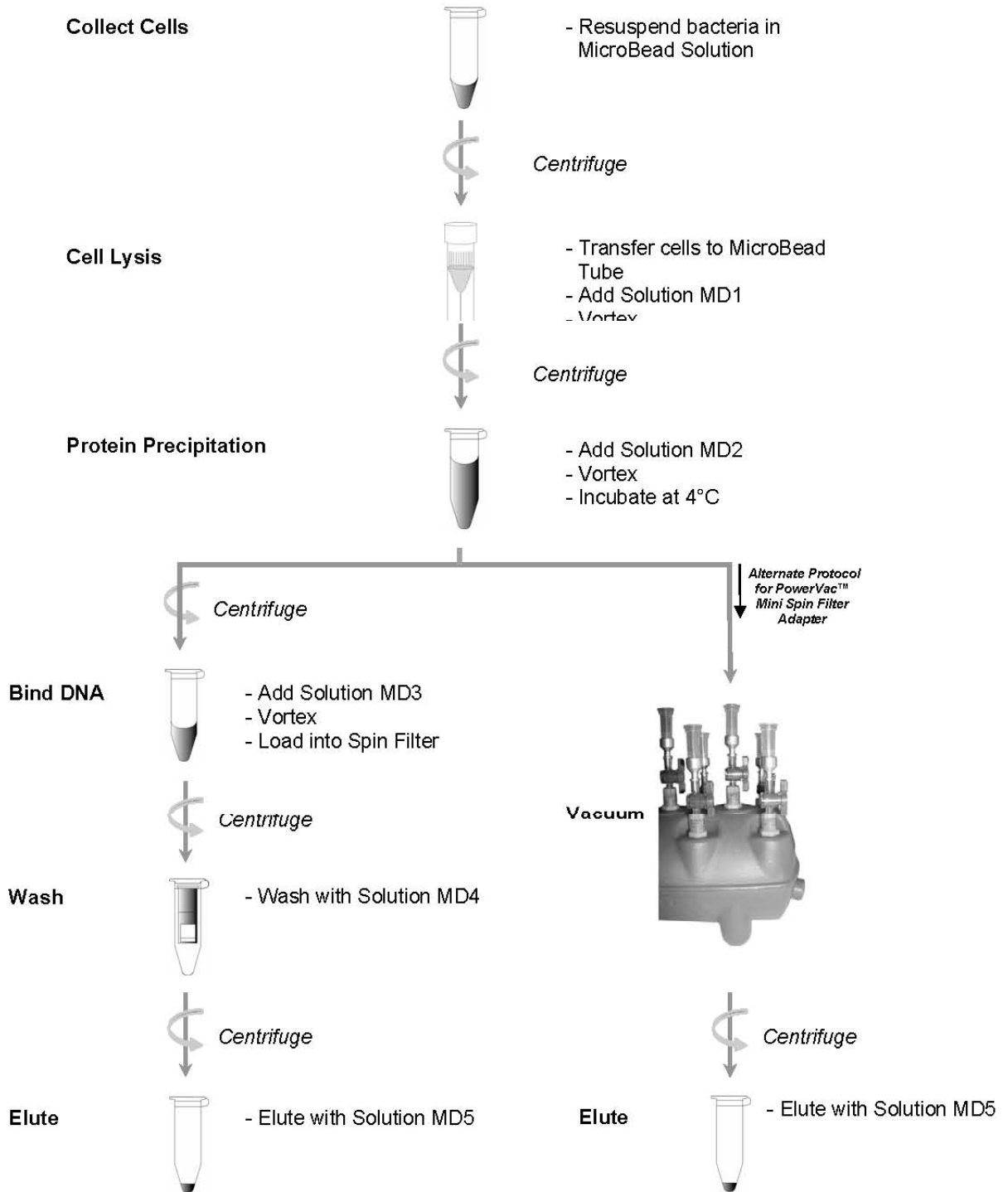
高通量提取选项

MO BIO 提供了真空抽吸法操作说明，省略 DNA 绑定和冲洗过程的离心柱离心，加快整个操作流程。使用整套真空泵适配器一次可批量处理 20 个离心柱。你也可以选用 UltraClean®-htp 96 Well Microbial DNA Isolation Kit（货号 10196-4、10196-12），搭配 96 孔板离心机（96 孔板尺寸 13cm×8cm×5.5cm，离心力 2500g）一次批量提取 2×96 个样。

相关产品	货号	数量
UltraClean® Microbial RNA Isolation Kit	15800-50	50 preps
	15800-250	250 preps
UltraClean® PCR Clean-up Kit	12500-50	50 preps
	12500-100	100 preps
	12500-250	250 preps
UltraClean® -htp 96 well Microbial DNA Isolation Kit	10196-4	4×96 preps
	10196-12	12×96 preps
PowerVac™ Manifold	11991	1 manifold
PowerVac™ Mini System	11992	1 unit + 20 adapters
PowerVac™ Mini Spin Filter Adapters	11992-10	10 adapters
	11992-20	20 adapters



UltraClean[®] Microbial DNA Isolation Kit





设备要求:

微型离心机 (10000g)

移液器 (50 μ l~200 μ l, 100 μ l-1000 μ l)

Vortex-Genie®2 涡旋仪 (MO BIO 货号#13111-V-220)

涡旋仪适配器 (MO BIO 货号# 13000-V1-24)

制备试剂

100%乙醇 (选用 PowerVac™ 真空泵适配器才需要)

保存

组分室温 (15-30°C) 保存。

试剂盒组分

	货号: 12224-50	货号: 12224-250
组分	量	量
MicroBead Tubes (contain 250mg MicroBeads)	50	250
MicroBead Solution	16.5ml	80ml
Solution MD1	2.75ml	15ml
Solution MD2	5.5ml	30ml
Solution MD3	50ml	250ml
Solution MD4	16.5ml	3×32ml
Solution MD5	3ml	15ml
Spin Filters in 2 ml tubes	50	250
2ml Collection Tubes	200	1000

△实验前请先逐一检查试剂!

操作步骤

1、加 1.8ml 过夜孵育的菌液 (细菌或酵母) 到一个 2ml Collection Tube (试剂盒提供) 中, 室温下 10000g 离心 30s。倒掉上清, 10000g 再次离心 30s, 移液器吸掉上清培养基。

这一步发生了什么: 浓缩沉淀细菌细胞。有时候你可能需要更长的离心才能完成沉淀所有细胞。离心并去除所有培养基这部非常重要。

2、加入 300 μ l **MicroBead Solution** 轻轻涡旋重悬细胞团。把重悬的细胞转移到 **MicroBead Tube** 中。

3、使用前**检查 MD1 溶液**。若出现沉淀, 60°C 水浴直至重溶。加入 50 μ l **MD1 溶液** 到 **MicroBead Tube** 中。

这一步发生了什么: MD1 含有 SDS 和其它裂解细胞所需的试剂。SDS 为阴离子去垢剂, 能降解绝大多数细菌细胞膜的重要组成成分脂肪酸和脂质, 进一步辅助裂解细胞。

4、**可选:** 为增加 DNA 得率、减少 DNA 的断裂或提取难提的细胞, 可根据下文疑难点选择可选裂解方法。



这一步发生了什么：可选步骤在某些情况下能获得更好的提取效果。我们建议根据需要，每次只挑选其中一种方法。

5、把 **MicroBead Tube** 水平安放在 MOBIO 的涡旋仪适配器上(货号 13000-V1-24)，最大转数连续涡旋振荡 10min。

这一步发生了什么：这一步创造条件，使得化学裂解和机械裂解共同作用，裂解细菌细胞释放核酸。很多类型细胞，只有在化学裂解液下珠磨研磨才能有效裂解。普通的涡旋振荡是最起码的要求。当然，也可以选用其它强力的大型珠磨研磨设备，研磨时间要适当缩短，减少 DNA 断裂。

6、取下 **MicroBead Tube**，室温下 10000g 离心 30s。**注意：**离心力不要超过 10000g，否则 Tube 管有破裂的风险。

这一步发生了什么：细胞碎片被沉淀下来，DNA 悬浮于上清液中。

7、转移上清到一个新的 **2ml Collection Tube**（试剂盒提供）中。

8、**注意：**大约可获得 300-350 μ l 上清液。

这一步发生了什么：上清液预期体积取决于步骤一细菌细胞团的大小。

9、加入 100 μ l **Solution MD2** 到上清液中，涡旋 5s。然后 4 $^{\circ}$ C 孵育 5min。

10、室温下 10000g 离心 1min。

这一步发生了什么：MD2 溶液含有可沉淀非 DNA 有机或无机细胞碎片、蛋白质。这些有机或无机物质会影响 DNA 纯度，抑制下游实验，必须去除。

11、避开沉淀，转移所有上清到一个新的 **2ml Collection Tube**（试剂盒提供）中。大约可获得 450 μ l 上清。

这一步发生了什么：沉淀中含有非 DNA 有机或无机物质，包括细胞碎片和蛋白。为了获得更好的 DNA 纯度与得率，转移上清时避免吸到沉淀。

12、MD3 使用前先摇匀，加入 900 μ l **Solution MD3** 到上清液中，涡旋 5s 混匀。

这一步发生了什么：MD3 为高浓度盐溶液，建立高盐环境，为下一步离心柱滤膜吸附绑定 DNA 做准备。

13、加载 700 μ l 上清液到 **Spin Filter** 中，室温 10000g 离心 30s。弃去滤液，再次加上清液，直至过滤完所有上清。

这一步发生了什么：DNA 选择性吸附到离心柱的硅胶滤膜上，杂质离心通过滤膜，剩下 DNA 留在滤膜上。

14、加入 300 μ l **Solution MD4**，室温下 10000g 离心 30s。

这一步发生了什么：含酒精的 MD4 溶液冲洗缓冲液冲洗离心柱硅胶滤膜上的 DNA。进一步去除残留的盐分等其它杂质，DNA 仍留在硅胶滤膜上。

15、弃去滤液。

这一步发生了什么：滤液为含酒精的 MD4 溶液和其它杂质，DNA 仍留在滤膜上。

16、室温下 10000g 再次离心 1min。

这一步发生了什么：进一步去除残留的 MD4 溶液（含酒精冲洗液）。为免影响后续 DNA 应用，必须完全去除残余酒精。

17、把 **Spin Filter** 转移到一个新的 **2ml Collection Tube**（试剂盒提供）中。



ANBIOSCI TECH LTD

这一步发生了什么：必须避免碰到酒精冲洗液。

18、加入 50 μ l **Solution MD5** 到白色滤膜中央。

这一步发生了什么：MD5（洗脱缓冲液）润湿整个滤膜能最有效释放绑定的 DNA。

19、室温下 10000g 离心 30s。

这一步发生了什么：MD5（洗脱缓冲液）通过硅胶滤膜，DNA 释放，进入收集 Tube 管。DNA 只有在高盐溶液环境下才能吸附在离心柱硅胶滤膜上。MD5 是 10mM Tris pH8，不含盐。

20、弃去 Spin Filte。此时 DNA 在滤液中可直接用于下游实验，无需进一步处理。

建议 DNA-20 $^{\circ}$ C 保存。Solution MD5 不含 EDTA。

感谢选择使用 Ultraclean[®] Microbial DNA Isolation Kit!

若使用 PowerVac[™] Manifold 抽滤代替离心

每个样品使用一个 Spin Filter 离心管直至抽滤步骤。记号笔在 Collection Tube 顶部及 Spin Filter 做好标记。保持 Spin Filter 与该 2ml Collection Tube 成套对应。若 Spin Filter 在过滤过程中发生堵塞，仍可以改为常规离心继续提取 DNA。

此操作说明书第四步需要外自备 100%乙醇。

1、每一个样品需要安装一个铝质 PowerVac[™] Mini Spin Filter Adapter（MO BIO 货号：11992-10 或 11992-20）到 manifold 的鲁尔接口上。轻轻用力安紧 Spin Filter。关闭 manifold 其它所有不用的接口。

注意：铝质 PowerVac[™] Mini Spin Filter Adapters 可重复使用。

2、加载 650 μ l 样品裂解物（接上文步骤 14）到 Spin Filter。

3、打开真空泵，打开使用的端口的阀门。打开阀门是扶稳 Spin Filter，保持直立。等待裂解物全部通过滤膜，再加 650 μ l 裂解物。继续抽吸滤过。关闭阀门。

注意：可关闭已抽滤的端口，以提高其它端口压力，加快抽滤速度。

4、加入 800 μ l 100%乙醇到 Spin Filter。扶稳 Spin Filter，打开阀门抽滤。抽滤完成后关闭阀门。

5、每个 Spin Filter 加入 300 μ l **Solution MD4**。打开阀门抽滤。当所有 **Solution MD4** 滤完后，继续抽滤 1 min，抽干滤膜。关闭所有端口。

6、关闭真空泵。打开一个未使用的端口释放 manifold 的压力。若 20 个端口都在使用，断开真空泵连接。进入下一步操作前确保真空压力已释放。必须先关闭真空泵，防止滤液倒流。

7、拿下 Spin Filter，放回到原来标记的相应 2ml Collection Tube 中。10000g 离心 1 min 以充分干燥滤膜。

8、把 Spin Filter 转移到一个新的 2ml Collection Tube（试剂盒提供）中，加入 100 μ l **Solution MD5** 到白色滤膜中心。可选：可适用无菌 DNA-Free Water 洗脱 DNA（货号：17000-10）。



9、室温 10000g 离心 30s。

10、弃去 Spin Filter。此时滤液中的 DNA 可直接用于下游实验，无需进一步处理。

疑难点

可选裂解方法（每个提取建议只采用以下一种方法）

- **增加得率：**对于某些细菌，加热能加强细胞裂解效果，增加得率。65℃水浴 10min，接着步骤 5 继续。
- **减少 DNA 断裂：**65℃水浴 10min，期间每 2-3min 涡旋仪点振以下。跳过步骤 5，直接进入步骤 6。这么做可尽量减少对大分子 DNA 的伤害，对于某些类型细菌能增加总 DNA 的得率。
- **难裂解的细胞：**70℃水浴 10min，接着步骤 5 继续。

浓缩 DNA

最终洗脱的 DNA 溶液约为 50 μ l。要浓缩 DNA，可加入 5 μ l 15M NaCl，上下颠倒 3-5 次。然后加入 100 μ l 凉的 100% 乙醇，上下颠倒 3-5 次混匀。-20℃ 孵育 30min，再室温 10000g 离心 15min，弃去所有液体。用真空离心蒸发器、干燥器或冷干机除去残余乙醇。用灭菌水或 MD5 溶液（10mM Tris）重悬 DNA 沉淀。

电泳点样时 DNA 溢出

最终样品中有 MD4 溶液残留常会导致电泳点样 DNA 溢出。为避免这种情况发生，步骤 17 中 Spin Filter 不要沾到任何液体。去除残留的 MD4 溶液，可根据“浓缩 DNA”步骤操作。

DNA 保存

洗脱到 MD5（10mM Tris）的 DNA 必须保存在 -20℃~-80℃ 防止降解。为了延长保存时间，建议把 DNA 等分后 -80℃ 保存。你也可以用 TE 缓冲液洗脱 DNA，而 EDTA 会抑制下游 PCR 等酶反应，不建议采用。

更多实用技巧请参阅 <http://www.anbiosci.com/MBweibo/blog.htm>