

For research use only

Version Number: 1.1

Water DNA Isolation Kit

For genomic DNA purification from various water samples from pond, lake, river, tap-water and so on

试剂盒组成	DE-05613
	50 T
Buffer SG1 *	30 mL
Buffer SG2	1.5 mL
Buffer SG3 *	30 mL
Buffer SG4	1 mL
Buffer PW *	25 mL
Buffer WB	25 mL
Buffer EB	10 mL
Buffer TE	55 mL
Foregene Protease	1.5 mL
Lysozyme	250 mg
DNA-Only Column	50 套
说明书	1 份

*: Buffer SG2、SG3、Buffer PW 中含有具刺激性的离液盐，操作时请注意带上手套和进行相关防护措施。

产品简介

本试剂盒提供了从各种来源的水体样本中快速简便的提取基因组 DNA 的方法。水体样品中存在大量微生物，这些微生物被作为重要的生态指示剂被广泛应用。从水体中提取高纯度的基因组 DNA 是水体环境值检测非常重要的手段。

水体样品中含有大量的抑制因子如腐殖酸、金属离子等，这些物质即使微量存在于纯化后的 DNA 中也会对下游反应产生影响，如对 PCR、限制性酶切等。因而纯化水体基因组 DNA 的关键在于如何有效的去除水体中的抑制因子。采用本公司特有的 DNA-only 硅胶膜离心柱和溶液配方，搭配 Foregene Protease，可以有效的去除水体中各种抑制因子，无需有机溶剂抽提或乙醇及异丙醇沉淀，在 40 分钟内即可完成对水体样品中 DNA 的提取操作。

储存条件

- ❖ 本试剂盒在常温(15-25°C)干燥条件下，可保存 24 个月；如需保存更长时间可置于 2-8°C。
注意：若低温保存，溶液容易产生沉淀。在使用前务必将试剂盒内的溶液在室温中放置一段时间，必要时可在 37°C 水浴中预热 10 分钟，以溶解沉淀，混匀后再使用。
- ❖ Foregene Protease 溶液具有独特配方，常温保存长期(3 个月)具有活性；在 4°C 保存，其活性和稳定性会更好，因此建议将其置于 4°C 保存，切记不能置于 -20°C 保存。
- ❖ 干粉 Lysozyme -20°C 保存；配制好的 Lysozyme 溶液分成小份 -20°C 保存。

注意事项：(请务必在使用试剂盒前仔细阅读注意事项)

- ❖ 每个水体样本单次基因组 DNA 提取应根据水体中的微生物含量和浊度确定，最大不超过 30 L。
- ❖ 使用前，仔细检查 Buffer SG2、Buffer SG3、Buffer SG4 和 Buffer PW 中是否有沉淀析出，若有沉淀析出，请将其置于 37°C 溶解，混匀后再使用。
- ❖ 试剂盒使用前，请务必检查 Buffer WB 是否按说明添加了无水乙醇。Buffer WB 在使用前添加 60 mL 无水乙醇(DE-05613)。
- ❖ 在样品裂解过程中，应始终保持样品浸于裂解缓冲液中，若样品黏附在管盖及内壁，可通过短暂离心进行处理。
- ❖ 洗脱体积： Buffer EB 不应少于 50 μ L，否则会影响 DNA 产量。
- ❖ 切记不要在任何 Buffer 中添加 RNA 酶。
- ❖ 所有离心步骤均为使用台式离心机常温(15-25°C)离心。
- ❖ 所有实验步骤均在常温(15-25°C)进行。

Lysozyme 溶液配制

使用前，Lysozyme 配制成浓度为 100 mg/mL 的溶液。避免反复冻融，分装成小份后于 -20°C 保存。使用前，将 Lysozyme 溶液在室温下溶解，每个样品用量为 50 μ L。

操作步骤 (请严格按照本操作说明进行相关实验操作)

使用前请先在 Buffer WB 中加入无水乙醇，加入体积请参照瓶上的标签。

1. 使用直径为 47 mm，孔径为 0.22-0.45 μ m 的滤膜对水体样品进行过滤，过滤体积取决于水体样品的浊度和微生物的含量。用剪刀将 1/2 张或整张过滤后的滤膜尽量剪碎，置于 2 mL 离心管中，

以便于后面的裂解步骤。

注意：如果滤膜没有尽量剪碎会影响基因组 DNA 的产率和纯度。

2. 向离心管中加入 **1 mL Buffer TE**、**50 μ L Lysozyme** 充分混匀后，**37°C**摇床温浴 **15 min** (转速：**180 rpm**)。

3. 温浴结束后，**13,300 rpm**(~17,000 \times g)离心 **3 min**，用移液器吸除上清。

注意：应尽量吸净残留上清，以免影响后续操作。

4. 向留有沉淀的离心管中加入 **600 μ L Buffer SG1**，上下颠倒充分混匀，加入 **30 μ L Foregene Protease**，**30 μ L Buffer SG2**，上下颠倒充分混匀。

注意：使用前请检查 Buffer SG2 是否有沉淀产生，如有沉淀产生，请将溶液置于 37°C 温育，直至沉淀溶解完摇匀后使用。

5. 将离心管置于 **65°C**水浴或金属浴 **5 min**，中间上下颠倒离心管剧烈晃动混匀一次，时间为 **5 sec**，至离心管中的样品无结块，以便和裂解液充分反应。否则，将会影响 DNA 的产率和纯度。

6. 向离心管中加入 **600 μ L Buffer SG3**，上下颠倒充分混匀，置于 **65°C**水浴或金属浴 **5 min**，其间上下颠倒充分混匀一次。

7. **13,300 rpm**(~17,000 \times g)离心 **3 min**，用移液器将上清液转移至新的 **2 mL** 离心管中，应避免吸到沉淀。

8. 向装有上清液的离心管中加入 **20 μ L Buffer SG4**，**280 μ L 乙醇**(96-100%)涡旋充分混匀 **10 sec**，瞬时离心收集附着在管盖和管壁的液滴。

9. 将离心柱放入收集管中，取 **800 μ L** 混合液加入离心柱(DNA-Only Column)中，**12,000 rpm**(~13,400 \times g)，离心 **1 min**。弃掉收集管中废液。

10. 将离心柱放回收集管中，将剩余混合液全部加入离心柱中，**12,000 rpm**(~13,400 \times g)，离心 **1 min**。弃掉收集管中废液。

11. 将离心柱放回收集管中，向离心柱中加入 **500 μ L Buffer PW**，**12,000 rpm**(~13,400 \times g)，离心 **1 min**。弃掉收集管中废液。

12. 将离心柱放回收集管中，向离心柱中加入 **700 μ L Buffer WB**，**12,000 rpm**(~13,400 \times g)，离心 **1 min**。弃掉收集管中废液。

13. 重复步骤 12 一次。

14. 将离心柱放回收集管中，**12,000 rpm**(~13,400 \times g)离心 **2 min**。

15. 将离心柱转移至新的 **1.5 mL** 离心管中，向膜中央悬空滴加 **50-200 μ L** 已于 **65°C**预热的 **Buffer EB**(切勿将洗脱液添加到压圈上，否则会损失较大体积的洗脱液)，室温放置 **5 min**，**12,000 rpm**(~13,400 \times g) 离心 **1 min**。

注意：如果希望提高 DNA 的浓度，可将第 1 次离心得到的溶液重新加回离心柱中，**12,000 rpm** (~13,400 \times g) 离心 **1 min**。

