

Version Number : 1.1



Water DNA Isolation Kit

Cat.No.DE-05613

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

For research use only

Store at room temperature



目 录

| | |
|--------------------|----|
| 产品介绍 | 3 |
| 产品特点 | 3 |
| 试剂盒应用 | 4 |
| 基因组 DNA 的应用 | 4 |
| 产品质量控制 | 4 |
| 试剂盒内容 | 5 |
| 产品信息 | 5 |
| 储存条件 | 5 |
| 试剂盒组分信息 | 6 |
| DNA-Only Column 特性 | 6 |
| 基因组 DNA 提取得率和纯度 | 7 |
| 基因组 DNA 片段大小 | 7 |
| 注意事项 | 8 |
| 操作前准备事项 | 8 |
| 实验材料和设备 | 8 |
| 自备试剂 | 9 |
| Lysozyme 溶液配制 | 9 |
| 安全性 | 9 |
| 操作指南 | 10 |
| ● 操作步骤 | 10 |
| DNA 浓度及纯度测定 | 11 |
| 快速操作示意图 | 12 |
| 问题分析指南 | 13 |

产品介绍

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。

产品特点

- ◆ 无 RNA 酶污染：试剂盒提供的 DNA-Only Column 使得实验过程中无需额外添加 RNA 酶即可去除基因组 DNA 中的 RNA，避免实验室遭受外源 RNA 酶污染。
- ◆ 速度快：操作简单，水体基因组 DNA 提取操作在 40 分钟内即可完成。
- ◆ 方便：离心操作均在常温，无需 4℃低温离心或乙醇沉淀 DNA。
- ◆ 安全：无需有机试剂抽提。
- ◆ 质量高：提取获得的基因组 DNA 片段大、无 RNA、无 RNA 酶、离子含量极低，能满足各种实验的要求。

试剂盒应用

适用于纯化以下样本基因组 DNA：养殖塘水、池塘水、自来水、湖水、河水、荷塘水等样本。

基因组 DNA 的应用

Water DNA Isolation Kit 纯化获得的基因组 DNA 纯度高，可用于常规分子生物学操作，如：酶切、PCR、Southern 杂交、文库构建等实验。

产品质量控制

按照福际生物试剂盒质量检测体系标准(FOREGENE's Total Quality Management System)，每一批次的水体基因组 DNA 提取试剂盒都严格进行多次测试，确保每一批次试剂盒质量的可靠性和稳定性。

试剂盒内容

| Water DNA Isolation Kit 水体基因组 DNA 提取试剂盒 | |
|--|----------|
| 试剂盒组成 | DE-05613 |
| | 50 次 |
| 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 |

产品信息

| | | | |
|-------------|-----------|----------|-----------------|
| 型号 | 离心柱型 | 纯化组件 | Foregene 离心柱、试剂 |
| 通量 | 1-24 个样品 | 制备时间 | 40 min (24 个样品) |
| 离心机 | 台式离心机 | 组织酶解物分离 | 离心分离 |
| 纯化柱 DNA 承载量 | 80 µg | 离心柱液体盛装量 | 800 µl |
| 洗脱体积 | 50-200 µL | 水体样本处理量 | 10 mL – 30 L |

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。

试剂盒组分信息

- ◆ Lysozyme：酶解阳性菌细胞壁。
- ◆ Buffer TE：用于配制 100 mg/mL Lysozyme 的溶液和提供溶菌酶酶解环境。
- ◆ Buffer SG1 & Buffer SG2：提供样本蛋白酶酶解环境。
- ◆ Foregene Protease：在蛋白酶酶解环境下酶解样本，释放基因组 DNA。
- ◆ Buffer SG3：失活 Foregene Protease，并提供 DNA 上柱环境。
- ◆ Buffer SG4：补充提供 DNA 上柱环境。
- ◆ Buffer PW：去除 DNA 中的蛋白质、RNA 等杂质。
- ◆ Buffer WB：去除 DNA 中的残留的盐离子。
- ◆ Buffer EB：洗脱纯化柱膜上的 DNA。
- ◆ DNA-only Column：特异吸附裂解产物中的基因组 DNA。

DNA-Only Column 特性

| | |
|--|------------|
| DNA最大结合能力(Maximum binding capacity) | 80 µg |
| 上清最大载量体积(Maximum loading volume) | 800 µL |
| 最大DNA片段(Longset DNA fragment) | 23 kb |
| 最小洗脱体积(Minimum elution volume) * | 100 µL |
| 最佳样本选取(Selection of samples) | 新取水体样本 |
| 样本最大初始量(Maximum amount of starting material) * | 30 L (自来水) |

*: 100 μL 的最小洗脱体系是在兼顾 DNA 回收率及浓度给出的比较合理的建议体积。如果为了提高 DNA 的产量, 可以适当增加洗脱液体积; 如果为了提高纯化得到的 DNA 浓度, 在牺牲一部分 DNA 得率的前提下, 适当的减少洗脱液体积, 比如采用 50 μL 的洗脱体系, 以期得到更高浓度的 DNA。

基因组 DNA 提取得率和纯度

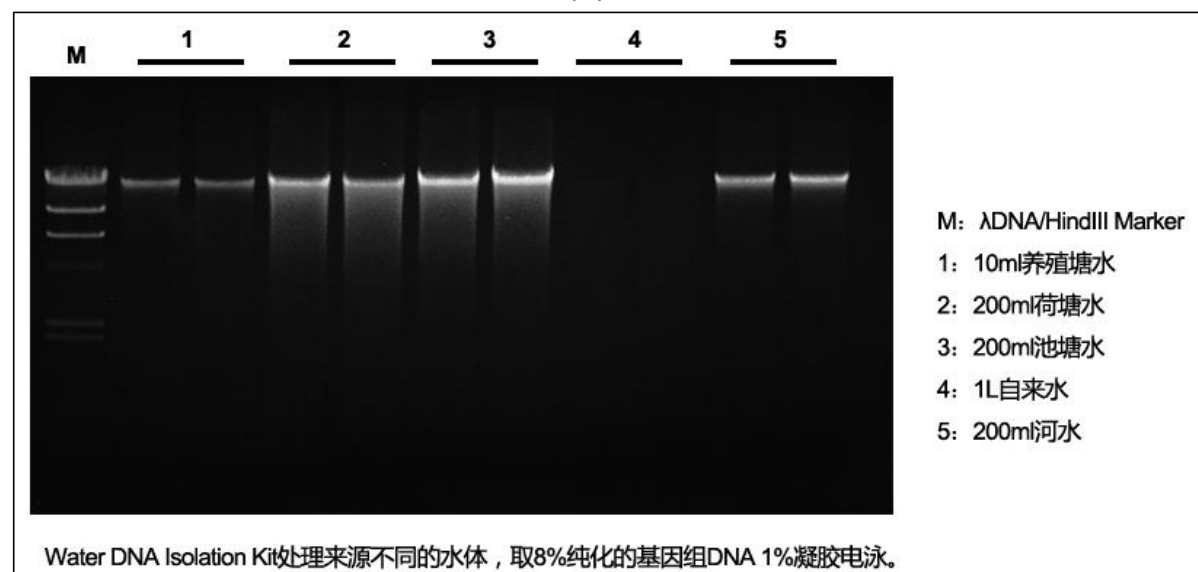
提取获得的水体基因组 DNA 量与水体样本的来源、浊度、微生物含量等因素相关。根据 Water DNA Isolation Kit 处理各种来源水体样本, 获得的基因组 DNA 量和纯度见下表:

| 水体来源 | 样本用量(ml) | DNA 产量(μg) | OD260/280 | OD260/230 |
|------|----------|-------------------------|---------------|-----------|
| 河水 | 400 | 1-2 | 1.7-1.9 | 1.7-1.9 |
| 池塘水 | 400 | 5-7 | 1.7-1.9 | 1.7-1.9 |
| 养殖塘水 | 20 | 1-2 | 1.7-1.9 | 1.8-1.9 |
| 自来水 | 4000 | 0.05-0.1 | ≈ 1.8 | 1.9-2.0 |

注意: 此表数据仅作参考, 实际操作中由于所用材料的存储条件、操作熟练度等因素影响, 所得数据会与此表数据有些许出入。

基因组 DNA 片段大小

水体基因组 DNA 提取试剂盒是采用硅胶膜柱分离纯化水体基因组 DNA, 纯化获得的基因组 DNA 片段大小均在 23 kb 附近。如图:



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 在使用前分别添加 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。

操作前准备事项

使用本试剂盒前，请务必仔细阅读说明书。水体基因组 DNA 提取试剂盒操作简单、方便、快速，说明书提供了整个试剂盒的完整信息和正确使用方法。请在使用前准备好必要的实验材料和设备。

实验材料和设备

- ◆ 各种来源的水体样本 10 mL – 30 L。
- ◆ 1.5 mL 或 2 mL 无菌离心管。
- ◆ 无水乙醇。
- ◆ 台式离心机($\geq 13,400 \times g$)、65°C 水浴或金属浴、移液器、涡旋仪等。

自备试剂

- ◆ 无水乙醇。

Lysozyme 溶液配制

使用前，Lysozyme 配制成浓度为 100 mg/mL 的溶液。Lysozyme 溶液避免反复冻融，分装成小份后于-20℃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。

| | |
|----------|-----------------------|
| DE-05613 | 分别溶于 2.5 mL Buffer TE |
|----------|-----------------------|

安全性

- ◆ 本产品仅供科研使用，请勿用于医药、临床医疗、食品及化妆品等用途。
- ◆ 使用化学品时，穿戴合适的实验服，手套，防护眼镜等。
- ◆ Buffer SG1、Buffer SG3、Buffer PW 含有胍盐：变性剂，刺激性。
- ◆ Buffer SG2 含有 SDS：刺激性，致敏性。
- ◆ Buffer WB 含无水乙醇：易燃。
- ◆ Foregene Protease：增敏剂，刺激性。

操作指南

水体基因组 DNA 提取试剂盒提供了一种快速处理水体样本，纯化基因组 DNA 的方法，请严格按照水体基因组 DNA 提取操作步骤进行相关实验。

材料取用说明

各种来源的水体样本，单次处理的水体样本不超过 30L。

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 μm 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 μL Lysozyme** (配制方法见第 9 页) 充分混匀后，37°C 摇床温浴 15 min (转速：180 rpm/min)。

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 μL Buffer SG1**，上下颠倒充分混匀，加入 **30 μL Foregene Protease**，**30 μL 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 μL 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(\sim 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(\sim 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(\sim 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(\sim 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(\sim 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(\sim 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 (\sim 13,400 \times g) 离心 1 min。

DNA 浓度及纯度检测

- ◆ 得到的基因组 DNA 的质量与操作过程中的多种因素有关。DNA 可用琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测浓度与纯度。
- ◆ DNA 的 OD260 值为 1 相当于大约 50 μ g/mL 双链 DNA。
- ◆ DNA 的 OD260/280 \approx 1.7-1.9。如果洗脱时不使用洗脱缓冲液 Buffer EB, 而使用去离子水, 比值会偏低, 因为 pH 值和离子存在会影响光吸收值, 但并不表示纯度低。

快速操作示意图

Water: 10 mL — 30 L



富集水体微生物于0.22-0.45 μm 滤膜上



剪碎滤膜 (尽量剪碎便于消化)



细菌破壁 $\left\{ \begin{array}{l} 1 \text{ mL Buffer TE} \\ 50 \mu\text{L Lysozyme} \end{array} \right\}$ 37°C ; 摇床15 min (180 rpm)



离心: 17,000 $\times g$; 3 min (弃上清液, 留样品沉淀)



样本消化 $\left\{ \begin{array}{l} 600 \mu\text{L Buffer SG1} \\ 30 \mu\text{L Foregene Protease} \\ 30 \mu\text{L Buffer SG2} \end{array} \right\}$ (65°C ; 5 min)



失活蛋白酶: 600 μL Buffer SG3 (65°C ; 5 min)



离心: 17,000 $\times g$; 3 min (去沉淀)



提供DNA特异吸附硅胶膜环境: 20 μL Buffer SG4; 280 μL 无水乙醇



吸附: 上柱吸附基因组DNA (13,400 $\times g$; 1 min)



洗涤1: 500 μL Buffer PW (13,400 $\times g$; 1 min)

去蛋白、去RNA



洗涤2: 700 μL Buffer WB 两次 (13,400 $\times g$; 1 min)

脱盐



离心: 空管离心 (13,400 $\times g$; 2 min)

去残留乙醇



洗脱: 50-200 μL Buffer EB或ddH₂O (13,400 $\times g$; 1 min)
(添加Buffer EB后室温5 min, 再离心以增加洗脱效率)

问题分析指南

以下针对水体样本基因组 DNA 提取中可能遇到的问题进行分析，希望能对您的实验有所帮助。另外，对于在操作说明和问题分析以外的其他实验或技术上的问题，我们设有专门的技术支持帮助您。如有任何需要可联系我们：028-83360257 或 E-mail: Tech@foregene.com。

低产量或无 DNA

通常有多种因素会影响基因组 DNA 产量，包括样本来源、样本保存条件、样本的预处理、操作等。

提取过程中无法获得基因组 DNA

1. 水体样品泥沙含量较大，但微生物含量较少，导致过滤过程中滤膜过早堵塞，膜上微生物较少，无法获取基因组 DNA。
建议：如果样品中含有大量泥沙，建议将样品静置一段时间后，取上层液体进行过滤。
2. 水体样品过滤体积过小或者是水体中微生物含量较少，可能导致提取不到相应的基因组 DNA。
建议：对于微生物含量较少的水体样本品，应尽量增加过滤体积，如自来水应使用 2L 以上进行过滤，进行基因组 DNA 提取操作。
3. 试剂盒保存不当或存放时间太长，导致试剂盒里面某些组分失效。
建议：购置新的水体基因组 DNA 提取试剂盒进行相关操作。
4. Buffer WB 没有添加无水乙醇。
建议：确认 Buffer WB 中添加正确体积的无水乙醇。
5. 洗脱液没有正确滴加到硅胶膜上。
建议：将 65°C 预热的洗脱液滴加到硅胶膜的正中间，并在室温放置 5 分钟增加洗脱效率。

提取获得低产量基因组 DNA

1. 水体样品泥沙含量较大，但微生物含量较少，导致过滤过程中滤膜过早堵塞，膜上微生物较少，无法获取基因组 DNA。
建议：如果样品中含有大量泥沙，建议将样品静置一段时间后，取上层液体进行过滤。
2. 水体样品过滤体积过小或者是水体中微生物含量较少，可能导致提取不到相应的基因组 DNA。

建议：对于微生物含量较少的水体样本，应尽量增加过滤体积，如自来水应使用 2L 以上进行过滤，进行基因组 DNA 提取操作。

3. 洗脱液问题。

建议：请使用 Buffer EB 进行洗脱；如果使用 ddH₂O 或其他洗脱液，确认洗脱液的 pH 值在 7-8.5 之间。

4. 洗脱液没有正确滴加。

建议：请将洗脱液滴加到硅胶膜的正中间，并在室温放置 5 分钟增加洗脱效率。

5. 洗脱液体积太少。

建议：请按说明书上要求使用洗脱液进行基因组 DNA 洗脱，最少不要低于 50 μ L。

提取获得基因组 DNA 纯度低

基因组 DNA 纯度低会导致下游实验的失败或效果不理想，如：酶切不开，PCR 得不到目的基因片段等。

1. 滤膜没有剪碎，造成裂解不完全。

建议：在裂解之前，应严格按照说明书，将滤膜尽量剪碎。一般情况下，建议只剪取 1/2 滤膜进行基因组 DNA 提取，在微生物含量非常少的情况下可使用整张滤膜进行基因组 DNA 提取。

2. 杂蛋白污染、RNA 污染。

分析：没有使用 Buffer PW 洗涤纯化柱；Buffer PW 洗涤纯化柱没有使用正确的离心转速。

建议：在上清液过柱时尽量保证上清液中无沉淀；务必按说明书进行 Buffer PW 洗涤纯化柱，并且此步骤不能省略。

3. 杂质离子污染。

分析：省略了 Buffer WB 洗涤纯化柱或者只洗涤了一次，导致残留的离子污染。

建议：务必按说明书使用 Buffer WB 洗涤 2 次，以尽量去除残留的离子。

4. RNA 酶污染。

分析：Buffer 中添加了外源的 RNA 酶；Buffer PW 洗涤操作不正确，导致 RNA 酶残留，影响下游 RNA 实验操作，如：体外转录等。

建议：Foregene 系列核酸提取试剂盒无需额外添加 RNA 酶即可去除 RNA，Water DNA Isolation Kit 里面所有试剂均无需添加 RNA 酶；务必按说明书进行 Buffer PW 洗涤纯化柱，并且此步骤不能省略。

5. 乙醇残留。

分析：Buffer WB 洗涤纯化柱后，没有进行空管离心操作。

建议：按说明书进行正确的空管离心操作。

中国·凡晶 World's Foregene

成都凡晶生物技术有限公司

电话：028-83360257, 028-83361257

E-mail: info@foregene.com

[Http://www.foregene.com](http://www.foregene.com)

