

天
净
沙
系
列

CAT#:71205-50
常温运输及保存

TIANDZ

柱式土壤 DNA_{OUT}

Column Soil DNA_{OUT}

使用手册 V1.1

北京天恩泽基因科技有限公司

北京市海淀区上地信息路 26 号北京市留学人员海淀创业园中关村创业大厦 506
网址: www.tiandz.com; 电话: 400-6765278; 电邮: order@tiandz.com

| | | | | |
|---------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------|-------------------|---------------------|
| <p>产品及特点</p> | <p>本产品是本公司土壤 DNA_{OUT} (CAT: 60701) 的柱式升级产品, 专门用于从各种土壤样品和河海沉积物中提取高质量的 DNA 的试剂。跟土壤 DNA_{OUT} 相比它具有下列特点:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 去污染效果更好, 得到的 DNA 可以直接作为 PCR 模板或酶切, 不需要再进行去腐殖酸处理。 2. 操作过程更加简单快速, 整个操作只需要 10 多分钟, 扩容性好。 3. 产量高, 每克土壤一般可以提取到 5-50 ug DNA, 片段长度在 20-50 Kb, OD_{260/280} 一般都在 1.8 以上。 4. 适合于各种土壤 (包括河海沉积物)。 | | | |
| <p>规格及成分</p> | | <p>成 份</p> | <p>编 号</p> | <p>大纸盒包装</p> |
| | | 柱式土壤 DNA _{OUT} 溶液 A | 71205a | 25 mL |
| | | 柱式土壤 DNA _{OUT} 溶液 B | 71205b | 25 mL |
| | | A 型通用上柱液 | 181001 | 40 mL |
| | | 离心吸附柱 (广口) | 60911 | 50 套 |
| | | 通用洗柱液 | 60408 | 50 mL |
| | | DNA 洗脱液 2.0 | 111205 | 10 mL |
| | | 使用手册 | 71205sc | 1 份 |
| <p>运输及保存</p> | <p>常温运输及保存, 保存期为一年。</p> | | | |
| <p>自备试剂</p> | <p>氯仿。</p> | | | |
| <p>使用方法</p> | <ol style="list-style-type: none"> 1. 65℃ 预热柱式土壤 DNA_{OUT} 溶液 A, 待其沉淀溶化后充分混匀, 取 0.5 mL 加入到 1.5 mL 塑料离心管中并放置于 65℃ 待用。 2. 称取 0.1-0.3 g 的土壤, 加入到装有预热的柱式土壤 DNA_{OUT} 溶液 A 的离心管中, 震荡器上剧烈震荡 5-10 分钟。如果是扩量操作, 可以使用更多土壤和较大离心管。也可以将同一种土壤在较大离心管中震荡处理, 然后再分到 1.5 mL 离心管中。注意: 不论使用大的还是小的离心管, 一定要让管底的土壤震荡起来。 3. 将离心管置于 65℃ 水浴中保温至少 5 分钟。 4. 12000-15000 g 室温离心 3 分钟, 将上清转移到一新离心管中(上清液一般呈淡黄色或深棕色, 实际颜色取决于腐殖酸的含量, 上清液的体积一般为 300-400 μL)。 5. 在上清液中加入等体积的柱式土壤 DNA_{OUT} 溶液 B, 上下颠倒 30 秒充分混匀, 溶液将呈白色或淡黄色混浊状。 | | | |

6. 将离心管冰浴至少 5 分钟。
7. 12000-15000 g 室温离心 3 分钟, 转移上清到新的 1.5 mL 离心管中, 上清液颜色将比第 4 步得到的上清的颜色稍淡, 体积在 0.7 mL 左右。
注意: 下面第 8-第 9 步的氯仿抽提操作可以省略, 直接进入第 10 步, 但 DNA 的产量会低 50%左右, OD260/280 在 1.7-1.8。如果直接进入第 10 步, 则转移的溶液体积不要超过 0.6 mL, 否则没有空间加 A 型通用上柱液。
8. 加入 0.2 mL 的氯仿(自备), 震荡器上充分振荡 30 秒混匀。注意:一定要让管底的溶液震荡起来。
9. 12000-15000 g 室温离心 3 分钟, 小心转移上清到新离心管中。说明: 离心后两相交界面将有白色膜状物, 其中有机相部分颜色较深, 一般呈淡棕色。上清的颜色取决于土壤中腐殖酸的含量。将上清转移到新的 1.5 mL 离心管时, 不要超过 0.6 mL, 否则没有空间加溶液 C。如果有多余的可以弃之不用。
10. 加入 1.5 倍体积的 A 型通用上柱液, 上下颠倒 30 秒混匀。
11. 分两次上柱 (即先转移一半的混合液到离心吸附柱中, 12000-15000 g 室温离心半分钟, 弃穿透液, 然后再将剩下的混合液到离心吸附柱中, 12000-15000 g 室温离心半分钟, 弃穿透液)。
12. 加 0.7 mL 通用洗柱液到离心吸附柱中, 12000-15000 g 室温离心半分钟, 弃穿透液。
13. 再加 0.3 mL 通用洗柱液到离心吸附柱中, 12000-15000 g 室温离心半分钟, 弃穿透液。增加一步洗涤能使最后得到的 DNA 的纯度稍有提高。
14. 12000-15000 g 室温再离心半分钟。此步十分重要, 否则残留的通用洗柱液会污染 DNA。
15. 将离心吸附柱转移到一新的 1.5 mL 塑料离心管中, 加入 50 μ L DNA 洗脱液 2.0。
16. 室温放置离心吸附柱 1-2 分钟。
17. 12000-15000 g 室温离心半分钟, 离心管中溶液即为提取到的 DNA 样品, 可以立即使用或存放于冰箱待用。

疑难解答

Q: 如何判断提取的 DNA 没有腐植酸污染?

A: 方法一是目测法, 即看得到的溶液是否无色。如果呈淡棕黑色或淡黄色, 说明可能是少量残留的未除尽的腐植酸。方法二是检测最大光吸收。注意: 有腐植酸污染并不表示 DNA 不能使用, 有的腐植酸并不抑制 PCR 扩增。

Q: 腐殖酸的最大吸收波长是多少?

A: 腐植酸 (humic acid) 是一大类呈棕黑色或黑色的物质, 其结构千差万别, 土壤中腐植酸的组成和特点随土壤不同而不同, 所以其最大吸收波长也各不相同, 有的土壤的腐植酸在 260 nm 有最大吸收 (见 Appl. Environ. Microbiol., 63: 4993, 1997), 有的则在 340 nm。所以用特定的波长测定 OD 值时波长的选定要根据土壤而决定。Sigma, Fluke 等公司出售的腐植酸产品成分一般比较简单, 其最大吸收波长不能推广到成分更为复杂的土壤腐植酸样品。

Q: 是否腐植酸都会抑制后续 DNA 反应?

A: 否, 因为腐植酸是一大类物质的统称, 他们的结构和特性各不相同, 所以是否对后续反应有影响最好通过实验来验证。如果用提取的 DNA 溶液原液进行反应而反应没发生, 而对照样品 (已知的不含污染的 DNA) 能够发生, 说明可能抑制作用。

Q: 如果得到的 DNA 样品还是含有抑制后续反应的腐植酸, 如何去除?

A: 如果提取的 DNA 原液不能扩增, 可以将样品稀释 10 倍和 100 倍再进行 PCR, 抑制作用一般可以解除。如果仍然抑制, 可以使用天净沙的 PCR Inhibitor Erasol (CAT#: 60804)。如果仍然不能解除, 则可以通过柱式腐植酸清除剂 (CAT#: 60801) 或先电泳, 再用超大片段胶回收试剂 Magic Gel DNA BACK (CAT#: 60706) 纯化土壤 DNA, 去除残留抑制剂。其中后两方法最有效, 得到的原液一般可以直接扩增。

Q: 在用土壤 DNA 进行细菌专一性 PCR 时, 为何没加 DNA 模版的阴性对照有扩增产物出现?

A: 这是由于使用的 Taq DNA 聚合酶一般从 *E. coli* 表达菌株中提取, 提取过程中污染了 *E. coli* 的基因组 DNA, 而使用的广谱细菌专一性引物可以识别所有细菌 DNA 基因组 DNA 模版, 所以会产生扩增。建议使用高质量的 Taq DNA 聚合酶。

关联产品

柱式腐植酸清除剂 (CAT#: 60801)