



ANBIOSCI TECH LTD



UltraClean® -htp 96 Well Microbial DNA Isolation kit

96 孔板微生物 DNA 高通量提取试剂盒

货号	提取次数
10196-4	384 次
10196-12	1152 次

简介

UltraClean® -htp 96 Well Microbial DNA Isolation Kit 专门设计用于高通量提取高质量细菌基因组 DNA。实验验证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，加入到装有研磨珠、研磨缓冲液、裂解缓冲液的 96 孔板中。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 吸附在 96 孔板离心柱的滤膜上，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。

相关产品	货号	数量
Pump	11998	1 unit
	11998-220	1 unit
96 Well Plate Shaker	11996	1 unit
	11996-220	1 unit
Plate Adapter Set	11999	1 set



ANBIOSCI TECH LTD

设备要求:

96 孔板 (13cm×8.5cm×6.0cm) 离心机 (4500g)

多道移液器 (50 μ l~650 μ l)

96 孔板振荡器

96 孔板适配器 (货号: 11990)

点震式涡旋振荡器 (MOBIO 货号#13111-V-220)

可选设备

加样槽

真空泵 (MOBIO 货号: 11998)

Vacuum Manifold (推荐使用 Axygen 的 AxyVac Vacuum Manifold, 货号: AP-VM)

保存

组分室温 (15-30℃) 保存。

试剂盒组分

	货号: 10196-4	货号: 10196-12
组分	量	量
Bead Plates	4	12
MicroBead Solution	127 ml	381 ml
Solution MD1	26 ml	78 ml
Solution MD2	43 ml	129 ml
Solution MD3	340 ml	1020 ml
Solution MD4	12 x 30 ml	36 x 30 ml
Solution MD5	43 ml	129 ml
Spin Plates	4	12
2 ml Collection Plates	12	36
1 ml Collection Plates	4	12
0.5 ml Collection Plates	4	12
Microplates	4	12
Centrifuge Tape	24	72
Sealing Tape	4	12
Round Well Mats	8	24

△实验前请先逐一检查试剂!

实验开始前注意: Solution MD3 使用前先摇匀。

操作步骤

抽真空过滤及离心



ANBIOSCI TECH LTD

本操作说明假设你将一次提取 192 个样 (2×96 孔)。若你打算提取的样品数少于 192 个, 请把样品平分到两块板的对应位置, 以保持平衡。

- 1、每孔加 1.8ml 过夜孵育的菌液 (细菌或酵母) 到 2ml Collection Plate (试剂盒提供) 中, 盖上 Sealing Tape, 室温下 4500g 离心 12min。
 - 2、弃去 Sealing Tape, 吸掉所有上清。
 - 3、每孔加入 300 μ l **MicroBead Solution**, 盖上一片新的 Sealing Tape。轻轻涡旋重悬细胞团。揭开并丢弃 Bead Plate 上的 Round Well Mat, 把重悬的细胞转移到 **Bead Plate** 中。
 - 4、使用前**检查 MD1 溶液**。若出现沉淀, 60°C 水浴直至重溶。
 - 5、每孔加入 60 μ l **MD1 溶液**, 用一片新的 Round Well Plate Mat (试剂盒提供) 盖好 Bead Plate。
 - 6、把盖有 Round Well Plate Mat 的 Bead Plate 牢靠地固定在 96 Well Plate Shaker 上。
 - 7、速度 20 振荡 5min, 取下 96 孔板换个方向安装, 使之前最靠近机器的一端现在远离机器, 速度 20 再次振 5 min。
 - 8、4500g 离心 6min。
 - 9、揭掉并丢弃 Round Well Mat。转移上清到一个干净的 1ml Collection Plate (试剂盒提供) 中。
 - 10、注意: 上清中可能仍然含有少量研磨珠。
 - 11、每孔加 100 μ l Solution MD2, 盖上一片 Sealing Tape。涡旋 5s 混匀。4°C 孵育 10min。
 - 12、4500g 离心 9min。
 - 13、避开沉淀, 可转移上清到一个 2ml Collection Plate (试剂盒提供) 中。
 - 14、取下 Vacuum Manifold 的顶盖, 放一个新的 2ml Collection Plate 到 Vacuum Manifold 的底部。把顶盖放回到 Vacuum Manifold 上。把 Spin Plate 放到 Manifold 的顶部。打开真空泵。
- 注意:** 若使用的是 Axygen 的 AP-VM, 请使用 Manifold 自带的废液缸替代 2ml Collection Plate。
- 15、为了提高移液效率, 使用多通道移液器一次转移 8 个样品的溶液。
 - 16、Solution MD3 使用前先摇匀, 每个装有上清液的深孔中加入 800 μ l 的 Solution MD3。
 - 17、上下吹打数次混匀。
 - 18、加载 Collection Plate 的上清 650 μ l 到 Spin Plate 的第一排上, 抽真空。待上清全过滤完, 再加载 650 μ l。至此, Collection Plate 上 8 个孔的上清过滤完毕。重复动作, 直至过滤完所有样品。关闭真空泵。
 - 19、取下 Spin Plate 放一旁, 丢弃滤液。2ml Collection Plate 或废液缸放回原位。关闭真空泵。
 - 20、往 Spin Filter 的每孔中加入 **400 μ l Solution MD4**。
 - 21、等第一轮 400 μ l Solution MD4 全部过滤完了以后, 在加 **400 μ l Solution MD4**。
 - 22、等所有 Solution MD4 过滤完, 关闭真空泵。
 - 23、盖一片 Centrifuge Tape 在 Spin Filter 上, 低下放一块 0.5ml Collection Plate。



ANBIOSCI TECH LTD

- 24、4500g 离心 6min。小心把 Spin Filter 转移到一块 MicroPlate 上，不要沾到任何 Solution MD4。
- 25、弃去滤液，和 0.5ml Collection Plate。
- 26、揭掉并丢弃 Centrifuge Tape。
- 27、室温中风干 10min。
- 28、每孔加入 100 μ l Solution MD5 到 Spin Plate 的滤膜中心。
- 29、给 Spin Filter 加盖一片 Centrifuge Tape。
- 30、4500g 离心 3min。
- 31、用一片 Round Well Mat 盖好 MicroPlate。
- 32、此时，MicroPlate 中的 DNA 可直接使用，无需进一步处理。

我们建议 DNA-20 $^{\circ}$ C 冷冻保存。Solution MD5 不含有 EDTA。

感谢选用 UltraClean[®] -htp 96 Well Microbial DNA Isolation Kit。

全称离心

本操作说明假设你将一次提取 192 个样 (2 $\times$ 96 孔)。若你打算提取的样品数少于 192 个，请把样品平分到两块板的对应位置，以保持平衡。

- 1、每孔加 1.8ml 过夜孵育的菌液 (细菌或酵母) 到 2ml Collection Plate (试剂盒提供) 中，盖上 Sealing Tape，室温下 4500g 离心 12min。
- 2、弃去 Sealing Tape，吸掉所有上清。
- 3、每孔加入 300 μ l **MicroBead Solution**，盖上一片新的 Sealing Tape。轻轻涡旋重悬细胞团。揭开并丢弃 Bead Plate 上的 Round Well Mat，把重悬的细胞转移到 **Bead Plate** 中。
- 4、使用前**检查 MD1 溶液**。若出现沉淀，60 $^{\circ}$ C 水浴直至重溶。
- 5、每孔加入 60 μ l **MD1 溶液**，用一片新的 Round Well Plate Mat (试剂盒提供) 盖好 Bead Plate。
- 6、把盖有 Round Well Plate Mat 的 Bead Plate 牢靠地固定在 96 Well Plate Shaker 上。
- 7、速度 20 振荡 5min，取下 96 孔板换个方向安装，使之前最靠近机器的一端现在远离机器，速度 20 再次振 5 min。
- 8、4500g 离心 6min。
- 9、揭掉并丢弃 Round Well Mat。转移上清到一个干净的 1ml Collection Plate (试剂盒提供) 中。
- 10、注意：上清中可能仍然含有少量研磨珠。



ANBIOSCI TECH LTD

- 11、每孔加 100 μ l Solution MD2，盖上一片 Sealing Tape。涡旋 5s 混匀。4℃孵育 10min。
- 12、4500g 离心 9min。
- 13、避开沉淀，可转移上清到一个 2ml Collection Plate（试剂盒提供）中。
- 14、Solution MD3 使用前先摇匀，每个装有上清液的深孔中加入 800 μ l 的 Solution MD3。
- 15、上下吹打数次混匀。
- 16、把 Spin Filter 放到一个新的 0.5ml Collection Plate（试剂盒提供）上。
- 17、加载 650 μ l 上清液到 Spin Plate 上，盖上 Centrifuge Tape。
- 18、4500g 离心 3min。
- 19、弃去滤液，把 0.5ml Collection Plate 放回到 Spin Plate 的底部，弃去 Centrifuge Tape。
- 20、重复步骤 17-19，直至过滤完所有的上清。
- 21、往 Spin Plate 每孔加入 400 μ l Solution MD4，盖上 Centrifuge Tape，4500g 离心 3min。
- 22、弃去 Centrifuge Tape 和滤液。把 Spin Plate 放回到同一个 0.5ml Collection Plate 上。再加一轮 400 μ l Solution MD4。盖上一片行的 Centrifuge Tape。4500g 离心 3min。
- 23、弃去 Centrifuge Tape 和滤液。把 Spin Plate 放回到同一个 0.5ml Collection Plate 上。
- 24、4500g 离心 6min。小心把 Spin Filter 转移到一块 MicroPlate 上，不要沾到任何 Solution MD4。
- 25、弃去滤液，和 0.5ml Collection Plate。
- 26、揭掉并丢弃 Centrifuge Tape。
- 27、室温中风干 10min。
- 28、每孔加入 100 μ l Solution MD5 到 Spin Plate 的滤膜中心。
- 29、给 Spin Filter 加盖一片 Centrifuge Tape。
- 30、4500g 离心 3min。
- 31、用一片 Round Well Mat 盖好 MicroPlate。
- 32、此时，MicroPlate 中的 DNA 可直接使用，无需进一步处理。

我们建议 DNA-20℃ 冷冻保存。Solution MD5 不含有 EDTA。

感谢选用 UltraClean® -htp 96 Well Microbial DNA Isolation Kit。



ANBIOSCI TECH LTD

疑难点

一次提取少于 192 个样品（少于两块满板）

本说明书假设你一次处理 192 个样（2×96 孔样）。若一次处理的样品量少于 192 个，请把样品平分到两块板中。

样品平分给两块板：

平衡两块板的样品数，保护离心机不受损坏。两板的样品数量及样品放置位置最好一致。即若其中一块板 A1-A12 加样，另一块板也在同样位置加样。

多通道移液器：

为达到最高效率，推荐使用多通道移液器。大多数多通道移液器为 8 或 12 通道。最好选择宽移液体积范围的多通道移液器。（移液体积要求 50 μ l-650 μ l）。

加样槽：

建议使用加样槽提高移液效率。

标记已使用的孔：

切记标记已使用的孔，以免重复使用造成交叉污染。

抽真空提示

若抽真空时间变长，请关闭真空泵。撤掉 Filter Plate，释放压力。把 Filter Plate 放回，确保没有漏气。若抽真空时间仍偏长，你可用离心法替代。

离心机的最大离心速度小于 4500g

将离心时间和离心速度相乘，得到总 g 数。再用总 g 数除以你离心机的最大离心速度。得到试用你的离心机获得同样离心力所需要的时间。

例：4500g 离心 10min=45000。

若你的离心机最大速度只能达到 2500g，用 $45000 \div 2500 = 18\text{min}$ 离心时间。

电泳上样 DNA 溢出

你可能不小心带入了 Solution MD4 到最终 DNA 样品中。酒精浓缩是除去残余乙醇的最佳办法。

DNA 保存

洗脱到 Solution MD5（10mM Tris）中的 DNA 必须 -20℃ 保存，否则可能会降解。DNA 也可以用 TE-4（10mM Tris，0.1mMEDTA，货号 17320-1000）洗脱为更长时间保存而不影响后续酶反应。

难裂解细胞

若微生物细胞较难裂解，可以在加入 Solution MD1 后 70℃ 孵育 10min。接着步骤 5 继续。

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