



PowerBiofilm™ DNA Isolation kit

强力生物薄膜 DNA 提取试剂盒

货号	提取次数
24000-50	50 次

简介

PowerBiofilm™ DNA Isolation kit 专门设计用于高质量地提取所有类型包括微生物垫在内生物薄膜的基因组 DNA。创新的研磨珠混搭套管以及增强型裂解缓冲液可溶解多糖类，释放出所有类型复杂生物薄膜中的微生物。研磨珠混搭套管可适用于我们的涡旋仪适配器或其它大型强力珠磨研磨设备。专利的抑制因子去除技术，可获得纯净的 DNA 直接用于下游实验。

操作预览

加入 0.05-0.2g 样品到 PowerBiofilm™ Bead Tube 中，加热激活裂解缓冲液组分，帮助溶解样品中的多糖。在用涡旋仪或其它大型强力珠磨研磨设备进行样品均质化。蛋白、多糖多酚等抑制因子被沉淀下来去除掉。总基因组 DNA 吸附到离心柱滤膜上，经过冲洗回收得到最终 DNA。此时 DNA 可直接用于下游实验。

机械裂解选项

PowerBiofilm™ DNA Isolation Kit 可以搭配普通涡旋仪或大型强力珠磨研磨机如 PowerLyzer™ 24 使用。PowerLyzer™ 24 可快速研磨均质包括微生物垫在内的所有生物薄膜样品。



PowerLyzer™ 24

Bench Top Bead-Based Homogenizer

货号: 13155

(<http://www.anbiosci.com/products/13155.htm>)

搭配 PowerLyzer™ Homogenizer 使用 PowerBiofilm™ DNA Isolation Kit

PowerLyzer™ 24 是一个高效的珠磨研磨系统，用于生物薄膜 DNA 处理可获得最佳 DNA 提取效果。该仪器的强劲马达能最快速度均质化样品，大幅缩短样品处理时间。处理程序直观显示，自动化处理。每次均质化最多可设 10 个循环，每个循环最长 5min。试剂盒使用的是玻璃研磨珠和石榴石研磨珠混搭，对于生物薄膜样品可获得最好的 DNA 提取效果。



搭配其它均质器使用 PowerBiofilm™ DNA Isolation Kit

要搭配 FastPrep®或 Precellys®提取 DNA，以下依照以下表格换算。另外，PowerLyzer™ 24 的强劲马达带来更高的珠磨效果。比其它研磨机用更少的循环次数和时间可获得更好的结果。

建议

用 PowerLyzer™ 24 提取生物薄膜 DNA，可把速度设为 3200RPM，1 个 30s 循环。

PowerLyzer 24	FastPrep 24m/s	Precellys 24
500	-	-
600	-	-
700	-	-
800	-	-
900	-	-
1000	-	-
1100	-	-
1200	-	-
1300	-	-
1400	-	-
1500	-	-
1600	-	-
1700	-	-
1800	-	-
1900	-	-
2000	-	-
2100	-	-
2200	-	-
2300	-	-
2400	-	-
2500	4	5000
2600	-	5200
2700	-	5400
2800	4.5	5600
2900	-	5800
3000	-	6000
3100	5	6200
3200	-	6400
3300	-	6600
3400	5.5	6800
3500	-	-
3600	-	-
3700	6	-
3800	-	-
3900	-	-



ANBIOSCI TECH LTD

4000	6.5	-
4100	-	-
4200	-	-
4300	-	-
4400	-	-
4500	-	-
4600	-	-
4700	-	-
4800	-	-
4900	-	-
5000	-	-

PowerLyzer™ 24 上低于 2500RPM 和高于 4000RPM 的设置在 FastPrep®和 Precellys®上不可用。

相关产品	货号	数量
Vortex Adapter for Vortex Genie® 2	13000-V1	Hold 12 (2ml) Tubes
	13000-V1-24	Hold 24 (2ml) Tubes
Vortex Genie® 2 Vortex	13111-V-220	1 unit(220V)
PowerLyzer™ 24 Bench Top Bead-Based Homogenizer	13155	1 unit
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
PowerBiofilm™ RNA Isolation Kit	25000-20	20 Preps
	25000-50	50 Preps

设备要求:

微型离心机 (13000g)

移液器 (100 μl~1000 μl)

生物薄膜样品研磨均质提取 DNA

根据样品类型选择所需仪器

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 或 13000-V1-24)

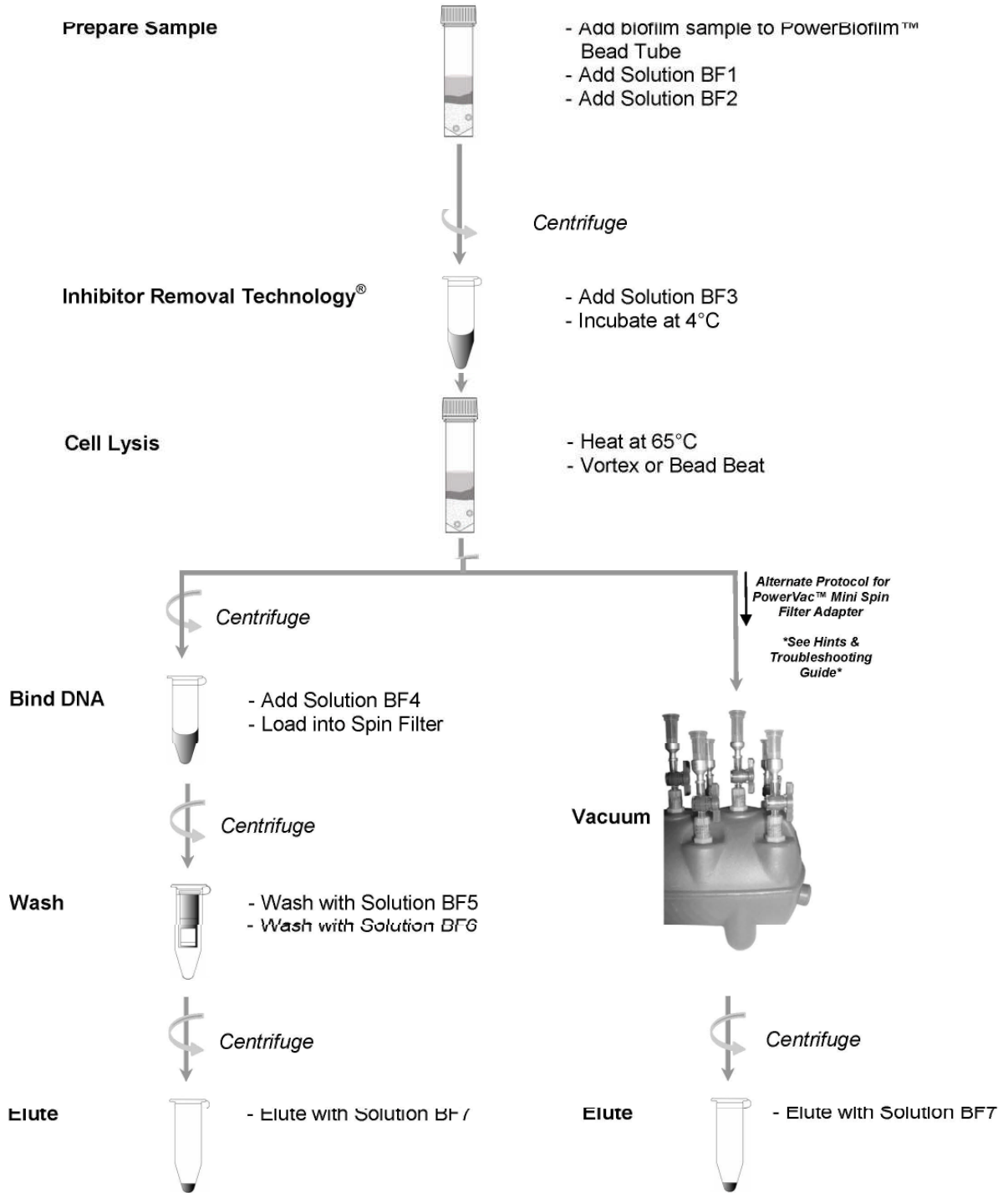
PowerLyzer™ 24 Bench Top Bead-Based Homogenizer (MO BIO 货号 13155)

保存

组分室温 (15-30℃) 保存。



PowerBiofilm™ DNA Isolation Kit





试剂盒组分

组分	量
PowerBiofilm™ Bead Tubes	50
Solution BF1	20ml
Solution BF2	6ml
Solution BF3	11ml
Solution BF4	50ml
Solution BF5	2×18ml
Solution BF6	2×18ml
Solution BF7	5.5ml
Spin Filter	50
2ml Collection Tubes	250

△实验前请先逐一检查试剂!

实验开始前重要提示

BF1 溶液每次使用前需要 55℃水浴 5-10min 充分溶解沉淀，可趁热使用。

BF4 溶液也可能会发生沉淀。可 55℃水浴 5-10min 重新溶解，可趁热使用。

BF5 溶液使用前先摇匀。

只能使用试剂盒自带的研磨珠套管 PowerBiofilm™ Bead Tubes。

操作步骤

BF1 溶液使用前 55℃水浴 5-10min。可趁热使用。检测 BF4 若有沉淀，55℃水浴 5-10min。可趁热使用。只能使用试剂盒自带的研磨珠套管 PowerBiofilm™ Bead Tubes。

1、称取 0.05-0.2g 生物薄膜样品到 2ml Collection Tube（试剂盒提供）中。13000g 离心 1min。去除游离水分。若样品水分含量不高，如微生物垫，可直接放入 PowerBiofilm™ Bead Tube 中(更多关于加样量的信息，请浏览下文疑难点)。

注意：只能使用试剂盒自带的研磨珠套管 PowerBiofilm™ Bead Tubes。

这一步发生了什么：生物薄膜样品含水量不定。必须尽可能除去游离水分，以免稀释裂解缓冲液降低 DNA 得率。有些生物薄膜样品，如微生物垫含水少，可不经离心直接放入研磨管内。

2、加入 **350 μl Solution BF1** 重悬生物薄膜样品，转移到 PowerBiofilm™ Bead Tube 中。水分含量较少的样品，可直接加入 **350 μl Solution BF1** 到 PowerBiofilm™ Bead Tube 中。

注意：BF1 溶液使用前必须先水浴溶解沉淀。可趁热使用。

这一步发生了什么：BF1 溶液为抑制因子去除技术（Inhibitor Removal Technology®）的一部分。是种强力裂解试剂可帮助破开细胞壁，稳定和保护 DNA 不被降解。冷却时容易在平底产生白色沉淀。55℃水浴可重新溶解



沉淀，可很热使用。

3、加入 100 μ l Solution BF2。涡旋混匀。

这一步发生了什么：BF2 溶液含有高离序液盐辅助裂解细胞，同时能稳定和保护 DNA 完整性。

4、PowerBiofilm™ Bead Tube 65°C 孵育 5min。

这一步发生了什么：加热可加强裂解缓冲液降解胞外多聚合物 EPS。

5、根据实验室条件选用以下一种珠磨研磨法：

a) PowerLyzer™ 24 Homogenizer

1) 在 PowerBiofilm™ Bead Tubes 的帽子和侧面均做标记。

注意：PowerLyzer™ 强劲的马达有可能会模糊掉顶帽上的标记，因此建议同时做顶帽和侧面标记。

2) 把 Powerbiofilm™ Bead Tubes 放入到 PowerLyzer™ 24 的 Tube Holder 中。对侧 Bead Tubes 要配平。3200RPM 均质 30s。

3) 13000g 离心 1min。把上清转移到一个新的 2ml Collection Tube（试剂盒提供）中。

注意：根据样品类型约可获得 325-400 μ l 上清。若上清液体积少于此范围，请减少加样量。

b) 涡旋仪适配器

1) 把 PowerBiofilm™ Bead Tubes 安放在 MOBIO 的水平涡旋仪适配器（货号 13000-V1 或 13000-V1-24）上，最大转速连续涡旋振荡 10min。

注意：若使用 24 孔涡旋仪适配器，一次处理多于 12 个样品，涡旋时间增加 5-10min。

2) 室温 13000g 离心 1min。把上清转移到一个新的 2ml Collection Tube（试剂盒提供）中。

注意：根据样品类型约可获得 400-450 μ l 上清。若上清液体积少于此范围，请减少加样量。

这一步发生了什么：在化学力（裂解缓冲液）和物理力（珠磨研磨）共同作用下生物薄膜基质分散开，微生物细胞裂解。

6、加入 100 μ l BF3 溶液，涡旋混匀。4°C 孵育 5min。

注意：若上清颜色很深，含有大量腐植酸等 PCR 抑制物，BF3 可加到 200 μ l。见疑难点“DNA 扩增失败”。

这一步发生了什么：BF3 溶液为抑制因子去除技术（Inhibitor Removal Technology®）的一部分，第二个试剂进一步去除包括腐植酸、细胞碎片、多糖、多酚、蛋白等非 DNA 有机和无机物质。该系统原理是通过改变 pH 值沉淀无法进一步分解的大分子物质。核酸不会被沉淀，反而变得更干净。必须去除所有有机、无机非 DNA 物质，保证 DNA 纯度，以免抑制下游 DNA 实验。

7、室温 13000g 离心 1min。

8、避开沉淀，转移所有上清液到一个新的 2ml Collection Tube（试剂盒提供）中。

注意：根据样品类型，约可获得 375-450 μ l 上清液。



这一步发生了什么：沉淀中含有非 DNA 有机、无机物质。为获得最佳的 DNA 得率和质量，避免吸到沉淀物。

9、加入 900 μ l Solution BF4，涡旋混匀。

注意：使用前先检查 BF4 溶液，若有沉淀可 55℃水浴 5-10min。可趁热使用。

这一步发生了什么：BF4 是高浓度盐溶液。DNA 在高浓度盐环境下会选择性地吸附到离心柱硅胶滤膜上，非 DNA 的有机和无机物质不会被吸附，但仍然会有少量残留在离心柱上。

10、加载 650 μ l 上清液到 Spin Filter 中，13000g 离心 1min。再次加载并离心，直至过滤完所有上清液。

注意：至少需要加载 2 次上清液。根据 BF3 使用量，最多需要加载 3 次。

这一步发生了什么：DNA 选择性地吸附在离心柱硅胶滤膜上，滤液不含 DNA。

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

这一步发生了什么：把离心柱转移到新的 Tube 管中等待进一步冲洗。

12、Solution BF5 使用前先摇匀。加载 650 μ l Solution BF5，13000g 离心 1min。

这一步发生了什么：BF5 溶液是含酒精的冲洗缓冲液，可进一步清理硅胶滤膜上的 DNA。冲洗液吸掉滤膜上残留的盐和其它杂质，DNA 仍在硅胶滤膜上。

13、弃去滤液，加入 650 μ l Solution BF6，13000g 离心 1min。

这一步发生了什么：BF6 溶液可保证完全去除 BF5 溶液，使得 DNA 纯度和得率更高。

14、弃去滤液，13000g 再离心 2min。

这一步发生了什么：再次离心去除 BF6 溶液。必须完全去除 BF6 溶液，以免影响 DNA 下游实验。

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

16、加入 100 μ l Solution BF7 到离心柱滤膜中央。

注意：若 BF7 使用量少于 50 μ l 时，DNA 回收率会显著降低。建议使用 100 μ l。

这一步发生了什么：把 BF7 溶液（灭活洗脱缓冲液）加到白色滤膜中心，润湿整个滤膜，可获得最大的 DNA 洗脱效率。当 BF7 离心通过滤膜时，高盐浓度环境吸附到滤膜上的 DNA 在低盐环境（10mM Tris）下被洗脱下来。

17、13000g 离心 1min。

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

建议 DNA-20℃保存。Solution BF7 不含 EDTA。

感谢选择使用 PowerBiofilm™ DNA Isolation kit!



疑难点

加样量

本试剂盒设计每次提取 0.05-0.2g 生物薄膜或微生物垫样品。实际加样量要根据生物薄膜类型和微生物丰度决定。若步骤 5 获得的上清液少于范围值，DNA 得率会下降，建议减少加样量。通常建议加样量为 0.1-0.15g。不同样品预期得率见“DNA 预期得率”部分。

忘记加热 BF1 溶液

若 BF1 溶液使用前忘记加热，然后进行提取操作。你仍然能获得 DNA，但 DNA 得率会有所下降。

DNA 预期得率

不同生物薄膜类型 DNA 得率会不一样。某些类型生物薄膜不同结构部分的得率也会有变化。下表 DNA 得率仅供参考。因生物薄膜种类繁多，得率可能会比下面例子的低。

生物薄膜类型	加样量 (g)	DNA 得率 (μg/μl)
下水管道	0.20	94-198
泻湖岩石表面	0.15	100-150
光营养生物薄膜 (微生物垫)	0.15	54-130
	0.10	70-76
	0.05	37-50
溪流岩石表面	<0.05	4-11
生物反应器	0.25	56-130
Button Thrombolites (微生物垫)	0.25	1-15
石膏结壳	0.20	15-28

DNA 得率偏低或没有 DNA

加样太多、珠磨研磨时间太长或使用非 PowerBiofilm™ Bead Tubes 以外的研磨珠套管都有可能得率严重下降。为了避免样品损失：

- 不要超量加样 (0.05-0.20g)。
- 减少强力珠磨研磨机均质样品时间。对于大部分生物薄膜，30s 是最合适的。微生物垫类难提的样品需要更长的研磨时间，用户需要通过实验确定。使用涡旋仪适配器，只有 24 孔适配器一次提取超过 12 个样品是，才需要增加涡旋时间 5-10min。
- 只能使用试剂盒自带的研磨珠套管 PowerBiofilm™ Bead Tubes。PowerBiofilm™ Bead Tubes 有独特设计用于本试剂盒。



DNA 扩增失败或扩增效率下降

生物薄膜含有大量腐植酸等杂质会影响 DNA 纯度，抑制下游 PCR 实验。对这类样品，步骤 6 中增加 BF3 使用量到 200 μ l。

凝胶电泳点样时 DNA 移溢出

可能最终 DNA 溶液中有 BF6 冲洗缓冲液残留。使用 BF6 冲洗完滤膜后，把离心柱转移到一个干净的 2ml Collection Tube 中再离心一次。

- 酒精浓缩是去除残留 BF6 溶液的最好办法（见下文“DNA 浓缩”）。
- 若生活在潮湿地区，风干离心柱滤膜比较困难。可在步骤 17 增加 1min 离心时间知道滤膜上没有可见水迹。

A260/230 值偏低

A260/230 读数能一定程度反映 DNA 的纯度。但低微生物丰度的样品较低 DNA 得率 ($<20\text{ng}/\mu\text{l}$) 也会导致比值低于 1.5。此比值并不是扩增性能或 DNA 完整性的指标。酒精法把 DNA 溶液浓缩到较小体积可以改善 A260/230 比值。

DNA 浓缩

最终 DNA 溶液体积为 100 μ l。若其浓度对你的下游实验来说太稀，可加入 5 μ l 3M 醋酸混匀。再加入 2 倍体积的 100%冷乙醇，混匀。-70 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 15min，或 -20 $^{\circ}\text{C}$ 2h~过夜孵育。4 $^{\circ}\text{C}$ 13000g 离心 10-15min。弃去液体，用真空离心蒸发器、干燥器或冷干机除去残余乙醇。避免使沉淀物过于干燥，否则重悬困难。加入适当体积 10mM Tris (BF7 溶液) 重悬 DNA。

DNA 保存

洗脱到 BF7 溶液 (10mM Tris) 的 DNA 必须保存在 -20 $^{\circ}\text{C}$ ~-80 $^{\circ}\text{C}$ 防止降解。为了延长保存时间，建议把 DNA 等分后 -80 $^{\circ}\text{C}$ 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>