

D3350 Bacterial DNA Kit

细菌 DNA 提取 常见问题及排查方法

1. 实验前检查溶液是否有沉淀物析出，久置或低温都会让溶液析出沉淀，如有沉淀析出，需按照说明书指示：在 37°C 水浴并轻轻摇动至沉淀完全溶解。
2. 实验前，DNA Wash Buffer 必须按照说明书加入【无水乙醇】稀释备用。请开盖闻气味确认已加入醇类稀释。稀释错误或未稀释会导致 DNA 无法挂柱结合，致提取失败。
3. 实验前，HBC Buffer 必须按照说明书加入【异丙醇】稀释备用。请开盖闻气味确认已加入醇类稀释。稀释错误或未稀释会导致 DNA 无法挂柱结合，致提取失败。
4. 一般情况下，一次用量不建议使用超过 3mL 的菌液量或超过 1×10^9 个细胞，超过这个用量，可能会导致裂解不彻底，容易造成堵柱子，使提取失败。
5. 需根据提取菌株的类型适当延长 Lysozyme 的加入后的孵育时间至 30min，确保菌株细胞壁完全裂解。
6. 对于较难裂解的细菌（如：革兰氏阳性细菌），需按照试剂盒说明书中的选做步骤，加入 25mg glass beads 进行涡旋，有助于充分裂解。
7. 对于有些裂解困难的样品，可能需在加入正确体积的 BTL Buffer 后，将在 55°C 孵育的时间延长至 1h，若裂解不充分，可能会出现堵柱子，导致提取失败。
8. 如样品 RNA 丰度较大，加入 RNase 后仍无法完全消解，可酌量增加 RNase 的单次使用量（增加至 10 μ l）或使用更高浓度的 RNase 试剂（如提高至 50mg/mL）。
9. 对于购买时间比较久，或长时间暴露在空气中的柱子，可在使用之前将柱子重新活化，活化步骤：将一个新的柱子套入到 2mL 收集管中，加入 100 μ l 3M NaOH，10,000xg 离心 30s，再向柱子中加入 100 μ l 无酶水，10,000xg 离心 30s，弃滤液。注意：经过该处理的柱子，可在室温下放置 1-2 周。
10. 将混合液转移到 HiBind[®] DNA Mini Column 前，必须按照说明书加入无水乙醇混匀，正确调节 DNA 与柱子的结合条件。如没有加入乙醇，DNA 将被全部冲掉，致提取失败。
11. 注意不要省略空柱子离心步骤，该步骤能除去柱子中残留的乙醇，否则可能会影响下游实验。如产物点电泳时无法正常沉降，绝大部分情况下由于空甩不完全，乙醇残留所致，在下次提取中，提高离心机速度或延长空甩时间至 5~10min，可解决残留问题。
12. 如产物浓度偏低，建议按照说明书，可先将 Elution Buffer 在 65°C 预热后再加入柱子中洗脱，且建议进行第二次洗脱。洗脱方法：将第一次洗脱的 Elution Buffer 重新吸回 HiBind[®] DNA Column，室温等待 2-3min，再次离心。

如按照上述步骤仍无法排查问题，请提供单位名称及试剂盒条形码（即盒外标签 Lot 开头数字字母组合）核验正品货源，添加技术支持 QQ: 800848200 获取更多信息。