

土壤吸附剂质检报告

检测吸附剂中细菌-真菌在 PCR 扩增的含量

实验步骤:

取 1ml 吸附剂, 离心后, 取 500ul 上清直接用于提取, 按方案 A 进行操作。取沉淀直接用于提取, 按方案 B 进行操作。

1. 上清提取方案 A: 取 500ul 上清液, 加入 500ul Buffer DL 和 20ul PK, 70 度处理 15min。加入 500ul 乙醇过柱, GW1 清洗一次, GW2 清洗两次, 空甩 5min, 用 30ul EB 进行洗脱。
2. 沉淀提取方案 B: 加入 500ul Buffer ATL 和 20ul Proteinase K, 55 度 20 分钟, 90 度 20 分钟。加入 500ul Buffer DL 和 20ul PK, 加入 500ul 乙醇过柱, GW1 清洗一次, GW2 清洗两次, 空甩 5min, 用 30ul EB 进行洗脱。
3. 提取后, 用 Nanodrop 测量浓度。用 16S 进行细菌扩增(30Cycles)。用 ITS 进行扩增真菌(30Cycles)。

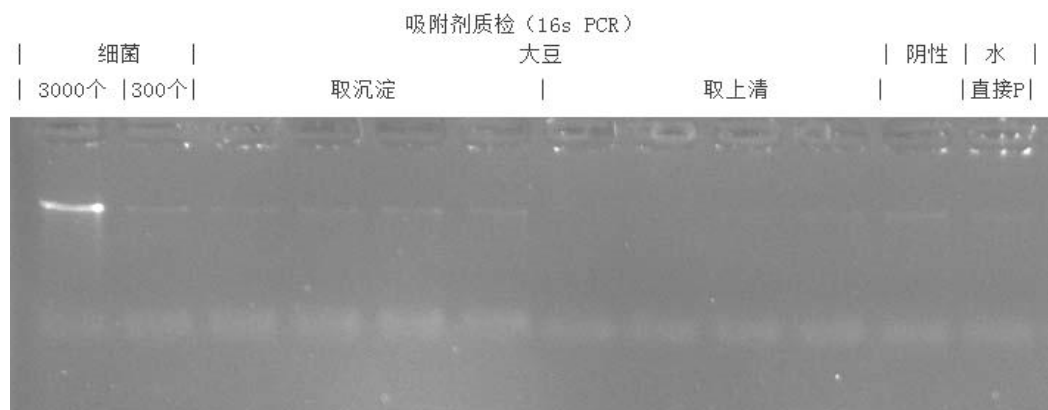
进行 16S 扩增时, 用 3000, 300 大肠杆菌作为阳性参考, 上清(重复)、沉淀(重复)、阴性对照。

进行 18S 扩增时, 用 1ng,0.1ng 植物 DNA 作为阳性参才, 上清(重复)、沉淀(重复)、阴性对照。

OD 值数据:

A260/230	A260/280	Result(ng/ul)	条件	PCR 体积	产量 (ng)	
0.13	0.72	-0.01359215	植物 DNA 1ng	10ul	-0.13592154	
0.10	0.70	-0.00952831	植物 DNA 0.1ng		-0.09528311	
0.12	0.35	-0.00547472	牛奶沉淀		-0.05474717	
-0.02	-0.08	0.00036540			0.00365399	
-0.14	0.09	-0.00086203	大豆过滤法沉淀		-0.00862025	
2.50	0.80	-0.00886406			-0.08864064	
0.06	0.58	0.00123800	大豆离心法沉淀		0.01237998	
0.71	0.41	-0.00587853			-0.05878534	
0.08	0.21	-0.00188459	牛奶上清		-0.01884593	
0.17	0.42	-0.00677584			-0.06775839	
0.03	0.14	-0.00106248	大豆过滤法上清		-0.01062483	
-0.07	0.25	-0.00280406			-0.02804059	
-0.07	-0.16	0.00152405	大豆离心法上清		0.01524052	
0.33	0.81	-0.01873229			-0.18732291	
0.12	0.54	-0.00678896	阴性		-0.06788960	
-0.32	-0.72	0.00676593			0.06765928	
0.10	0.40	-0.00715580	3000 个菌			
0.25	0.76	-0.02583787	300 个菌			

电泳图数据:



结论: 从 OD 值看, 处理过后的 大豆吸附剂上清与沉淀, 基本检测不出浓度。
在 PCR 扩增中, 16sPCR 中, 大豆吸附剂上清与沉淀, 基本扩增亮度弱于 300 个细菌的亮度, 与阴性扩增相当, 16S PCR 扩增出现少量的条带, 是因为 Taq Mastermix 自身带有细菌 DNA 片段。

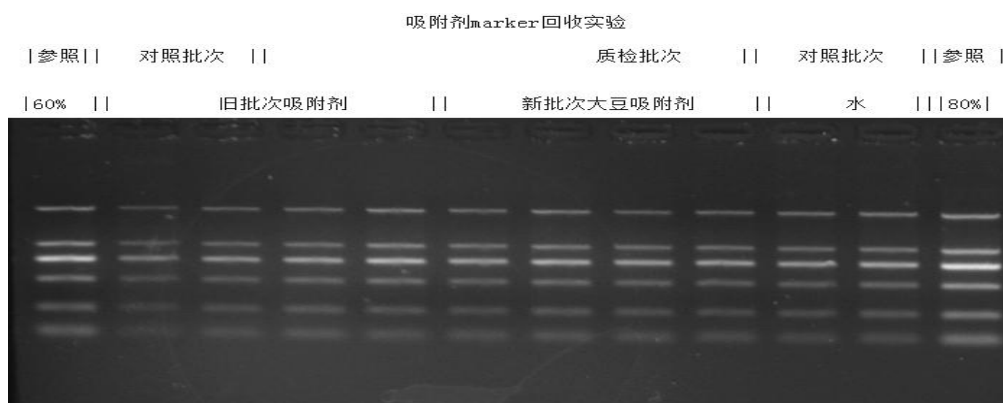
在 ITS PCR, 大豆吸附剂上清与沉淀, 无扩增条带。

2、质检吸附剂核酸酶残留实验

实验步骤：

1. 取 10ul DNA Maker，稀释至 50ul，加入 350ul Buffer SOL 和 100ul Buffer PS，涡旋混匀。添加 150ul 吸附剂（旧吸附剂，新批次大豆吸附剂）或 100ul 水(对照)，涡旋混匀。室温放置 15 分钟，颠倒混匀几次。
2. 离心得上清液，加入等体积的 GDP 过柱。300ulGDP 清洗一次，600ulGW2 清洗两次。
3. 最后用 20ul Elution Buffer 洗脱。电泳进行检测。

电泳图数据：



结论：新吸附剂与旧吸附剂在回收 marker 实验中提取效果基本一致，均无核酸降解现象。

3: 吸附剂质检项目三{土壤提取效果}

0.5g 土壤实验步骤:

取 10g 土壤+适量玻璃粉+3~4 颗陶瓷珠于 50ml 离心管, +14ml SOL, 涡旋 5~8 分钟, +1.4ml SDS, 涡旋 30s, 70 度水浴 10min, 4000 转离心 10min, 转移上清于新 50ml 离心管, +3ml PS 涡旋 30s, 4000 转离心 10min, 取上清 600ul 于 2ml 离心管, 分别加 200ul 旧吸附剂、新批次大豆吸附剂, 涡旋 30s, 13000 转, 离心 2min, 分别观察上清颜色, (判断吸附剂是否吸附颜色) 取上清液+等倍 GDP, 涡旋 1min, 静置 5min, 过柱离心, 300ul GDP 洗涤一次, 600ul GW2 洗涤两次。空甩 5min, 100ul EB 洗脱。

0.05g 土壤实验步骤:

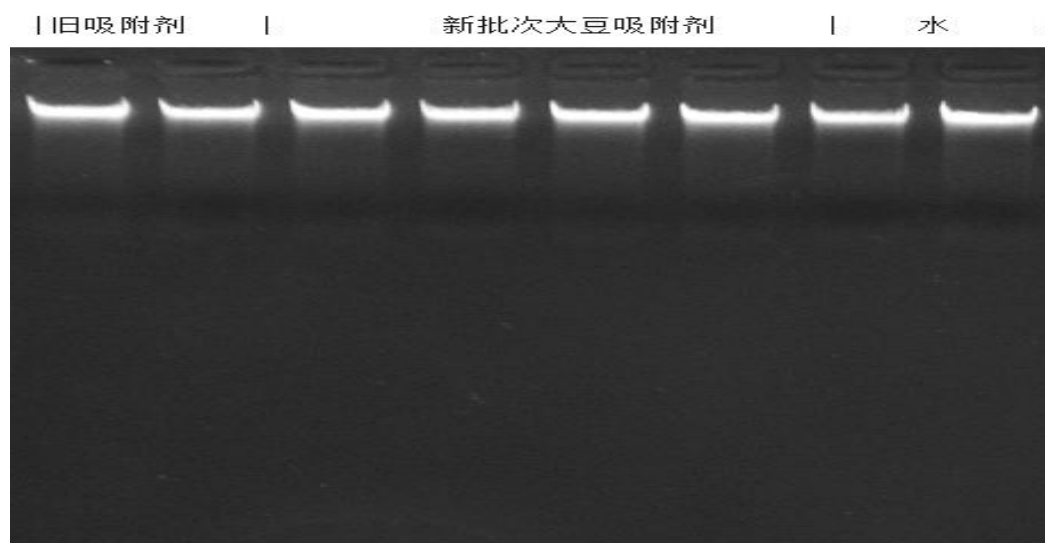
取 1g 土壤+适量玻璃粉+3~4 颗陶瓷珠于 50ml 离心管, +14ml SOL, 涡旋 5~8 分钟, +1.4ml SDS, 涡旋 30s, 70 度水浴 10min, 4000 转离心 10min, 转移上清于新 50ml 离心管, +3ml PS 涡旋 30s, 4000 转离心 10min, 取上清 600ul 于 2ml 离心管, 分别加 200ul 旧吸附剂、新批次大豆吸附剂, 涡旋 30s, 13000 转, 离心 2min, 分别观察上清颜色, (判断吸附剂是否吸附颜色) 取上清液+等倍 GDP, 涡旋 1min, 静置 5min, 过柱离心, 300ul GDP 洗涤一次, 600ul GW2 洗涤两次。空甩 5min, 100ul EB 洗脱。

OD 值数据:

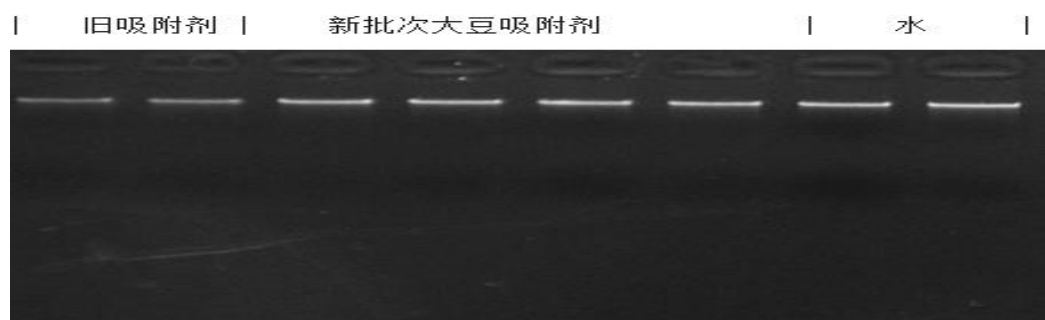
A260/230	A260/280	Result(ng/ul)	条件	样品用量	产量	
0.13	1.74	54.15	旧吸附剂	0.5g 土壤	5.42	
0.22	1.73	60.49			6.05	
0.15	1.83	66.75	大豆吸附剂		6.68	
0.10	1.88	62.25			6.23	
0.13	1.81	57.48			5.75	
0.13	1.88	58.14			5.81	
0.42	1.79	60.49	水		6.05	
0.26	1.76	68.66			6.87	
0.15	1.59	11.59	旧吸附剂		0.05g 土壤	1.16
0.12	1.85	12.25				1.22
0.10	1.98	13.18	大豆吸附剂	1.32		
0.20	1.89	12.96		1.30		
0.11	1.76	15.92		1.59		
0.06	1.91	13.72		1.37		
0.10	1.80	15.63	水	1.56		
0.10	1.78	14.50		1.45		

电泳图数据:

0.5g土壤提取实验



0.05g土壤提取实验



结论: 在 0.5g、0.05 土壤实验中, 新吸附剂与旧吸附剂与水提取效果基本一致, 不会吸附土壤核酸。