# 茶叶中微生物DNA的提取

**1. 菌体收集:**

**10克茶叶,加入50到100ml pbs缓冲液,振荡30到60分钟,150-200r/min,超声5分钟,在振荡30到60分钟,150-200r/min,取上清液加入到50ml离心管,先1500 r/min离心1分钟,将上清液转移到另一个50ml离心管,12000 r/min离心10分钟得菌体.后提取步骤如下:**

**准备：**

**剪刀消毒，剪大枪头，**

**异丙醇放入冰箱，每个样品准备6管量，每管900μl。**

**配制70%乙醇，每个样品准备1管量，每管500μl。**

**分装1ml氯仿至2ml离心管中，每个样品准备6管，检查离心管是否漏液。**

**提前打开水浴锅65**℃**，加去离子水至底层网格刚好没过水面**

**2. 实验步骤**

1. 每个50ml样品管加10ml CTAB buffer，20μl巯基乙醇，手持搅拌器打匀，封口膜封口， 65℃水浴1小时；
2. 最大转速离心5分钟，取上清液1ml转入已装好1ml氯仿的2ml离心管里。
3. 上下颠倒混匀多次，20分钟。
4. 12000 rpm 4度离心10分钟，取上清600ml至新1.5ml离心管，加入1.5倍体积（900ml）预冷异丙醇，充分颠倒混匀，-20冰箱放置过夜，
5. 离心每个样品的其中2管，4度12000rpm离心20分钟。每轮可离心12个样本。
6. 去掉上清，将从同一个样本取出的另一管异丙醇混合液加入去掉上清的管子中，4度12000rpm离心20分钟。
7. 倒掉上清，加入500μl 70%乙醇，颠倒混匀，至沉淀悬起；
8. 4度12000rpm离心5分钟，加入500μl 70%乙醇，颠倒混匀，至沉淀悬起；
9. 4度12000rpm离心5分钟，弃酒精，50度烘箱干燥。
10. 加入100μl TE缓冲液。若溶解困难，37度水浴锅温育30分钟。
11. Nanodrop定量
12. Qiagen PCR试剂盒纯化开始。加入5倍体积（500μl）PB buffer，颠倒混匀
13. 混匀后将溶液过柱，6000G离心1分钟
14. 加700μl washing buffer,10000g离心1分钟
15. 弃废液，重复步骤14，加700μl washing buffer,10000g离心1分钟
16. 弃废液，空管最大转速3分钟

空管转至新的1.5ml管子里，55度烘箱放置2分钟，加50μl elution buffer。,室温下放置3分钟，12000G离心1分钟。