

HiPure Soil DNA Maxi Kit

土壤 DNA 大提试剂盒

HiPure Soil DNA Maxi Kits 是专门为土壤和环境类样品的 DNA 大量提取而设计的。试剂盒采用硅胶柱纯化技术，并结合独创的腐殖酸吸附剂技术，适合于从 10~20g 土壤(如森林土壤，草地土壤，矿区土壤，底泥等)，或 3-5g 粪便样品中提取高产量高纯度的总 DNA。腐殖酸吸附剂可高效地吸附土壤样品中的腐殖酸和其它抑制因子，纯化的 DNA 可直接用于 PCR、Southern 杂交、酶切等实验。

产品组份

产品编号	D3143-01	D3143-02	D3143-03
纯化次数	2 次	10 次	50 次
HiPure DNA Maxi Columns II	2	10	50
50ml Collection Tubes	2	10	50
50ml Beads Tubes	2	10	50
Buffer SOL	50 ml	250 ml	3 x 400 ml
Buffer SDS	3 ml	15 ml	60 ml
Reagent DX(消泡剂)	500 μ l	1.5 ml	6 ml
Buffer PS	20 ml	100 ml	400 ml
Absorber Solution	15 ml	70 ml	300 ml
Buffer GDP	50 ml	300 ml	3 x 500 ml
Buffer GW2*	20 ml	2 x 50 ml	4 x 100 ml
Buffer AE	5 ml	30 ml	120 ml
说明书	1	1	1

保存条件

HiPure Soil DNA Kits 除 Absorber Solution 外，其它组份可在室温下(15-25 $^{\circ}$ C)干燥保存 18 个月。长期保存时需放置于 2-8 $^{\circ}$ C。Absorber Solution 须保存 2-8 $^{\circ}$ C。低温下，Buffer SDS 和 Buffer GDP 可能会有沉淀形成，55 $^{\circ}$ C 水浴让沉淀完全溶解。

准备事项

- 无水乙醇(96-100%)
- 70°C水浴锅或振荡金属浴
- Buffer GW2 使用前，须按瓶子标签所示，加入无水乙醇进行稀释。

实验步骤

1. 土壤的匀浆裂解(根据实际情况选择)

- **手工涡旋:** 在 50ml Beads Tube 中，加入 10-20g 土壤样品或 3-5g 粪便样品和 20ml Buffer SOL、100ul Reagent DX 和 2ml Buffer SDS。在涡旋仪上最高速度不间断涡旋 10 分钟。按第 2 步进行操作；
- **珠磨仪:** 在 50ml Beads Tube 中，加入 10-20 g 土壤样品，20ml Buffer SOL、100ul Reagent DX 和 1ml Buffer SDS。在珠磨仪匀浆土壤。不同的珠磨仪因功率不一样，应根据仪器进行调整。举例：采用 FastPrep-24® (MP)仪器时，推荐速度为 6.0，时间为 40 秒。按第 2 步进行操作；

Buffer SOL、Reagent DX 和 Buffer SDS 使用前可以预先混匀。我们推荐采用珠磨仪如 FastPrep-24® 来匀浆土壤样品，珠磨仪高能量高，短时间匀浆就可达到效果，可减少 DNA 断裂。采用涡旋仪涡旋匀浆土壤时，因涡旋仪效率低，时间长，对 DNA 完整性和产量方面都会有影响。若样品中含水量很多，可先离心去除水分后再进行操作。

2. 进一步裂解细菌：

- **对多数微生物:** 70°C 水浴 15 分钟。
- **对极难破裂的细菌:** 90°C 水浴 15 分钟。

部分细菌或真菌带有很厚的细胞壁，如葡萄球菌等，这些微生物极难裂解，90°C 水浴 15 分钟可提高其裂解效果。但 90°C 处理会引起 DNA 的片断化。推荐先采用 70°C 水浴来提取 DNA，再根据结果调整水浴温度和珠磨时间。处理某些样品时(如富含有机质的底泥)，70°C 加热也可能引起 DNA 的片段化，此时可省略这一步。DNA 的片段化不会影响常规的 PCR 运用。

3. 加入 6ml Buffer PS 至样品中。涡旋混匀 30 秒。冰上放置 10 分钟。

4. 5,000 rpm 离心 10 分钟，转移上清液至新的 50ml 离心管中。

5. 加入 5ml Absorber Solution 至样品中。涡旋混匀 30 秒。室温放置 5 分钟，期间偶尔

颠倒混匀 3-5 次。

使用前充分摇匀 Absorber Solution，将移液枪头的头部剪去小部分避免枪头的堵塞。

5,000 rpm 离心 10 分钟，转移上清液至新的离心管以下离心必须采用桶状水平式离心机。

6. 中。

7. **加入等倍体积 Buffer GDP 至上清液，颠倒混匀。**

8. 把 DNA 柱装在 50ml 离心管中。**转移一半混合液至柱子中。**3,000 × g 离心 3 分钟。

9. 倒弃滤液把柱子装回收集管。转移剩余混合液至柱子中。3,000 × g 离心 3 分钟。

10. 倒弃流出液，把柱子装回 50ml 离心管中。**加入 5 ml Buffer GDP 至柱子上。**3,000 × g 离心 3 分钟。

11. 倒弃滤液，把柱子重新装回收集管中。**加入 15ml Buffer GW2(已用乙醇稀释)至柱子中。**3,000 × g 离心 3 分钟。

Buffer GW2 须用无水乙醇稀释。按瓶子标签或说明书指示进行稀释。

12. 倒弃滤液，把柱子重新装回收集管中。**再加入 15ml Buffer GW2(已用乙醇稀释)至柱子中。**3,000 × g 离心 3 分钟。

13. 倒弃流出液，把柱子重新装回收集管中。5,000 × g 离心 15 分钟。

14. 将柱子装在 50ml 离心管中。**加入 600μl 预热至 70°C Buffer AE 至柱子的膜中央。**放置 3 分钟。5,000 × g 离心 3 分钟。

15. **再加入 600μl 预热至 70°C Buffer AE 至柱子的膜中央。**放置 3 分钟。5,000 × g 离心 3 分钟。

16. 丢弃 DNA 结合柱，把 DNA 保存 2-8°C，长期保存需保存于-20°C。

常见问题

1. DNA 有颜色

- **样品用量太多:** 森林土壤和草地土壤富含腐殖酸，土壤用量减少一半。
- 加入 Buffer PS 和 Absorber Solution 后没有充分混匀。
- **Absorber Solution 没有充分摇匀:** 使用 Absorber Solution 时，要充分摇匀。剪去移液枪枪头的头部的一部分，防止堵塞枪头。
- **样品用量太多:** 减少样品量，处理复杂粪便样品，样品量控制在 50mg。

2. DNA 降解严重

- **样品富含核酸酶或二价金属离子:** 省略 70°C 或 90°C 水浴加热的步骤。底泥或富含水份的土壤尽量去除后再进行操作。
- **用珠磨仪代替手工涡旋:** 手工涡旋时间长，会造成 DNA 的断裂。
- **样品用量太多:** 森林土壤和草地土壤富含腐殖酸，富含水分的底泥富含有机质，处理这些样品时，土壤用量减半操作。

3. DNA 产量低

- **土壤 DNA 含量低:** 提高样品用量，可准备多个
- **裂解不充分:** 用珠磨仪来代替手工涡旋。或手工涡旋时把涡旋仪速度调到最高，不间断充分涡旋 5-10 分钟。
- **洗脱效率不够:** 增加洗脱体积和洗脱次数。由于基因组 DNA 片段大，水溶性较差。建议进行第二次洗脱以提高产量或提高洗脱液的体积。
- **Buffer GDP 加入的体积不准:** 得到的上清后，Buffer GDP 的体积与上清体积相同。