

## HiPure Soil DNA 96 Kit

### 96 孔板土壤 DNA 抽提试剂盒

HiPure Soil DNA 96 Kit 是专门为土壤 DNA 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，适合于从各种土壤，如森林土壤，草地土壤，矿区土壤，底泥等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	D3144-01	D3144-02
纯化次数	96 次	5*96 次
HiPure DNA Plate	1	5
Glass Beads (0.1~0.6mm)	60 g	300 g
陶瓷珠	120 颗	550 颗
Reagent DX(消泡剂)	0.6 ml	6.0 ml
Buffer SOL	120 ml	400 ml
Buffer SDS	10 ml	40 ml
Buffer PS	40 ml	150 ml
Absorber Solution	40 ml	150 ml
Buffer GDP	160 ml	2 x 400 ml
Buffer GW2*	50 ml	2 x 100 ml
Elution Buffer	30 ml	120 ml
说明书	1	1

## 保存条件

本产品除Absorber Solution外，可在室温(15~25℃)保存 18 个月。低温下，Buffer SDS可能会有沉淀形成，需 37℃水浴让沉淀完全溶解。Absorber Solution室温运输，收到产品后请保存于 2~8℃。

## 准备事项

- 用无水乙醇稀释Buffer GW2，并于室温保存。
- 2ml厚壁离心管或螺口离心管

## 实验步骤

1. **准备 2ml匀浆管：** 在 2.0ml厚壁离心管(Eppendorf)或螺口离心管中，加入 0.4~0.5g Glass Beads(0.4~0.5ml)和一颗陶瓷珠。

2. **珠磨裂解微生物(根据实际情况选择)**

- **手工珠磨：**在装好玻璃珠和陶瓷珠的离心管中，加入 0.25-0.5g土壤和 0.8ml Buffer SOL，在涡旋仪上高速涡旋 5~10 分钟裂解微生物，再加入 80µl Buffer SDS至样品中，涡旋混匀 20 秒，按第 3 步进行操作。
- **珠磨仪：**在装好玻璃珠和陶瓷珠的螺口离心管中，加入 0.25-0.5g土壤和 0.8ml Buffer SOL和 40µl Buffer SDS，在珠磨仪上进行匀浆。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)时，推荐速度为 6.0，时间为 30 秒。按第 3 步进行操作。

推荐用珠磨仪如FastPrep-24®来匀浆土壤样品，珠磨仪高能量高，短时间匀浆就能达到效果可减少DNA断裂。用涡旋仪涡旋匀浆土壤时，因效率低，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。

3. **(可选)进一步裂解细菌：**

- **对多数微生物：**65~70℃水浴 15 分钟。
- **对极难破裂的细菌：**90℃水浴 15 分钟。

部分细菌或真菌带有厚厚的细胞壁，如葡萄球菌属等，这些微生物极难裂解，90℃水浴 10 分钟可提高其裂解效果，但 90℃处理会引起DNA的片断化。推荐先采用 70℃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℃加热也可能会引起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。

4. 13,000 x g 离心 1 分钟。
5. **转移 0.6ml 上清至新的离心管中，加入 200µl Buffer PS 至裂解液中，涡旋混匀 10 秒。**
6. **再加入 200µl Absorber Solution 至裂解液中，涡旋混匀 10 秒。**冰上放置 10 分钟，期间颠倒混匀 2 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。Buffer PS 和 Absorber Solution 是上清液体积的 1/3 倍，若上清液体积不足 0.6ml，按比例调整。
7. 13,000 x g 离心 5 分钟。
8. **转移上清液至 2ml 离心管中，加入等倍体积 Buffer GDP，颠倒混匀混合液 3~5 次。**  
举例：若上清液的体积为 700µl，则需加入 700µl Buffer GDP。

#### 自动化核酸提取上机 (Qiacube):

9. 分装好混合液至 96 孔板中，依次分装 Buffer GDP、Buffer GW2 (已用乙醇稀释)、Elution Buffer 至相应的溶液槽中，运行程序。
10. 结束程序，取出 DNA，保存在 -20/-80°C。

#### 离心方案

9. 把 HiPure DNA Plate 装在 2ml 收集板中。**转移混合液至 96 孔板中。**4,000 x g 离心 5 分钟。
10. 倒弃滤液把 96 孔板装回收集板中。把剩余混合液转移至 96 孔板中。4,000 x g 离心 5 分钟。
11. 倒弃滤液把 96 孔板装回收集板中，**加入 500µl Buffer GDP 至 96 孔板的每个孔中。**4,000 x g 离心 5 分钟。
12. 倒弃滤液把 96 孔板装回收集板中，**加入 650µl Buffer GW2 (已用无水乙醇稀释) 至 96 孔板的每个孔中。**4,000 x g 离心 5 分钟。
13. 倒弃滤液把 96 孔板装回收集板中，**加入 650µl Buffer GW2 (已用无水乙醇稀释) 至 96 孔板的每个孔中。**4,000 x g 离心 5 分钟。
14. 倒弃滤液把 96 孔板装回收集板中。4,000 x g 离心 10 分钟去除 96 孔板中残留的乙醇。

15. 将 96 孔板转移至 DNA 收集板中。加入 75 $\mu$ l 预热到 65 $^{\circ}$ C Buffer AE 至柱子的膜中央。室温静置 5 分钟。4,000  $\times$  g 离心 5 分钟。
16. 保存 DNA 在-20/-80 $^{\circ}$ C。

### 负压抽滤方案

9. 连接好 96 孔真空抽滤盒与真空泵；把废液收集槽放置在真空抽滤盒的底盒中；
10. 盖上真空抽滤盒上盖，把 96 孔结合板放置真空抽滤盒的上盖中；
11. 把获得的混合液转移至 96 孔板中；打开真空泵，用手用力压住 96 孔板，当真空泵压力上升后，轻轻松开手。抽滤 3-5 分钟让裂解液完全过滤。
12. 关闭真空泵。每孔中加入 500 $\mu$ l Buffer GDP(已用乙醇稀释)。打开真空泵，用手用力压住 96 孔板，当真空泵压力上升后，轻轻松开手。抽滤 3-5 分钟让溶液完全过滤。
13. 关闭真空泵。每孔中加入 650 $\mu$ l Buffer GW2(已用乙醇稀释)。打开真空泵，用手用力压住 96 孔板，当真空泵压力上升后，轻轻松开手。抽滤 3-5 分钟让溶液完全过滤。
14. 关闭真空泵。每孔中加入 650 $\mu$ l Buffer GW2(已用乙醇稀释)。打开真空泵，用手用力压住 96 孔板，当真空泵压力上升后，轻轻松开手。抽滤 3-5 分钟让溶液完全过滤。
15. 不要关闭真空泵，以最大的压力抽滤 15 分钟以干燥 96 孔板。
16. 关闭真空泵，打开真空抽滤盒，取出废液收集槽，把 2ml 收集板放在抽滤盒底部，盖回上盖。
17. 每孔加入 75 $\mu$ l 预热至 65 $^{\circ}$ C Elution Buffer 至膜中央。室温放置 5 分钟。打开真空泵，用手用力压住 96 孔板，当真空泵压力上升后，轻轻松开手。抽滤 3-5 分钟让溶液完全过滤。
18. 关闭真空泵。打开真空抽滤盒。取出收集板，贴上封口膜。
19. 把 DNA 保存 2-8 $^{\circ}$ C，长期保存需保存于-20 $^{\circ}$ C或-80 $^{\circ}$ C。