

目 录

简 介	2
原 理	2
试剂盒组成	3
保质期	3
准备工作	4
方案 1:从土壤样品提取微生物 DNA (KingFisher Flex 方案)	5
方案 2:从土壤样品提取微生物 DNA (KingFisher Duo 方案)	7
常见问题回答	8

版本: 2017-01

简介

MagPure Soil DNA KF Kit 是专门为土壤 DNA 提取而设计，适合于从 0.25-0.5g 土壤样品中提取高纯度的 DNA。该方法采用独创的腐殖酸吸附剂和磁珠纯化技术。吸附剂可高效地吸附 DNA 溶液中的腐殖酸等抑制因子。提取过程中无需使用有毒的酚氯仿抽提，也无需进行耗时的醇类沉淀。该试剂盒可在自动化核酸提取仪 KingFisher ML、KingFisher Flex、KingFisher 96 以及各种移液工作站如 BeckMEX、TECAN Freedom 等上使用。该方法纯化的 DNA 包括细菌、真菌等微生物基因组 DNA。得到的 DNA 可直接用于 PCR、病毒 DNA 检测、细菌 DNA 检测等实验。

原理

MagPure 纯化系统采用高结合力的超顺磁性的磁性粒子为基质，在高浓度离子化剂(如盐酸胍或异硫氰酸胍)条件下，纳米磁性粒子可通过氢键和静电吸附核酸，而蛋白质或其它杂质不被吸附而去除。吸附了核酸的纳米粒子经洗涤去除蛋白质和盐，最后可以用低盐缓冲液(如 Buffer TE)或水，洗脱出粒子上的核酸。得到的核酸纯度高，可直接用于各种下游实验。MagPure 系统采用的溶液体系和纯化方式是专门为自动化核酸提取而设计，已在 KingFisher 自动化核酸纯化仪上广泛运用。也适用于其它提取仪或移液工作站。

MagPure Soil DNA KF Kit 基于高结合力的纳米磁性粒子的纯化方式。样品经裂解液裂解，离心得到上清液。各种抑制因子经 Buffer PS 和吸附剂(Absorber Solution)吸附后离心去除，得到的上清液。加入结合液和磁性粒子吸附 DNA，而蛋白质则不被吸附而去除。吸附了 DNA 的粒子经洗涤液洗涤去除残留的蛋白质和其它杂质，再经高浓度的乙醇液洗涤去除盐分，最后 DNA 被低盐缓冲液(10Mm Tris, pH8.5)洗脱。洗脱的 DNA 可直接用于 PCR、病毒检测等实验。

保质期

MagPure Soil DNA KF Kit 除 MagPure Particle 外，可在室温下(15-25℃)干燥保存 18 个月。长期保存时需置于 2-8℃。低温下，Buffer SDS 可能会有沉淀形成，需 55℃水浴让沉淀完全溶解后再使用。MagPure Particle 保存于 2-8℃。

组 成

MagPure Soil DNA KF Kit

产品编号	MD5116-01	MD5116-02	MD5116-03
纯化次数	50 次	200 次	500 次
MagPure Particle B	1.7 ml	7 ml	16 ml
2ml Beads Tubes	50	200	500
Reagent DX	0.5 ml	1 ml	2 x 1.5 ml
Buffer SOL	50 ml	180 ml	2 x 250 ml
Buffer SDS	5 ml	20 ml	60 ml
Buffer PS	15 ml	60 ml	120 ml
Absorber Solution	15 ml	60 ml	120 ml
Buffer GDP	100 ml	400 ml	2 x 550 ml
Buffer AW1 *	22 ml	88 ml	220 ml
Elution Buffer	10 ml	30 ml	30 ml
说明书	1	1	1

需要准备材料和工具

- 70%乙醇
- 2ml 离心管
- KingFisher 核酸提取仪以及相应的耗材
- 离心机
- 70℃水浴锅
- (可选)FastPreps-24 匀浆仪或 Geno Grinder 2010 匀浆仪

方案 1: 土壤 DNA KingFisher Flex 提取

该方案采用 KingFisher Flex 自动化核酸提取仪, 适合于从 0.5-0.75g 土壤样品中自动化提取 DNA。

1. 土壤的匀浆裂解(根据实际情况选择)

- **手工涡旋:** 在 2ml Beads Tube 中, 加入 0.5-0.75g 土壤样品和 0.9ml Buffer SOL。在涡旋仪上最高速度涡旋 10 分钟; 再加入 90 μ l Buffer SDS 至样品中, 涡旋混匀 1 分钟。按第 2 步进行操作。
- **珠磨仪:** 在 2ml Beads Tube 中, 加入 0.5-0.75g 土壤样品和 0.9ml Buffer SOL、90 μ l Buffer SDS 和 5 μ l Reagent DX, 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 40 秒。按第 2 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。

2. (可选)进一步裂解细菌:

- **对多数微生物:** 70 $^{\circ}$ C 水浴 10 分钟。
- **对极难破裂的细菌:** 90 $^{\circ}$ C 水浴 10 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 $^{\circ}$ C 水浴 10 分钟可提高其裂解效果, 但 90 $^{\circ}$ C 处理会引起 DNA 的片断化。推荐先采用 70 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ C 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。

3. 12,000 x g 离心 1 分钟。

4. 转移~800 μ l 上清液至 1.5ml 离心管中。加入 200 μ l Buffer PS 至上清液中。涡旋混匀 15 秒。

5. (可选) 再加入 200 μ l Absorber Solution, 涡旋混匀 15 秒。

由于 Absorber Solution 在去除腐殖酸的同时, 也会吸附少量 DNA, 处理低腐殖酸样品或非土壤类样品, 建议省略这一步, 以提高 DNA 的产量。

6. 12,000 x g 离心 5 分钟。按单板结合或双板结合进行操作。

KingFisher Flex A (单板结合)

1. 转移 400µl 上清液至 DW Plate 中。并按下表把各种试剂转移至相应的 96 DW Plate 中。

名称	96 孔板类型	试剂
Elution	浅孔板	50~100 µl Elution Buffer
Wash 3	深孔板	900 µl 75%乙醇
Wash 2	深孔板	900 µl 75%乙醇
Wash 1	深孔板	500 µl Buffer GDP 30µl MagPure Particles B
Sample	深孔板	600µl Buffer GDP 400µl 土壤裂解液

2. 启动 Kingfisher Bindit3.3。
3. 执行程序 MagPure_Soil_DNA_KF_A。
4. 按仪器指示，把相应的 96 孔板转移至 KingFisher Flex 中。
5. 约 40 分钟后，程序完毕。
6. 取出 Elution 板，用封口膜密封样品。把样品保存于-20℃。

KingFisher Flex B (双板结合)

1. 转移 400 μ l 上清液至 DW Plate 中。并按下表把各种试剂转移至相应的 96 DW Plate 中。

名称	96 孔板类型	试剂
Elution	浅孔板	50~100 μ l Elution Buffer
Wash 3	深孔板	800 μ l 75%乙醇
Wash 2	深孔板	800 μ l 75%乙醇
Wash 1	深孔板	500 μ l Buffer GDP 30 μ l MagPure Particles B
Sample 2	深孔板	600 μ l Buffer GDP 400 μ l 土壤裂解液
Sample 1	深孔板	600 μ l Buffer GDP 400 μ l 土壤裂解液

2. 启动 Kingfisher Bindit3.3。
3. 执行程序 MagPure_Soil_DNA_KF_B。
4. 按仪器指示，把相应的 96 孔板转移至 KingFisher Flex 中。
5. 约 40 分钟后，程序完毕。
6. 取出 Elution 板，用封口膜密封样品。把样品保存于-20 $^{\circ}$ C。

方案 2: 土壤 DNA KingFisher Duo 提取

该方案采用 KingFisher Duo 自动化核酸提取仪, 适合于从 0.25-0.5g 土壤样品中自动化提取 DNA。

- 按方案 1 的第 1-6 步进行操作。
- 转移 400 μ l 上清液至 DW Plate 的孔 A 中**, 并按下表把其它试剂转移至相应的孔中。

名称	试剂
孔 H	Elution Buffer: 100 μ l
孔 G: Wash 4	700 μ l 75%乙醇
孔 F: Wash 3	700 μ l 75%乙醇
孔 E: Wash 2	700 μ l 75%乙醇
孔 D: Wash 1	500 μ l Buffer GDP 30 μ l MagPure Particles B
孔 C: Sample	600 μ l Buffer GDP 400 μ l 土壤裂解液
孔 B:	磁力套
孔 A: Sample	600 μ l Buffer GDP 400 μ l 土壤裂解液

- 启动 Kingfisher Bindit3.3。
- 执行程序 MagPure_Soil_DNA_Duo。
- 把试剂条和磁力套放在 KingFisher Duo 中。
- 约 40 分钟后, 程序完毕。
- 取出洗脱条, 转移 DNA 样品至新的离心管中, 并保存于-20 $^{\circ}$ C。

常见问题回答

该列表可能有利于解决提取过程所碰到的问题。Magen 的技术人员也可以随时为您提供服务，若您对试剂盒存在问题或建议，或您在分子生物学碰到问题，都请您联系我们。我们将竭尽所能为您排忧解难。

现象及原因	解决方法
DNA 有颜色	
样品使用量太多	粪使用量不要超过 500mg。初次使用时，建议粪便样品用量为 250mg，根据实验结果再调整样品用量。
Absorber Solution 混匀不均匀	Absorber Solution 使用前必须充分振荡混匀。转移时将移液枪头的尖端剪去一部分。
DNA 产量低	
样品贮藏条件不正确	土壤样品富含核酸酶，样品必须保存于-20oC。加入 Buffer SOL 之前，不要让样品解冻。
样品有裂解液没有充分打散	粪便样品在 Buffer SOL 中必须高速涡旋让样品充分分散。
Buffer AW1 中乙醇没有加入或加入量不够	按说明书或瓶子标签所示，加入正确的乙醇。
MagPure Particles 没有充分打散	初步使用 MagPure Particles 时，必须充分剧烈振荡 1-2 分钟以打散 MagPure Particles。
洗脱体积不够	增加洗脱体积以提高洗脱效率