

## HiPure Soil DNA Maxi Kit

### 土壤 DNA 大提试剂盒

HiPure Soil DNA Maxi Kits 是专门为土壤 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 $\mu$ 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 土壤样品和 20ml Buffer SOL、100ul Reagent DX 和 1ml 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，如葡萄球菌属等，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。

6. 5,000 rpm 离心 10 分钟，转移上清液至新的离心管中。

7. **加入等倍体积 Buffer GDP 至上清液，颠倒混匀。**

**以下离心必须采用桶状水平式离心机。**

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。4,000 × g 离心 15 分钟。

14. 将柱子装在 50ml 离心管中。**加入 500μl 预热至 70°C Buffer AE 至柱子的膜中央。**放置 3 分钟。4,000 × g 离心 3 分钟。

15. **再加入 500μl 预热至 70°C Buffer AE 至柱子的膜中央。**放置 3 分钟。4,000 × 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。