

HiPure Environmental DNA Mini to Midi Kit

环境样品 DNA 小柱中提试剂盒

产品简介

HiPure Environmental DNA Midi Kits 是专门为土壤、粪便、发酵物残渣等核酸含量低的环境样品的 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去除技术，适合于从 3~5g 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。试剂盒采用小柱中提硅胶柱纯化技术，柱子一次能容纳 15ml 液体，最高载量能达 100 μ g，可以在 50 分钟完成纯化工作，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	D3140-01	D3140-02	D3140-03
纯化次数	2 次	10 次	50 次
纯化大柱 F8	2	10	50
5ml Collection Tubes	2	10	50
50ml 收集管	2	10	50
氧化锆珠(0.6-0.8mm)	20 g	90 g	400 g
Buffer STL	20 ml	90 ml	450 ml
Buffer SDS	1 ml	5 ml	25 ml
Buffer SL	5 ml	30 ml	120 ml
Buffer GWP	20 ml	100 ml	500 ml
Buffer GW2*	10 ml	10 ml	50 ml
Buffer AE	5 ml	10 ml	30 ml
说明书	1	1	1

保存条件 试剂盒可以在室温下(15-25°C)干燥保存 18 个月。

准备事项

- 65°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。
- 本产品最高吸附力只能达至 100 μ g，根据样品类型或 DNA 含量调整样品用量，以避免过度超载。
- 若采用水平或桶状离心机时，把离心速度调至最高速度(~5000rpm)，由于水平转子离心力比较低，洗脱时体积损失较大(~50 μ l)，建议每次加入不少于 100 μ l 洗脱液以充分洗脱出 DNA。使用角度离心机时，洗脱时提高离心速度至 10000rpm，可以有效减少洗脱损失至 ~10 μ l，此时为获得更高浓度核酸，每次洗脱可以低至 60 μ l。

实验步骤

1. 在 50 ml 离心管（自备）中，加入 6~8g 氧化锆珠，然后加入 2.5~5.0 g 土壤、1.0~2.5 g 粪便、2.5~5.0 g 环境类样品，0.5~2.5g 发酵液残渣或沉淀物。
2. 加入 8.0ml Buffer STL 和 0.4ml Buffer SDS 至离心管中，盖紧盖子，在涡旋仪最高速度不间断涡旋 10~15 分钟。

建议使用带 50ml 泡棉夹具的涡旋仪，如美基的 MagMix A(配 X8) 的涡旋仪。

干燥的环境类样品使用前，可以用筛网尽可能清除异物，如树叶、石头或小树枝。对于非常干燥的材料，如果样品材料吸收过多的裂解缓冲液，控制样品并适量增加 Buffer STL 的用量。

对于非常潮湿的材料，在加入裂解缓冲液之前，可以离心后再去除多余的液体。控制样品用量以确定离心管有足够的空间进行珠磨裂解细胞壁。通常起始材料的减少也有助于提高裂解效率和提高 DNA 的纯度。

水体微生物 DNA 提取：可处理水样最大体积取决于样品（如来源和质量）和过滤膜（如类型、直径和孔径）。由于水样的浊度可以从清澈到高度浑浊不等。使用合适的过滤器过滤富集水体中微生物。使用无菌镊子从过滤装置取下过滤装置滤膜，将滤膜卷入圆柱体（含菌的一面朝内）并插入 50ml 匀浆管（已加入 6~8g 氧化锆珠），按第 2 步开始实验。

核酸含量低的土壤或环境类样品：处理贫瘠土壤或 DNA 含量低的环境样品、加入 20 μ l Carrier

RNA (需另外订购, PA-310) 至样品中一起提取, 用 Carrier RNA 来屏蔽或饱和环境物质对 DNA 的吸附作用, 可以有效提高目的 DNA 产量。本产品采用高盐介导吸附 DNA, Carrier RNA 过柱或清洗时, 可以高效去除, 不影响提高的产量和纯度。

3. 5,000~8,000 rpm 离心 5 分钟, 转移上清液至新的离心管中。
4. 加入 1/3 体积的 Buffer SL 至上清液中, 涡旋混匀 10 秒, 冰上放置 10 分钟。
5. 5,000~8,000 rpm 离心 10 分钟。
6. 转移上清液至新的离心管中, 加入等倍体积 Buffer GWP, 颠倒混匀 10~15 次。
若上清液的体积为 7ml, 则需加入 7ml Buffer GWP。若混合液中仍有明显的沉淀物, 于 5,000~8,000rpm 离心 10 分钟。
7. 将纯化大柱 F8 在 50ml 收集管中, 把不超过 15ml 混合液转移至柱子中。5,000rpm 离心 3 分钟。
纯化柱的最大容积为 15ml, 若混和液超过 15ml 时, 需要分 2 次过柱。
8. 倒弃滤液, 把柱子套回收集管中。加入 1.0 ml Buffer GWP, 5,000rpm 离心 3 分钟。
9. 倒弃滤液, 把柱子套回收集管中。加入 4.0 ml Buffer GW2, 5,000rpm 离心 10 分钟。
10. 取出柱子, 倒弃滤液, 把离心管反扣于吸水纸拍打吸尽残液, 然后放入一个新的 5ml 离心管至 50ml 离心管中, 把纯化大柱 F8 放回 50ml 离心管中, 并让柱子底部插入 5ml 离心管的管口, 再一起全部推到管中。
11. 加入 100 μ l 预热 65 $^{\circ}$ C 的 Buffer AE 至柱子, 放置 3 分钟。10,000rpm 离心 1 分钟。
12. 加入 100 μ l 预热 65 $^{\circ}$ C 的 Buffer AE 至柱子, 放置 3 分钟。10,000rpm 离心 1 分钟。
13. 弃去柱子, 小心用镊子或移液枪头挑出 5ml 离心管, 盖好盖子, 待用或保存于-20 度。

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 SL 后没有充分混匀。
- **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 2g。

2. DNA 降解严重

- **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 GWP 加入的体积不准**：得到的上清后，Buffer GWP 的体积与上清体积相同。