

## HiPure Soil DNA Maxi Kit

### 土壤 DNA 大提试剂盒

#### 产品简介

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 C4	2	10	50
50ml Collection Tubes C	4	20	100
氧化锆珠(0.6-0.8mm)	25 g	120 g	550 g
Buffer CL	6 ml	30 ml	150 ml
Buffer SOL	40 ml	200 ml	2 x 400 ml
Buffer SDS	3 ml	10 ml	40 ml
Reagent DX	1.0 ml	1.5 ml	5 ml
Buffer PS	10 ml	50 ml	250 ml
Absorber Solution	10 ml	50 ml	250 ml
Buffer GDP	50 ml	250 ml	2 x 550 ml
Buffer GWP	15 ml	70 ml	350 ml
Buffer GW2*	20 ml	50 ml	2 x 100 ml
Buffer AE	5 ml	30 ml	120 ml
说明书	1	1	1

Buffer AE 成分：10mM Tris, pH8.5

## 保存条件

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

## 准备事项

- 70℃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

- **配制 Buffer SOL Plus:** 按 1ml Buffer SOL 加入 40μl Buffer SDS 和 5μl Reagent DX 的比例进行预先混匀，使用前颠倒混匀后使用。低温下 Buffer SOL Plus 会有沉淀析出，55 度温育使之溶解。由于 Reagent DX 不溶于水，放置过程中会浮在表面，SOL Plus 使用前要颠倒充分。

1. **在 50ml Collection Tube C 中，加入 10g 氧化锆珠，加入 10g 土壤、2g 粪便、10g 环境类样品，然后加入 15ml Buffer SOL Plus，盖紧盖子。**

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 SOL Plus 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。一般来说，可以处理大量的透明饮用水或饮用水，因为过滤器堵塞的可能性较低，可以处理 100 mL 到几升的体积。含有沉积物或悬浮颗粒的浊水样，如粘土、淤泥或其他无机或有机物，可能导致过滤器堵塞，对于这些样本类型，建议使用 0.45μm 的过滤器。使用合适的过滤器，用直径为 25 mm 的过滤膜(0.2um 或 0.45μm) 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 15ml 匀浆管，然后加入 6000μl Buffer SOL plus，按步骤 2 进行操作。

2. **在涡旋仪最高速度不间断涡旋 10~15 分钟。**

3. **(可选) 70℃水浴 10 分钟进一步裂解。**

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. **短暂离心收集液滴，加入 4ml Buffer PS 至样品，涡旋混匀 20 秒。**8,000 rpm 离心 10 分钟，转移上清液至新的 50ml 离心管中(自配)。  
若无高速的 50ml 离心管，可以用普通的 50ml 离心管代替，使用普通的 50ml 离心管中，第 5 步离心速度调整至 4500-5000rpm。
5. **(可选)加入 4ml Absorber Solution 至样品中，涡旋混匀 15 秒。室温放置 5 分钟，期间颠倒混匀 3-5 次。**8,000 rpm 离心 10 分钟，转移上清液至新的离心管中。  
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。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. **加入等倍体积 Buffer GDP 至上清液，颠倒混匀 6-8 次。**
7. **将 HiPure DNA Maxi Column C4 在 50ml 收集管 C 中，转移 2.5ml Buffer CL 至柱子中，静置 3 分钟。**8,000 rpm 离心 3 分钟。  
Buffer CL 中含有 NaOH，可以激活柱子的吸附力。
8. **加入 5ml 灭菌水或超纯水至柱子中，8,000 rpm 离心 3 分钟。**
9. **倒弃滤液，把柱子套回收集管中。把 10~15ml 溶液转移至柱子中。**8,000rpm 离心 3 分钟。  
纯化柱的最大容积为 15ml，需要分 2~3 次过柱。若离心机转子倾角较大，建议加入不超过 14 ml，以防产生漏液现象。受离心机角度影响，以及大量试剂反复过柱，柱子中表层滤膜会有少量脱落，这属于正常现象，不影响提取效果。
10. **倒弃滤液，把柱子套回收集管中。把剩余的混合液转移至柱子中。**8,000rpm 离心 3 分钟。
11. **倒弃滤液，把柱子套回收集管中。加入 6ml Buffer GWP 至柱子中，静置 1 分钟。**8,000rpm 离心 3 分钟。
12. **倒弃滤液，把柱子套回收集管中。加入 6ml Buffer GW2（已用无水乙醇稀释）至柱子中。静置 2 分钟。**8,000rpm 离心 3 分钟。  
Buffer GW2 使用前，按瓶子上的标签指示，用无水乙醇进行稀释。
13. **倒弃滤液，把柱子套回收集管中。加入 6ml Buffer GW2（已用无水乙醇稀释）至柱子中。**8,000rpm 离心 15 分钟。
14. **取出柱子，打开盖子，室温放置 10~15 分钟晾干柱子滤膜。**倒弃收集管中滤液，加入适

量超纯水或灭菌水清洗离心管，倒弃全部液体，室温放置晾干备用。

15. 把 DNA 柱子套在收集管中，加入 500~800 $\mu$ l Buffer AE 至柱子膜中央。放置 2~5 分钟。8,000rpm 离心 3 分钟。丢去柱子，把 DNA 保存于-20 $^{\circ}$ C。

若回收大于 5KB 以上的片段时，最好把 Buffer AE 预热至 55 $^{\circ}$ C，并重复 2-3 次洗脱。重复洗脱时，可以把得到洗脱液再转移至柱子进行第二次或第三次洗脱，以获得高浓度的 DNA。回收大于 10Kbp 基因组 DNA，建议加入更多洗脱液并延长柱子的浸泡时间至 5 分钟。

Buffer AE 成分为 10mM Tris,pH8.5，可以用 Buffer TE 或灭菌水(pH>6.5)代替。由于滤膜存在吸水性，会有~0.1ml 洗脱液损失，建议洗脱体积不要低于 0.5ml。

## 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 $^{\circ}$ 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。