

## HiPure Soil DNA Midi Kit

土壤 DNA 中提试剂盒

### 产品简介

HiPure Soil DNA Midi Kits 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 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。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	D3143-01B	D3143-02B	D3143-03B
纯化次数	10 次	25 次	125 次
HiPure DNA Midi Columns II	10	25	125
15ml Collection Tubes	20	50	125
氧化锆珠(0.6-0.8mm)	40 g	90 g	400 g
Buffer SOL	80 ml	180 ml	2 × 400 ml
Buffer SDS	5 ml	10 ml	40 ml
Reagent DX	1 ml	1 ml	5 ml
Buffer PSS	15 ml	30 ml	150 ml
Absorber Solution	15 ml	30 ml	150 ml
Buffer GWP	120 ml	270 ml	3 × 500 ml
Buffer GW2*	20 ml	50 ml	3 × 100 ml
Buffer AE	30 ml	30 ml	120 ml
说明书	1	1	1

## 保存条件

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

## 准备事项

- 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

- **配制 Buffer SOL Plus:** 按 1ml Buffer SOL 加入 40 $\mu$ l Buffer SDS 和 5 $\mu$ l 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 不溶解水，放置过程中会浮在表面，SOL Plus 使用前要混匀充分。

1. **在 15ml 离心管中，加入 3g 氧化锆珠以及 2.5~5g 土壤、1~2g 粪便、2.5~5g 环境类样品，然后加入 6.0ml 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 0.45 $\mu$ m 的过滤器。使用合适的过滤器，用直径为 25 mm 的过滤膜(0.2 $\mu$ m 或 0.45 $\mu$ m) 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 6000 $\mu$ l 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°C 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°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。

4. 3,000~5,000 × g 离心 10 分钟, 转移 4ml 上清液至新的离心管中。

5. 加入 1ml Buffer PSS, 涡旋混匀 10 秒, 再加入 1ml Absorber Solution, 涡旋混匀 10 秒。冰上放置 10 分钟。

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, 不要加入 Absorber Solution, 以提高 DNA 的产量。

6. 3,000~5,000 × g 离心 10 分钟, 转移上清液至新的离心管中。加入等倍体积 Buffer GWP 至上清液, 颠倒混匀 6-8 次。

7. 把 DNA 柱装在 15ml 离心管中。转移 4ml 混合液至柱子。4,000 × g 离心 3 分钟。

8. 倒弃滤液把柱子装回收集管。转移剩余混合液至柱子中。4,000 × g 离心 3 分钟。

若混合液超过 8ml 时, 分三次过柱。

9. 倒弃流出液, 把柱子装回 15ml 离心管中。加入 4ml Buffer GWP 至柱子上。4,000 × g 离心 3 分钟。

10. 倒弃滤液, 把柱子装回收集管中。加入 4ml Buffer GW2 柱子中。4,000 × 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。

11. 倒弃滤液, 把柱子装回收集管中。加入 4ml Buffer GW2 至柱子中。4,000 × g 离心 3 分钟。

12. 倒弃滤液, 把柱子重新装回收集管中。 >4,000 × g 离心 10 分钟。

13. 将柱子装在 15ml 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。

14. 再加入 300µl 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. 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 PSS 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<sup>o</sup>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 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。