

## HiPure Soil DNA 96 Kit

### 96 孔板土壤 DNA 抽提试剂盒

HiPure Soil DNA 96 Kit 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	D3144-01	D3144-02
纯化次数	96 次	5*96 次
HiPure DNA Plate (2x151)	1	5
Glass Beads (0.1~0.6mm)	60 g	300 g
陶瓷珠	120 颗	550 颗
Reagent DX	0.6 ml	6.0 ml
Buffer SOL	120 ml	400 ml
Buffer SDS	10 ml	40 ml
Buffer PSS	40 ml	150 ml
Absorber Solution	40 ml	150 ml
Buffer GDP	160 ml	2 x 400 ml
Buffer GW2*	50 ml	2 x 100 ml
Elution Buffer	30 ml	120 ml
说明书	1	1

Elution Buffer 成分：10mM Tris, pH8.5

## 保存条件

本产品除Absorber Solution外，可在室温(15~25℃)保存 18 个月。低温下，Buffer SDS可能会有沉淀形成，需 37℃水浴让沉淀完全溶解。Absorber Solution室温运输，收到产品后请保存于 2~8℃。

## 准备事项

- 用无水乙醇稀释Buffer GW2，并于室温保存。
- 2ml厚壁离心管或螺口离心管

## 实验步骤

- **配制 Buffer SOL Plus:** 按 1ml Buffer SOL 加入 50 $\mu$ 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 不溶于水，放置过程中会浮在表面，SOL Plus 使用前要颠倒充分。
- **准备 2ml 匀浆管:** 在 2.0ml 厚壁离心管(Eppendorf)或螺口离心管中，加入 0.4~0.5g Glass Beads(0.4~0.5ml)和一颗陶瓷珠。

### 1. 在 2ml Bead Tubes 中，加入~0.5g 土壤、0.1g 粪便、~0.5g 环境类样品、0.3ml 发酵液、0.3ml 微生物培养液等样品，加入 0.8ml 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。

### 2. 根据实验室条件，选择涡旋仪或珠磨仪进行珠磨裂解。

- 涡旋仪：推荐使用美基涡旋仪 MagMix A，这台涡旋仪带 2ml 离心管的夹具，可一次高效处理 10~20 个样品。根据样品的不同，使用涡旋仪时，珠磨裂解时间增加到 15~30 min 可能是有利的，可以根据目标菌群特性和下游应用来调整。
- Powerlyzer 珠磨仪：建议 2000rpm 珠磨 30 秒，暂停 30 秒，再 2000rpm 珠磨 30 秒。
- FastPrep24 珠磨仪：建议 5m/s，珠磨 30 秒，暂停 30 秒，再 5m/s 珠磨 30 秒。
- Tissue Lysis II 珠磨仪：建议 25Hz 珠磨 5 分钟，重新调整位置后再 25Hz 珠磨 5 分钟。

### 3. (可选) 70℃ 温育 10 分钟进一步裂解样品。

4. 13,000 × g 离心 1 分钟。
5. 转移 0.6ml 上清至新的离心管中，加入 150µl Buffer PSS 至裂解液中，涡旋混匀 5 秒。
6. （可选）再加入 150µl Absorber Solution 至裂解液中，涡旋混匀 10 秒。冰上放置 10 分钟，期间颠倒混匀 2 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。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。
7. 13,000 × g 离心 5 分钟。
8. 转移上清液至 2ml 离心管中，加入等倍体积 Buffer GDP，颠倒混匀 6~8 次。  
举例：若上清液的体积为 700µl，则需加入 700µl Buffer GDP。

### 自动化核酸提取上机 (Qiacube):

9. 分装好混合液至 96 孔板中，依次分装 Buffer GDP、Buffer GW2（已用乙醇稀释）、Elution Buffer 至相应的溶液槽中，运行程序。
10. 结束程序，取出 DNA，保存在 -20/-80℃。

### 离心方案

9. 把 HiPure DNA Plate 装在 1.6~2.0ml 96 孔板（自备）中，转移一半体积的混合液至 96 孔板中。4,000 × g 离心 5 分钟。
10. 倒弃滤液把结合板装回 96 孔板中。把剩余混合液转移至 96 孔板中。4,000 × g 离心 5 分钟。
11. 倒弃滤液把结合板装回 96 孔板中。加入 500µl Buffer GDP 至 96 孔板的每个孔中。4,000 × g 离心 5 分钟。
12. 倒弃滤液把结合板装回 96 孔板中。加入 650µl Buffer GW2（已用无水乙醇稀释）至 96 孔板的每个孔中。4,000 × g 离心 5 分钟。
13. 倒弃滤液把结合板装回 96 孔板中。加入 650µl Buffer GW2（已用无水乙醇稀释）至 96 孔板的每个孔中。4,000 × g 离心 5 分钟。
14. 倒弃滤液把结合板装回 96 孔板中。4,000 × g 离心 10 分钟去除 96 孔板中残留的乙醇。

15. 将 96 孔板转移至 DNA 收集板中。加入 75 $\mu$ l 预热到 65 $^{\circ}$ C Elution Buffer 至柱子的膜中央。室温静置 5 分钟。4,000  $\times$  g 离心 5 分钟。
16. 再加入 75 $\mu$ l 预热到 65 $^{\circ}$ C Elution Buffer 至柱子的膜中央。室温静置 5 分钟。4,000  $\times$  g 离心 5 分钟。保存 DNA 在-20/-80 $^{\circ}$ C。

## 负压抽滤方案

9. 连接好 96 孔真空抽滤盒与真空泵；把废液收集槽放置在真空抽滤盒的底盒中；盖上真空抽滤盒上盖，把 HiPure DNA Plate 放置真空抽滤盒的上盖中；
10. 把混合液（第 8 步）转移至 HiPure DNA Plate，打开真空泵，用手用力压住 96 孔板，当真空泵压力上升后，轻轻松开手，抽滤 3-5 分钟，把余下的混合液全部转移至 HiPure DNA Plate 中，继续抽滤直至全部混合液过滤完毕。关闭真空泵，让压力降至零。
11. 每孔中加入 500 $\mu$ l Buffer GDP。打开真空泵，用手用力压住 96 孔板，当真空泵压力上升后，轻轻松开手。抽滤 1-2 分钟让溶液完全过滤。关闭真空泵。让压力降至零。
12. 每孔中加入 650 $\mu$ l Buffer GW2(已用乙醇稀释)。打开真空泵，用手用力压住 96 孔板，当真空泵压力上升后，轻轻松开手。抽滤 1-2 分钟让溶液完全过滤。
13. 每孔中加入 650 $\mu$ l Buffer GW2(已用乙醇稀释)，抽滤 1-2 分钟让溶液完全过滤。
14. 不要关闭真空泵，以最大的压力抽滤 5 分钟以干燥 96 孔板。关闭真空泵。关闭真空泵，当压力降至零度时，取下结合板，在一叠吸水纸上用力垂直拍打 7-8 次使孔壁的液滴流出。
15. 把 HiPure DNA Plate 放回抽滤盒中，再抽滤 10 分钟让结合板上的滤膜充分干燥。关闭真空泵，打开真空抽滤盒，取出废液收集槽，把 0.5~2.0ml 新的 96 孔板（自备）放在抽滤盒底部，盖回上盖。
16. 每孔加入 75 $\mu$ l 预热至 65 $^{\circ}$ C Elution Buffer 至膜中央。室温放置 5 分钟。打开真空泵，用手用力压住 96 孔板，当真空泵压力上升后，轻轻松开手。抽滤 2-3 分钟让溶液完全过滤。关闭真空泵，让压力降至零。
17. 每孔再加入 50-75 $\mu$ l 预热至 65 $^{\circ}$ C Elution Buffer 至膜中央。室温放置 5 分钟。打开真空泵，用手用力压住 96 孔板，当真空泵压力上升后，轻轻松开手。抽滤 2-3 分钟让溶液完全过滤。
18. 关闭真空泵。打开真空抽滤盒。取出收集板，贴上封口膜。把 DNA 保存 2-8 $^{\circ}$ C，长期保存需保存于-20 $^{\circ}$ C 或-80 $^{\circ}$ C。