

## HiPure Soil DNA Mini Kit C

### 土壤 DNA 小提试剂盒 C

#### 产品简介

HiPure Soil DNA 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	D3142-01C	D3142-02C	D3142-03C
纯化次数	10 次	50 次	250 次
HiPure DNA Mini Columns II	10	50	250
2ml Collection Tubes	10	50	250
氧化锆珠 (0.6~0.8mm)	15 g	60 g	300 g
塑料小勺子	2 个	4 个	10 个
Buffer STL	10 ml	50 ml	250 ml
Buffer SL	3 ml	15 ml	60 ml
Buffer GWP	15 ml	80 ml	2 x 180 ml
Buffer GW2*	6 ml	20 ml	2 x 50 ml
Buffer AE	5 ml	15 ml	60 ml
说明书	1	1	1

Buffer AE 成分：10mM Tris, 0.5mM EDTA, pH9.0

版本：201401

## 保存条件

HiPure Soil DNA Kits 在室温下(15-25°C)干燥保存 18 个月。

## 准备事项

- 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. 在 2.0ml 离心管或螺口离心管中, 加入一勺氧化锆珠(0.6-0.8mm)。

采用珠磨仪时, 建议使用螺口冻存管, 以防止液体泄漏。

2. 加入 0.25~0.5g 土壤、底泥、发酵物沉渣、滤渣、0.1~0.2g 粪便以及其它环境类样品至装有研磨珠的离心管中, 然后再加入 0.8ml Buffer STL。

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。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 2ml 匀浆管, 然后加入 800μL Buffer STL1, 按步骤 3 进行操作。

3. 转移至涡旋仪上最高速度涡旋 10~15 分钟或珠磨仪进行快速珠磨 30~60 秒。

- 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。裂解时间应尽可能短, 以避免剪切的时间和尽量减少腐殖酸的释放。然而, 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。
4. 瞬离 30s，加入 0.2ml Buffer SL 至样品中，涡旋混匀 15 秒。  
为更方便操作：13,000 × g 离心 1 分钟，转移上清液至新的离心管中，加入 0.2ml Buffer SL 至上清液中，涡旋混匀，按第 5 步进行操作。处理非土壤等腐殖质含量低的环境样品，可以省略 Buffer SL。Buffer SL 可以高效去除腐殖酸等抑制物，也会引起痕量核酸的损失。处理土壤样品不要省略这一步。
5. 13,000 × g 离心 5 分钟，转移上清液至新的离心管中。
6. 转移上清液至 2ml 离心管中，加入等倍体积 Buffer GWP，颠倒混匀 6-8 次。  
若上清液的体积为 700μl，则需加入 700μl Buffer GWP。若混合液中仍有明显的沉淀物，于 13000×g 离心 1 分钟。
7. 把 HiPure DNA Mini Columns II 柱装在收集管中。转移一半体积的混合液至柱子中。13,000 × g 离心 1 分钟。
8. 倒弃滤液把柱子装回收集管。把剩余混合液转移至柱子中。13,000 × g 离心 1 分钟。
9. 倒弃流出液，把柱子装回收集管中。加入 600μl Buffer GWP 至柱子上。13,000 × g 离心 1 分钟。
10. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。加入 600μl Buffer GW2(已用乙醇稀释)至柱子中。13,000 × g 离心 1 分钟。
11. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。再加入 600μl Buffer GW2(已用乙醇稀释)至柱子中。  
13,000 × g 离心 1 分钟。
12. 倒弃流出液，把柱子装回收集管中。13,000 × g 离心 2 分钟。
13. 将柱子装在 1.5ml 离心管中。加入 50-100μl 预热至 55~70°C Buffer AE 至膜中央。放置 3 分钟。13,000 × g 离心 1 分钟。
14. 把洗脱液转移至柱子的膜中央，放置 3 分钟。13,000 × g 离心 1 分钟。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 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 50mg。

### 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。