

HiPure Soil DNA Mini Kit

土壤 DNA 小提试剂盒

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	D3142-01	D3142-02	D3142-03
纯化次数	10 次	50 次	250 次
HiPure DNA Mini Columns II	10	50	250
2ml Collection Tubes	10	50	250
2ml Bead Tubes	10	50	250
Buffer SOL	15 ml	60 ml	270 ml
Buffer SDS	1 ml	5 ml	25 ml
Reagent DX	100 μ l	500 μ l	1.5 ml
Buffer PSS	5 ml	20 ml	80 ml
Absorber Solution	3 ml	20 ml	80 ml
Buffer GDP	15 ml	80 ml	2 x 200 ml
Buffer GW2*	6 ml	20 ml	2 x 50 ml
Buffer AE	5 ml	30 ml	120 ml
说明书	1	1	1

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

保存条件

HiPure Soil DNA 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

- 无水乙醇(96-100%)
- 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 50 μ l Buffer SDS 和 5 μ 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 使用前要颠倒充分。
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 x g 离心 1 分钟。转移 600 μ l 上清液至新的离心管中。**

5. 加入 150 μ l Buffer PSS，涡旋 5 秒，然后再加入 150 μ l Absorber Solution，涡旋混匀 10 秒。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。

粗制 DNA 的回收：取 300 μ l DNA 样品，加入 100 μ l Buffer PSS 和 100 μ l Absorber Solution，涡旋混匀 10 秒，按第 6 步进行操作。

6. 13,000 \times g 离心 5 分钟。
7. 小心转移上清液至新的离心管中。加入等倍体积 Buffer GDP，颠倒混匀 6-8 次。
例：若上清液的体积为 700 μ l，则需加入 700 μ l Buffer GDP。
8. 把 HiPure DNA Mini Column II 装在 2ml 收集管中。转移一半体积的混合液至柱子中。12,000 \times g 离心 30~60 秒。
该方案采用高盐介导吸附，HiPure DNA Mini Column II 最高吸附力只能达到 20 μ g，适量的控制样品用量，过载的 DNA 会因无法吸附而损失。
9. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中，转移余下混合液至柱子。12,000 \times g 离心 1 分钟。
10. 倒弃滤液把柱子装回收集管中。加入 500 μ l Buffer GDP 至柱子。12,000 \times g 离心 1 分钟。
11. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。加入 600 μ l Buffer GW2 至柱子中。12,000 \times g 离心 1 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。
12. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。加入 600 μ l Buffer GW2 至柱子中。12,000 \times g 离心 1 分钟。
13. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。12,000 \times g 离心 2 分钟甩干柱子。
14. 将柱子装在 1.5ml 离心管中。加入 30-50 μ l 预热至 70 $^{\circ}$ C Buffer AE 至柱子的膜中央。放置 3 分钟。12,000 \times g 离心 1 分钟。
15. 再加入 30~50 μ l 预热至 70 $^{\circ}$ C 的 Buffer AE 至柱子的膜中央。放置 3 分钟。12,000 \times g 离心 1 分钟。
16. 丢弃 DNA 结合柱，把 DNA 保存 2-8 $^{\circ}$ C，长期保存需保存于-20 $^{\circ}$ 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。
- **进一步纯化**：取纯化的 DNA，按第 5 步进行第二次纯化。

2. DNA 降解严重

- **样品富含核酸酶或二价金属离子**：省略 70°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，富含水份的底泥富含有机质，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。