

## HiPure Soil DNA Mini Kit

### 土壤 DNA 小提试剂盒（不带匀浆管）

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	D3142-01B	D3142-02B	D3142-03B
纯化次数	10 次	50 次	250 次
HiPure DNA Mini Columns II	10	50	250
2ml Collection Tubes	10	50	250
Glass Beads (0.1~0.6mm)	8 g	30 g	140 g
Buffer SOL	15 ml	60 ml	250 ml
Buffer SDS	1 ml	5 ml	15 ml
Buffer PS	5 ml	20 ml	80 ml
Absorber Solution	3 ml	20 ml	80 ml
Buffer GWP	10 ml	60 ml	250 ml
Buffer DW1	10 ml	30 ml	150 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

### 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°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

1. **准备 2ml 匀浆管：** 在 2.0ml 厚壁离心管(Eppendorf)或螺口离心管中，加入 0.5g Glass Beads(~0.5ml)。
2. **土壤的匀浆裂解(根据实际情况选择)**
  - **手工涡旋：** 在装好玻璃珠的离心管中，加入 0.25-0.5g 土壤和 0.8ml Buffer SOL，在涡旋仪上高速涡旋 5 分钟裂解微生物，再加入 80 $\mu$ l Buffer SDS 至样品中，涡旋混匀 3 分钟，按第 3 步进行操作。
  - **珠磨仪：** 在装好玻璃珠的离心管中，加入 0.3-0.5g 土壤样品和 0.8ml Buffer SOL 和 60 $\mu$ l Buffer SDS，在珠磨仪上进行匀浆。不同的珠磨仪因功率不一样，应根据仪器进行调整。举例：采用 FastPrep-24<sup>+</sup> (MP)时，推荐速度为 6.0，时间为 40 秒。按第 2 步进行操作；Buffer SOL 和 Buffer SDS 使用前可以预先混匀。推荐用珠磨仪如 FastPrep-24 来匀浆土壤样品，珠磨仪高能量高，短时间匀浆就能达到效果可减少 DNA 断裂。用涡旋仪涡旋匀浆土壤时，因效率低，时间长，对 DNA 完整性和产量方面都会有影响。若样品中含水量很多，可先离心去除水分后再进行操作。
3. **(可选)进一步裂解细菌：**
  - **对多数微生物：** 70°C 水浴 10 分钟。
  - **对极难破裂的细菌：** 90°C 水浴 10 分钟。

部分细菌或真菌带有很厚的细胞壁，如葡萄球菌等，这些微生物极难裂解，90°C 水浴 10 分钟可提高其裂解效果，但 90°C 处理会引起 DNA 的片段化。推荐先采用 70°C 水浴来提取 DNA，再根据结果调整水浴温度和珠磨时间。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. 13,000  $\times$  g 离心 1 分钟。转移 600 $\mu$ l 上清液至 1.5ml 离心管中。
5. **加入 150 $\mu$ l Buffer PS 至上清液中。** 涡旋混匀 15 秒。
6. **(可选) 再加入 150 $\mu$ l Absorber Solution，** 涡旋混匀 15 秒。

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 $\mu$ l DNA 样品，加入 100~200 $\mu$ l Absorber Solution 至样品中，涡旋混匀 15 秒，按第 6 步进行操作。

7. 13,000  $\times$  g 离心 5 分钟。
8. 小心转移上清液至 2ml 离心管中。**加入等倍体积 Buffer GWP。**颠倒混匀。  
举例：若上清液的体积为 700 $\mu$ l，则需加入 700 $\mu$ l Buffer GWP。
9. 把 DNA 柱装在收集管中。**转移一半混合液至柱子中。**13,000  $\times$  g 离心 30-60 秒。
10. 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  $\times$  g 离心 30-60 秒。
11. 倒弃流出液，把柱子装回收集管中。**加入 500 $\mu$ l Buffer DW1 至柱子上。**13,000  $\times$  g 离心 30-60 秒。
12. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。**加入 600 $\mu$ l Buffer GW2(已用乙醇稀释)至柱子中。**13,000  $\times$  g 离心 30-60 秒。  
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。
13. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。**再加入 600 $\mu$ l Buffer GW2(已用乙醇稀释)至柱子中。**13,000  $\times$  g 离心 30-60 秒。
14. 倒弃流出液，把柱子装回收集管中。13,000  $\times$  g 离心 2 分钟。
15. 将柱子装在 1.5ml 离心管中。**加入 30-50 $\mu$ l 预热至 70 $^{\circ}$ C Buffer AE 至柱子的膜中央。**放置 3 分钟。13,000  $\times$  g 离心 1 分钟。
16. **再加入 30~50 $\mu$ 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。
17. 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 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°C 或 90°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。