

## 目 录

简 介	2
原 理	2
试剂盒组成	3
保质期	3
准备工作	4
方案 1:从土壤样品提取微生物 DNA (KingFisher Flex 方案)	5
方案 2:从土壤样品提取微生物 DNA (KingFisher Duo 方案)	7
常见问题回答	8

版本: 2017-01

## 简介

MagPure Soil DNA KF Kit 是专门为土壤 DNA 提取而设计，适合于从 0.25-0.5g 土壤样品中提取高纯度的 DNA。该方法采用独创的腐殖酸吸附剂和磁珠纯化技术。吸附剂可高效地吸附 DNA 溶液中的腐殖酸等抑制因子。提取过程中无需使用有毒的酚氯仿抽提，也无需进行耗时的醇类沉淀。该试剂盒可在自动化核酸提取仪 KingFisher ML、KingFisher Flex、KingFisher 96 以及各种移液工作站如 BeckMEX、TECAN Freedom 等上使用。该方法纯化的 DNA 包括细菌、真菌等微生物基因组 DNA。得到的 DNA 可直接用于 PCR、病毒 DNA 检测、细菌 DNA 检测等实验。

## 原理

MagPure 纯化系统采用高结合力的超顺磁性的磁性粒子为基质，在高浓度离子化剂(如盐酸胍或异硫氰酸胍)条件下，纳米磁性粒子可通过氢键和静电吸附核酸，而蛋白质或其它杂质不被吸附而去除。吸附了核酸的纳米粒子经洗涤去除蛋白质和盐，最后可以用低盐缓冲液(如 Buffer TE)或水，洗脱出粒子上的核酸。得到的核酸纯度高，可直接用于各种下游实验。MagPure 系统采用的溶液体系和纯化方式是专门为自动化核酸提取而设计，已在 KingFisher 自动化核酸纯化仪上广泛运用。也适用于其它提取仪或移液工作站。

MagPure Soil DNA KF Kit 基于高结合力的纳米磁性粒子的纯化方式。样品经裂解液裂解，离心得到上清液。各种抑制因子经 Buffer PS 和吸附剂(Absorber Solution)吸附后离心去除，得到的上清液。加入结合液和磁性粒子吸附 DNA，而蛋白质则不被吸附而去除。吸附了 DNA 的粒子经洗涤液洗涤去除残留的蛋白质和其它杂质，再经高浓度的乙醇液洗涤去除盐分，最后 DNA 被低盐缓冲液(10Mm Tris, pH8.5)洗脱。洗脱的 DNA 可直接用于 PCR、病毒检测等实验。

## 保质期

MagPure Soil DNA KF Kit 除 MagPure Particle 外，可在室温下(15-25℃)干燥保存 18 个月。长期保存时需置于 2-8℃。低温下，Buffer SDS 可能会有沉淀形成，需 55℃水浴让沉淀完全溶解后再使用。MagPure Particle 保存于 2-8℃。

## 组 成

### MagPure Soil DNA KF Kit

产品编号	MD5116-01	MD5116-02	MD5116-03
纯化次数	50 次	200 次	500 次
MagPure Particle B	1.7 ml	7 ml	16 ml
2ml Beads Tubes	50	200	500
Reagent DX	0.5 ml	1 ml	2 x 1.5 ml
Buffer SOL	50 ml	180 ml	2 x 250 ml
Buffer SDS	5 ml	20 ml	60 ml
Buffer PS	15 ml	60 ml	120 ml
Absorber Solution	15 ml	60 ml	120 ml
Buffer GDP	100 ml	400 ml	2 x 550 ml
Buffer AW1 *	22 ml	88 ml	220 ml
Elution Buffer	10 ml	30 ml	30 ml
说明书	1	1	1

### 需要准备材料和工具

- 70%乙醇
- 2ml 离心管
- KingFisher 核酸提取仪以及相应的耗材
- 离心机
- 70℃水浴锅
- (可选)FastPreps-24 匀浆仪或 Geno Grinder 2010 匀浆仪

## 方案 1: 土壤 DNA KingFisher Flex 提取

该方案采用 KingFisher Flex 自动化核酸提取仪, 适合于从 0.5-0.75g 土壤样品中自动化提取 DNA。

### 1. 土壤的匀浆裂解(根据实际情况选择)

- **手工涡旋:** 在 2ml Beads Tube 中, 加入 0.5-0.75g 土壤样品和 0.9ml Buffer SOL。在涡旋仪上最高速度涡旋 10 分钟; 再加入 90 $\mu$ l Buffer SDS 至样品中, 涡旋混匀 1 分钟。按第 2 步进行操作。
- **珠磨仪:** 在 2ml Beads Tube 中, 加入 0.5-0.75g 土壤样品和 0.9ml Buffer SOL、90 $\mu$ l Buffer SDS 和 5 $\mu$ l Reagent DX, 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;

推荐用珠磨仪如 FastPrep-24<sup>®</sup>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。

### 2. (可选)进一步裂解细菌:

- **对多数微生物:** 70 $^{\circ}$ C 水浴 10 分钟。
- **对极难破裂的细菌:** 90 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ C 水浴 10 分钟可提高其裂解效果, 但 90 $^{\circ}$ C 处理会引起 DNA 的片断化。推荐先采用 70 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ 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。

### 3. 12,000 x g 离心 1 分钟。

### 4. 转移~800 $\mu$ l 上清液至 1.5ml 离心管中。加入 200 $\mu$ l Buffer PS 至上清液中。涡旋混匀 15 秒。

### 5. (可选) 再加入 200 $\mu$ 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。

6. 12,000 x g 离心 5 分钟。按单板结合或双板结合进行操作。

### KingFisher Flex A (单板结合)

1. 转移 400µl 上清液至 DW Plate 中。并按下表把各种试剂转移至相应的 96 DW Plate 中。

名称	96 孔板类型	试剂
Elution	浅孔板	50~100 µl Elution Buffer
Wash 3	深孔板	900 µl 75%乙醇
Wash 2	深孔板	900 µl 75%乙醇
Wash 1	深孔板	500 µl Buffer GDP 30µl MagPure Particles B
Sample	深孔板	600µl Buffer GDP 400µl 土壤裂解液

2. 启动 Kingfisher Bindit3.3。
3. 执行程序 MagPure\_Soil\_DNA\_KF\_A。
4. 按仪器指示，把相应的 96 孔板转移至 KingFisher Flex 中。
5. 约 40 分钟后，程序完毕。
6. 取出 Elution 板，用封口膜密封样品。把样品保存于-20℃。

## KingFisher Flex B (双板结合)

1. 转移 400 $\mu$ l 上清液至 DW Plate 中。并按下表把各种试剂转移至相应的 96 DW Plate 中。

名称	96 孔板类型	试剂
Elution	浅孔板	50~100 $\mu$ l Elution Buffer
Wash 3	深孔板	800 $\mu$ l 75%乙醇
Wash 2	深孔板	800 $\mu$ l 75%乙醇
Wash 1	深孔板	500 $\mu$ l Buffer GDP 30 $\mu$ l MagPure Particles B
Sample 2	深孔板	600 $\mu$ l Buffer GDP 400 $\mu$ l 土壤裂解液
Sample 1	深孔板	600 $\mu$ l Buffer GDP 400 $\mu$ l 土壤裂解液

2. 启动 Kingfisher Bindit3.3。
3. 执行程序 MagPure\_Soil\_DNA\_KF\_B。
4. 按仪器指示，把相应的 96 孔板转移至 KingFisher Flex 中。
5. 约 40 分钟后，程序完毕。
6. 取出 Elution 板，用封口膜密封样品。把样品保存于-20 $^{\circ}$ C。

## 方案 2: 土壤 DNA KingFisher Duo 提取

该方案采用 KingFisher Duo 自动化核酸提取仪, 适合于从 0.25-0.5g 土壤样品中自动化提取 DNA。

- 按方案 1 的第 1-6 步进行操作。
- 转移 400 $\mu$ l 上清液至 DW Plate 的孔 A 中**, 并按下表把其它试剂转移至相应的孔中。

名称	试剂
孔 H	Elution Buffer: 100 $\mu$ l
孔 G: Wash 4	700 $\mu$ l 75%乙醇
孔 F: Wash 3	700 $\mu$ l 75%乙醇
孔 E: Wash 2	700 $\mu$ l 75%乙醇
孔 D: Wash 1	500 $\mu$ l Buffer GDP 30 $\mu$ l MagPure Particles B
孔 C: Sample	600 $\mu$ l Buffer GDP 400 $\mu$ l 土壤裂解液
孔 B:	磁力套
孔 A: Sample	600 $\mu$ l Buffer GDP 400 $\mu$ l 土壤裂解液

- 启动 Kingfisher Bindit3.3。
- 执行程序 MagPure\_Soil\_DNA\_Duo。
- 把试剂条和磁力套放在 KingFisher Duo 中。
- 约 40 分钟后, 程序完毕。
- 取出洗脱条, 转移 DNA 样品至新的离心管中, 并保存于-20°C。

## 常见问题回答

该列表可能有利于解决提取过程所碰到的问题。Magen 的技术人员也可以随时为您提供服务，若您对试剂盒存在问题或建议，或您在分子生物学碰到问题，都请您联系我们。我们将竭尽所能为您排忧解难。

现象及原因	解决方法
<b>DNA 有颜色</b>	
样品使用量太多	粪使用量不要超过 500mg。初次使用时，建议粪便样品用量为 250mg，根据实验结果再调整样品用量。
Absorber Solution 混匀不均匀	Absorber Solution 使用前必须充分振荡混匀。转移时将移液枪头的尖端剪去一部分。
<b>DNA 产量低</b>	
样品贮藏条件不正确	土壤样品富含核酸酶，样品必须保存于-20oC。加入 Buffer SOL 之前，不要让样品解冻。
样品有裂解液没有充分打散	粪便样品在 Buffer SOL 中必须高速涡旋让样品充分分散。
Buffer AW1 中乙醇没有加入或加入量不够	按说明书或瓶子标签所示，加入正确的乙醇。
MagPure Particles 没有充分打散	初步使用 MagPure Particles 时，必须充分剧烈振荡 1-2 分钟以打散 MagPure Particles。
洗脱体积不够	增加洗脱体积以提高洗脱效率