

AipBest 超纯土壤基因组 DNA 快速提取试剂盒(离心柱型)

AipBest Ultra-Pure Soil Genomic DNA Rapid Extraction Kit(Centrifugal Column)

使用说明书

◆目录号：OD204

目录编号	包装单位
OD204-01	50次

◆试剂盒组成、储存、稳定性：

试剂盒组成	保存	50 次(OD204-01)
溶液 SUS	室温	25 mL
溶液 LYS	室温	6 mL
溶液 S1	室温	15 mL
溶液 S2	室温	15 mL
溶液 S3	室温	30 mL 第一次使用前请加 2 倍体积无水乙醇
抑制物去除液 IR	室温	25 mL
漂洗液 WB	室温	13 mL 第一次使用前请加 60mL 无水乙醇
洗脱缓冲液 EB	室温	10 mL
蛋白酶 K 溶液 (20mg/mL)	-20°C	1 mL
吸附柱 AC 和收集管	室温	50 套

◆适用范围：适用于快速提取各种土壤基因组 DNA。

◆产品储存：本试剂盒在室温储存 12 个月不影响使用效果。

◆储存事项：

1. 溶液 LYS 或者抑制物去除液 IR 低温时可能出现析出和沉淀，可以在 37°C 水浴几分钟帮助重新溶解，恢复澄清透明后冷却到室温即可使用，注意不要剧烈摇晃，以免产生大量气泡。
2. 蛋白酶 K 保存在即用型甘油缓冲液中，常温运输。收到后，不超过 25°C 室温至少保存 6 个月，4°C 保存 12 个月，-20°C 保存 2 年。
3. 避免试剂长时间暴露于空气中产生挥发、氧化、pH 值变化，各溶液使用后应及时盖紧盖子。

◆**产品介绍：**普通的手提或者试剂盒提取的土壤基因组 DNA 由于常常残留有 PCR 的强烈抑制物如腐殖酸、棕黄酸等杂质造成实验失败，此外，由于采用了剧烈的玻璃珠击打来破裂菌体，常常造成 DNA 剪切和降解。本公司经过长期研发开发出了具有自主知识产权的土壤基因组 DNA，通过专利配方的腐殖酸和棕黄酸去除试剂配合特殊处理的纯化柱，可以最大程度的去除这些杂质，同时加上多次柱漂洗，确保得到的 DNA 具有极高纯度，此外独特的抽提和裂解体系可以迅速裂解细胞(壁)和灭活细胞内核酸酶，不需要借助玻璃珠破壁，有效保证了基因组 DNA 的完整性。

◆**产品特点：**

1. 本公司独有的专利配方和纯化柱能有效去除腐殖酸等杂质。
2. 不需要借助玻璃珠破壁，有效保证了基因组 DNA 的完整性，长度可达 30kb -50kb，可直接用于 PCR，Southern-blot 和各种酶切反应。
3. 兼容性强，适用于各种不同的土壤包括淤泥等提取困难的土壤。
4. 多步骤去除各种杂质和抑制物，保证了极高纯度，OD₂₆₀/OD₂₈₀ 典型的比值达 1.7~1.9。
5. 操作安全，不需要使用有毒的苯酚等试剂，也不需要乙醇沉淀等步骤。
6. 快速简捷，单个样品操作一般可在 60 分钟内完成。

◆**注意事项：**

1. 所有的离心步骤均在室温完成，使用转速可以达到 13,000rpm 的传统台式离心机，如 Eppendorf 5415C 或者类似离心机。
2. 开始实验前根据需要要将水浴预热到 37℃ 或者 70℃ 备用。
3. 溶液 S3 和抑制物去除液 IR 中含有刺激性化合物，操作时要戴乳胶手套，避免沾染皮肤，眼睛和衣服。若沾染皮肤、眼睛时，要用大量清水或者生理盐水冲洗。
4. 洗脱液 EB 不含有螯合剂 EDTA，不影响下游酶切、连接等反应。也可以使用水洗脱，但应该确保批 pH 大于 7.5，pH 过低影响洗脱效率。用水洗脱 DNA 应该保存在 -20℃。DNA 如果需要长期保存，可以用 TE 缓冲液洗脱(10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8.0)，但是 EDTA 可能影响下游酶切反应，使用时可以适当稀释。

◆**操作步骤(实验前请先阅读注意事项)：**

提示：第一次使用前请先在漂洗液 WB 和溶液 S3 中加入指定量无水乙醇，充分混匀，加入后请及时在方框打钩标记已加入乙醇，以免多次加入！

1. 取 0.2 克土壤放入离心管，用牙签或者枪头捣碎后加入 0.5mL 溶液 SUS，用枪头搅拌后短暂涡旋帮助重悬。

注 如果预计土壤里面含有较多难裂解的菌类如革兰氏阳性菌，可先在 0.5mL 溶液 SUS 里面加入 10mg 的溶菌酶，吹打混匀后再加入，并加做步骤 2。

2. **可选步骤:** 37℃温育 30 分钟, 每 10 分钟颠倒混匀几次。
注: 对于难裂解的菌类如革兰氏阳性菌含量丰富的土壤, 并在上一步骤加入了溶菌酶的样品, 需要加做此步骤来帮助裂解。
3. 加入 20μL 蛋白酶 K (20mg/mL)溶液, 短暂涡旋帮助混匀。
可选步骤 为提高产量, 可以在 37℃振荡 10 分钟或者涡旋振荡 2 分钟(注意涡旋振荡可能剪切 DNA)。
4. 加入 120μL 溶液 LYS, 短暂涡旋混匀, 65℃温育 30 分钟, 期间颠倒混匀几次。
注: 65℃温育时间可以根据具体样品种类和产量进行延长或者缩短以取得最佳产量和纯度, 可在 10 分钟—2 小时范围内调整。
5. **可选步骤:** 于-70℃冷冻, 65℃融化, 反复 3 次。
注 对于难裂解的菌类如革兰氏阳性菌含量丰富的土壤, 可加做此步骤来帮助裂解。
6. 颠倒混匀后, 13,000rpm 离心 2 分钟,小心转移上清至新的离心管(记录上清体积)。
7. 加入 1/3(三分之一)体积的溶液 S1,颠倒几次, 涡旋 5 秒混匀后, 冰上放置 5 分钟。
8. 13,000rpm 离心 5 分钟,小心转移上清至新的离心管(记录上清体积)。
9. 加入 1/3(三分之一)体积的溶液 S2,颠倒几次, 短暂涡旋混匀后, 冰上放置 5 分钟。
注: 该步骤主要是进一步去除 Humic substance 等 PCR 抑制物质以提高纯度, 但是会降低一些产量, 如果对产量要求高或者提取的 DNA 不用于 PCR, 可以尝试略去此步骤以提高产量。如果预计土壤成份复杂 PCR 抑制物质多, 可以适当提高 S2 加入量(如加入等体积的 S2), 可以提高纯度, 但是注意也会显著降低产量。
10. 13,000rpm 离心 5 分钟,小心转移上清至新的离心管(记录上清体积)。
11. 加入 1.5 倍体积的溶液 S3(请先检查是否已加入无水乙醇!), 颠倒几次, 短暂涡旋混匀。
12. 将上一步混合物 700μL(包括可能的沉淀)加入一个吸附柱 AC 中, (吸附柱放入收集管中), 12,000rpm 离心 30-60 秒, 倒掉收集管中的废液。重复直到所有的混合物都加完。
13. 加入 500μL 抑制物去除液 IR, 12,000rpm 离心 30 秒, 弃废液。
14. 加入 600μL 漂洗液 WB(请先检查是否已加入无水乙醇!), 12,000rpm 离心 30 秒, 弃掉废液。
15. 加入 600μL 漂洗液 WB, 12,000rpm 离心 30 秒, 弃掉废液。
16. 将吸附柱 AC 放回空收集管中, 13,000rpm 离心 2 分钟, 尽量除去漂洗液, 以免漂洗液中残留乙醇抑制下游反应。
17. 取出吸附柱 AC, 放入一个干净的离心管中, 在吸附膜的中间部位加 100μL 洗脱缓冲液 EB(洗脱缓冲液事先在 65-70℃水浴中预热效果更好), 室温放置 3-5 分钟,

12,000rpm 离心 1 分钟。将得到的溶液重新加入离心吸附柱中，室温放置 2 分钟，12,000rpm 离心 1 分钟。

注：洗脱体积越大，洗脱效率越高，如需要 DNA 浓度较高，可以适当减少洗脱体积，但是最小体积不应少于 50 μ L，体积过小降低 DNA 洗脱效率，减少 DNA 产量。

18. DNA 可以存放在 2-8 $^{\circ}$ C,如果要长时间存放，可以放置在 -20 $^{\circ}$ C。

=====

