

D5625 Soil DNA Kit

简易中文步骤

√实验前请按英文说明书正确稀释 HBC Buffer 和 DNA Wash Buffer.

➤ 使用【异丙醇】对 HBC Buffer 进行稀释，稀释后室温保存

货号	加入量
D5625-00	1.6mL
D5625-01	10mL
D5625-02	32mL (每瓶)

➤ 使用【无水乙醇】对 DNA Wash Buffer 进行稀释，稀释后室温保存

货号	加入量
D5625-00	8mL
D5625-01	80mL
D5625-02	100mL (每瓶)

土壤 DNA 提取方案(100-250mg):

1. 称取 100-250mg 土壤样本至 Disruptor Tube 中。
2. 加入 725 μ l SLX-Mlus Buffer，高速涡旋 3-5min，悬浮菌体裂解细胞。
Note: 为了获得最好的效果，可使用涡旋仪协助破碎，如 GenoGrinder 2010、Fastprep-24[®]，或 Omni Bead Ruptor。
3. 500xg 离心 5s 甩下盖子中的溶液。
4. 加 72 μ l DS Buffer，涡旋混匀，70 $^{\circ}$ C水浴 10min，期间取出涡旋混匀一次，10000xg 室温离心 5min；
5. 转移 400 μ l 上清至新的 1.5mL 离心管内，加入 135 μ l P2 Buffer，涡旋混匀，冰上放置 3min，最大速度 ($\geq 13,000xg$) 离心 1min；
6. 小心转移上清至新的 1.5mL 离心管内，加入 200 μ l cHTR Reagent，涡旋混匀；
Note: 使用前先把 cHTR Reagent 充分摇匀，吸取时可将枪头吸孔剪大。
7. 室温放置 2min，最大速度离心 1min，转移上清 (约 500 μ l) 到新的 1.5mL 离心管中；
Note: 如果上清颜色较深，重复步骤 6-7。
8. 加入等体积 XP1 Buffer，涡旋混匀；
9. 把 HiBind[®] DNA Mini Column 套在 2mL 收集管内，转移 700 μ l 第 8 步的混合液到 HiBind[®] DNA Mini Column，10,000xg 室温离心 1min，弃废液；
10. 重复步骤 9，直至全部转移过柱。
11. 把 HiBind[®] DNA Mini Column 套在 2mL 收集管内，加入 500 μ l HBC Buffer，

10,000xg 离心 1min, 弃滤液;

Note: HBC Buffer 在使用前请按照说明书正确添加异丙醇稀释备用

12. 把 HiBind® DNA Mini Column 套在 2mL 收集管内, 加入 700µl DNA Wash Buffer, 10,000xg 离心 1min, 弃滤液;

Note: DNA Wash Buffer 在使用前必须使用无水乙醇稀释备用。

13. 重复步骤 12, 进行第二次 DNA Wash Buffer 洗涤。

14. 把 HiBind® DNA Mini Column 套在 2mL 收集管内, 室温, 空柱最大速度离心 2min 干燥柱子。

Note: 该步骤非常关键, 可去除抑制下游实验的杂质。

15. 把 HiBind® DNA Mini Column 转移至干净的 1.5mL 离心管, 加入预热至 70°C, 50-100µl Elution Buffer 至柱子结合膜中央, 室温放置 1-2min, 最大速度离心 1min;

16. 重复步骤 15, 进行二次洗脱;

17. 弃除柱子, 把 DNA 产物保存于-20°C。

土壤 DNA 提取方案(250-1000mg):

1. 称取 500mg 玻璃珠 (Glass Beads) 于 15mL 离心管中。

2. 称取 0.2-1g 土壤样本至 15mL 离心管中。

3. 加入 1mL SLX-Mlus Buffer, 高速涡旋 3-5min, 悬浮菌体裂解细胞。

Note: 为了获得最好的效果, 可使用涡旋仪协助破碎, 如 GenoGrinder 2010、Fastprep-24®, Mixer Mill MM 300®) 。

4. 加 100µl DS Buffer, 涡旋混匀, 70°C水浴 10min, 期间短暂涡旋混匀;

可选: 如需提取革兰氏阳性菌, 可进行第二次高温孵育, 孵育条件为 95°C, 2min。

5. 室温下, 3,000xg 离心 3min, 转移 800µl 上清至新的 2mL 离心管内, 加入 270µl P2 Buffer, 涡旋混匀;

6. 冰上放置 5min, 最大速度 ($\geq 13,000xg$) 离心 5min;

7. 小心转移上清至新的 2mL 离心管内, 加入 0.7 倍体积的异丙醇, 上下颠倒 20~30 次混匀;

Note: 如果土壤样本 DNA 含量较低, 把样本置于-20°C内 1 小时。

8. 最大速度离心 10min, 弃除上清, 小心不要吸到 DNA 沉淀;

9. 把管子倒置在干燥的吸水纸上 1min, 以去除多余水分;

Note: 这步无须把 DNA 沉淀彻底干燥。

10. 加入 200µl Elution Buffer, 涡旋 10s, 70°C水浴 10-20min 溶解 DNA 沉淀。

11. 加入 100µl cHTR Reagent, 涡旋混匀。

Note: 使用前, 充分摇晃瓶子使 cHTR Reagent 充分重悬。

12. 室温放置 2min, 最大速度离心 2min, 转移上清至新的 2mL 离心管。
Note: 如上清液依然颜色较深, 重复 11-12 步进行第二次 HTR Reagent 处理。
13. 加入等体积 XP1 Buffer, 涡旋混匀。
14. 把 HiBind® DNA Mini Column 套在 2mL 收集管内, 将步骤 13 的混合液转移到 HiBind® DNA Mini Column, 室温下, 10,000xg 离心 1min, 弃除滤液;
15. 把 HiBind® DNA Mini Column 套在 2mL 收集管内, 加入 500µl HBC Buffer 到 HiBind® DNA Mini Column, 室温下, 10,000xg 离心 1min, 弃除滤液;
Note: HBC Buffer 在使用前请按照说明书正确添加异丙醇稀释备用。
16. 把 HiBind® DNA Mini Column 套在新的 2mL 收集管内。
17. 把 HiBind® DNA Mini Column 套在 2mL 收集管内, 加入 700µl DNA Wash Buffer 到 HiBind® DNA Mini Column, 室温下, 10,000xg 离心 1min, 弃除滤液;
Note: DNA Wash Buffer 在使用前必须使用无水乙醇稀释备用。
18. 室温, 空柱 13,000xg 离心 2min 干燥柱子。
Note: 该步骤非常关键, 可去除抑制下游实验的杂质。
19. 把 HiBind® DNA Mini Column 转移至干净的 1.5mL 离心管, 加入预热至 70°C, 50~100µl Elution Buffer 至柱子结合膜中央, 室温放置 1-2min, 13,000xg 离心 1min;
Note: 把柱子置于 65°C 孵育, 与室温孵育相比可提高 DNA 洗脱效率。
20. 重复步骤 19 进行二次洗脱。
21. 弃除柱子, 把 DNA 产物保存于 -20°C。

使用其他方法提取的土壤 DNA 纯化方案:

1. 使用 Elution Buffer 把产物体积补充到 200µl。
2. 加入 100µl cHTR Reagent, 涡旋混匀。
Note: 使用前先把 cHTR Reagent 充分摇匀, 吸取时可将枪头吸孔剪大。
3. 室温放置 2min。
4. 13,000xg 离心 2min。
5. 转移上清液至新的 2mL 离心管中。
Note: 如上清液依然颜色较深, 重复 2~4 步进行第二次 cHTR 处理。
6. 接着按照前文“土壤 DNA 提取方案(100-250mg)” 8-17 步操作。

中文翻译仅供辅助阅读, 详情请以英文说明书为准