

## FastPure Soil DNA Mini Kit Handbook FastPure 土壤微生物 DNA 小量提取试剂盒说明书

### 产品组成

FastPure Soil DNA Mini Kit		
产品编号	EK-1210-50T	EK-1210-100T
纯化次数	50 次	100 次
Buffer C1	5mL	8mL
Buffer C2	15mL	30mL
Buffer C3	15mL	30mL
Buffer C4	70mL	140mL
Buffer C5	30mL	60mL
Buffer C6	10mL	20mL
1mm 研磨珠	15g	30g
Buffer SP	45mL	90mL
DNA Mini Columns	50	100
2mL Collection Tubes	50	100
使用手册	1	1

### 产品介绍

分离试剂盒包含一种新颖的专有方法，可利用我们独有的抑制剂去除技术从环境样本中分离基因组 DNA。该套件适用于腐植酸含量高的环境样品，包括难处理的土壤类型，如堆肥、沉积物和粪便。该套件还成功使用了其他更常见的土壤类型。分离的 DNA 具有高纯度，可以更成功地从样品中对生物体进行 PCR 扩增。已进行 PCR 分析以检测多种生物体，包括细菌（例如枯草芽孢杆菌、炭疽芽孢杆菌）、真菌（例如酵母、霉菌）、藻类和放线菌（例如链霉菌）。试剂盒基于硅胶柱纯化技术，得到的 DNA 杂质少，完整性好，可直接用于 PCR、酶切等下游实验。

### 存储条件

本产品可在室温(15~25°C)干燥保存 12 个月。

### 需要额外准备的材料

- 无水乙醇（96%-100%）
- 无菌 1.5mL/2mL 离心管

### 开始前注意事项 请务必在使用本试剂盒之前阅读此注意事项：

- 新采集的土壤样本会得到更高的产率，不同样本在采样前应先查阅相应的最佳保存条件。
- 所有的离心步骤应在室温（15-25°C）下完成。
- 在需要吸取上清液的步骤中应避免吸到沉淀，否则会堵塞吸附柱，并影响产物纯度。
- 如果溶液 C1 出现沉淀，可在 37°C-60°C 下加热，直到沉淀物溶解。
- Buffer C4 在使用前应震荡混匀。

### 开始前试剂准备

- Buffer C5 按瓶子标签所示提前加入相应体积的无水乙醇

**操作步骤:**

1. 取 750  $\mu\text{L}$  Buffer SP 和 0.25 g 研磨珠至 2 mL 离心管中。
2. 在上述 2 mL 离心管中加入土壤样本 0.25 g, 涡旋混匀 15 s。
3. 向样本中加入 60  $\mu\text{L}$  Buffer C1, 最大速度涡旋振荡 10 min 至样本充分混匀裂解。  
使用前应注意 Buffer C1 是否出现沉淀, 如若出现沉淀, 应加热溶解混匀再使用。此步骤为物理破碎和化学裂解结合。使用多管涡旋振荡器可提高效率; 若样本纤维质多, 可延长至 15 min。
4. 常温 10,000 $\times g$  离心 30 s, 转移上清液至新的 2mL 离心管中。  
离心力不应超过 10,000 $\times g$ , 并且离心时应在旁边观察离心机是否能正常运作。如若土壤沉淀效果不佳, 可再次 10,000 $\times g$  离心 3min。上清液约有 400-500 $\mu\text{L}$ , 可能还会含有一点土壤颗粒。
5. 加入 250 $\mu\text{L}$  Buffer C2, 涡旋 5s 后 4 $^{\circ}\text{C}$ 放置 5min。  
注: 可以跳过 5 分钟的孵育。但是为了获得更好的提取效果我们建议您保留该步骤。
6. 10,000 $\times g$  离心 1min, 转移上清液 (约 600 $\mu\text{L}$ ) 至新的 2mL 离心管中。  
此次上清液转移应避免吸到任何颗粒, 否则会影响 DNA 纯度。
7. 加入 200 $\mu\text{L}$  Buffer C3 混匀, 4 $^{\circ}\text{C}$ 放置 5min。  
注: 可以跳过 5 分钟的孵育。但是为了获得更好的提取效果我们建议您保留该步骤。
8. 10,000 $\times g$  离心 1min, 转移上清液 (约 750 $\mu\text{L}$ ) 至新的 2mL 离心管中。  
此次上清液转移应避免吸到任何颗粒, 否则会影响 DNA 纯度。
9. 加入 1.2mL Buffer C4, 涡旋 5s。
10. 把吸附柱套在 2mL 收集管中。将上个步骤所得溶液取 700 $\mu\text{L}$  加入柱中, 10,000 $\times g$  离心 1min。离心完后倒掉收集管中的废液。重复该步骤, 直到溶液全部完成上柱过滤。  
注: 由于混合液体积较大 (约 2mL), 通常需要分 3 次离心上柱。
11. 向吸附柱中加入 500 $\mu\text{L}$  Buffer C5 (使用前确认已加入无水乙醇), 10,000 $\times g$  离心 30s, 离心完后倒掉收集管中的废液。
12. 向吸附柱中加入 500 $\mu\text{L}$  70%乙醇, 10,000 $\times g$  离心 30s, 离心完后倒掉收集管中的废液。

13. 倒掉收集管中的废液后将吸附柱再次套入收集管中, 12,000 $\times g$  离心 2min 以除尽 Buffer C5。将吸附柱移入新的 1.5 mL 离心管, 开盖室温静置 5-10 min 彻底晾干。  
注意: Buffer C5 中的乙醇残留会影响后续的酶反应实验。
14. 向吸附柱膜中间位置悬空滴加 50-100 $\mu\text{L}$  Buffer C6, 室温静置 2min 后, 最大转速 (~13,400 $\times g$ )离心 2min 收集 DNA 溶液。丢弃柱子, 盖上离心管盖子置于-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。  
注意: 洗脱体积不应小于 30 $\mu\text{L}$ , 体积过少会影响回收效率。洗脱液的 pH 值对于洗脱效率有很大影响。若后续做测序, 需使用 ddH<sub>2</sub>O 做洗脱液, 并保证其 pH 值在 7.0-8.5 范围内, pH 值低于 7.0 会降低洗脱效率。为了提高 DNA 的回收量, 可将 Buffer C6 加热 (约 60 $^{\circ}\text{C}$ ) 并洗脱两次, 可增加约 15-20%得率。

**常见问题:**

1. DNA 无法扩增
  - 确保通过凝胶电泳或分光光度计读数检查 DNA 产量和纯度。过量的 DNA 投入量会抑制 PCR 反应。
  - 如果尝试上述步骤后 DNA 仍然无法扩增, 则可能需要进行 PCR 优化 (改变反应条件和引物选择)。
2. 浓缩洗脱的 DNA
  - 如洗脱 DNA 的最终体积为 100 $\mu\text{L}$ , 可以通过加入 10 $\mu\text{L}$  5M NaCl 并颠倒 3-5 次混匀来浓缩 DNA。接下来加入 200 $\mu\text{L}$  100%预冷乙醇并颠倒 3-5 次以混合。在室温 (15-25 $^{\circ}\text{C}$ ) 下以最大转速 (~13,400 $\times g$ )离心 5 分钟。
  - 倒出所有液体。在高速真空吸尘器、干燥器或空气干燥器中除去残留的乙醇。在无菌水或无菌 10 mM Tris (pH 8.0) 中重悬沉淀的 DNA。
3. 加载凝胶时 DNA 从孔中浮出
  - 这通常是因为残留的 Buffer C5 残留在最终样品中。上述问题 2 中乙醇沉淀是去除残留 Buffer C5 的最佳方法。