



Soil And Stool DNA Kit

土壤与粪便DNA提取试剂盒

目录号：CW2091S（50 preps）

保存条件：Buffer RIL 2-8℃,其它组分室温（10-30℃）

产品内容

Component	CW2091S 50 preps
Buffer QSL	45 mL
Buffer RIL	11 mL
Buffer ML	10 mL
Buffer GW1 (concentrate)	13 mL
Buffer GW2 (concentrate)	26 mL
Buffer EBL	13 mL
RNase A	240 μL
Lysis Tubes II	50
Spin Columns DM With Collection Tubes	50

产品简介

本试剂盒提供了一种从土壤或粪便样本中提取总DNA，包括样本中的细胞、细菌、寄生虫以及病毒的总DNA的方法，也适用于含有高浓度PCR反应抑制剂的样本DNA的提取。本试剂盒采用独特的缓冲系统使裂解液中的DNA高效结合到吸附柱上，PCR和酶反应的抑制剂以及残留的杂质可通过洗涤步骤有效去除，最后使用低盐缓冲液或水洗脱，即可获得高纯度DNA。纯化得到的DNA可以直接用于二代测序(16S扩增子和宏基因组)、文库构建、PCR、qPCR、Southern Blot、酶切分子标记等下游实验。

自备试剂

1. 恒温混匀仪——货号：CW2593
2. 无水乙醇，异丙醇
3. 涡旋振荡仪或组织研磨仪

实验前准备及重要注意事项

1. 样品应避免反复冻融，否则会导致提取的DNA片段较小且提取量下降。
2. 第一次使用前应按照试剂瓶标签的说明预先在Buffer GW1（concentrate）和Buffer GW2（concentrate）中加入无水乙醇。
3. Buffer RIL待即将使用前取出，用完立即放在 2-8℃ 储存。

操作步骤

1. 短暂离心Lysis Tube以使珠子沉淀在底部。
2. **a.** 向Lysis Tube中加入0.1-0.3 g土壤或粪便样本，加入740-820 μL Buffer QSL与4 μL RNase A，旋紧管盖，短暂涡旋以混合。
b. 若为非裂解型粪便保存液（例如CWY041S和CWY041M）保存的粪便样本，向Lysis Tube中加入200 μL -600 μL 固液混合物，13000 rpm离心1 min，弃掉保存液（若离心后的固体量过少，可再次富集，但不宜超过0.3g）。加入620 μL Buffer QSL和4 μL RNase A，旋紧管盖，短暂涡旋以混合。
3. 将Lysis Tube固定在装有2 mL适配器的振荡研磨装置中，并根据您的设备使用优化的研磨条件进行处理（参见附录）。
4. 将Lysis Tube在恒温混匀仪上以70 $^{\circ}\text{C}$ ，1200 rpm振荡10 min。随后13000 rpm离心2 min以沉淀固体颗粒。转移540 μL 上清液至新的2 mL离心管。
5. 加入180 μL Buffer RIL，涡旋5 sec，13000 rpm离心2 min。
注意：Buffer RIL待即将使用前取出，用完立即放在2-8 $^{\circ}\text{C}$ 储存。
6. 在新的离心管中依次加入160 μL Buffer ML、480 μL 步骤5的上清液、320 μL 异丙醇，涡旋5秒。
7. 将上步中溶液转移650 μL 到到已装入收集管的吸附柱（Spin Columns DM）中，12,000 rpm（ $\sim 13,400\times g$ ）离心1分钟。
8. 倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。重复步骤7直至溶液全部转移完。
9. 向吸附柱中加入500 μL Buffer GW1（使用前检查是否已加入无水乙醇），12,000 rpm离心1分钟，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。
10. 向吸附柱中加入500 μL Buffer GW2（使用前检查是否已加入无水乙醇），12,000 rpm离心1分钟，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。
11. 重复步骤10。
12. 12,000 rpm离心2分钟，倒掉收集管中的废液。将吸附柱置于室温数分钟，以彻底晾干。

注意：这一步的目的是将吸附柱中残余的乙醇去除，乙醇的残留会影响后续的酶促反应（酶切、PCR等）。

13 将吸附柱置于一个新的离心管（自备）中，向吸附柱的中间部位悬空滴加50-200 μL Buffer EBL或灭菌水，室温放置2-5分钟，12,000 rpm离心1分钟，收集DNA溶液， -20°C 保存DNA。

注意：1) 离心之前室温孵育5分钟可以增加产量。

2) 用另外的50-100 μL 洗脱缓冲液或灭菌水再次洗脱可以增加产量。

3) 如果要提高DNA的终浓度，可以将步骤13所得的DNA洗脱液重新加至吸附膜上，重复步骤13，但可能会减少总产量。

4) 洗脱缓冲液不含螯合剂，请置于 -20°C 保存DNA。

5) 基因组DNA模板中残余的微量PCR抑制物可能对PCR反应产生不良影响，可将DNA稀释2-10倍通常即可解决。

附录：使用以下方法之一研磨样本

1. 在涡旋振荡仪上以最大速度手动涡旋振荡10分钟。
2. 在搭配有1.5-2 mL水平离心管支架的涡旋振荡仪上以最大速度振荡10分钟（让Lysis Tube保持水平放置）。若样本数量超过12，延长5-10分钟。
例如使用Scientific Industries或Mobio的Vortex-Genie2 涡旋振荡仪。
3. 使用Qiagen的TissueLyser II时，以25Hz研磨10分钟。
4. 使用Qiagen的PowerLyzer 24 Homogenizer时，以2000 rpm 的速度均质化30秒，暂停30秒，然后以2000 rpm的速度再次均质化30秒。
5. 使用MP Biomedicals的FastPrep-24时，推荐速度为6.0，时间为40秒。