



土壤基因组 DNA 提取试剂盒 (目录号: RTG2403)

● 试剂盒内容及保存:

试剂盒组成	RTG2403 (50 次)	贮存方式
缓冲液 R1	40 ml	常温
缓冲液 R2	6 ml	常温
缓冲液 R3	6 ml	常温
缓冲液 R4	10 ml	常温
缓冲液 R5 (浓缩液)	15 ml	常温
漂洗缓冲液 WB1	30 ml	常温
漂洗缓冲液 PW (浓缩液)	13 ml	常温
洗脱缓冲液 EB	15 ml	常温
Glass beads	20 g	常温
吸附柱 CG	50 个	常温
收集管 (2 ml)	50 个	常温
说明书	1 份	

● 储存条件和效期:

本试剂盒在室温 (25℃左右) 干燥条件下, 可保存 1 年。缓冲液 R2 和 R3 可能有沉淀产生, 若溶液产生沉淀, 应在使用前置于 37℃ 下溶解沉淀至溶液澄清后再使用。

● 产品简介:

土壤样品存在大量的抑制因子如腐殖酸、金属离子等, 而纯化的 DNA 中只要有这些微量物质的存在, 都会影响到 PCR 等酶促反应。本公司的土壤试剂盒采用独特的腐殖酸去除液 (缓冲液 R2) 能够有效去除腐殖酸; 吸附柱 CG 能有效去除金属等抑制因子, 提纯得到的基因组 DNA 可直接用于 PCR 反应, 酶切或定量实验。

● 准备工作:

1. 准备 55℃, 70℃ 水浴; 无水乙醇; 异丙醇; 制冰机; 1.5ml 离心管; 2ml 离心管
2. 按照标签所示在漂洗缓冲液 PW 中加入无水乙醇; 缓冲液 R5 中加入异丙醇, 混匀后盖紧瓶盖后室温贮存备用。
3. 每次使用前请检查缓冲液 R2, 缓冲液 R3 是否有沉淀生成, 如果出现沉淀, 37℃ 温浴至沉淀溶解后再使用。

● 标准操作步骤:

如非指出, 所有离心步骤均为使用台式离心机在室温下离心。

1. 称 0.3-0.5 g 土壤置于 2ml 离心管中, 加入 0.4 g Glass Beads, 再加入 700 μ l 缓冲液 R1 与 100 μ l 缓冲液 R2。涡旋器高速震荡 3-5min。

注意: 对含水量丰富的样品, 可以预先离心除去部分水分后再称取样品。缓冲液 R2 是腐殖酸去除剂, 100 μ l 对大部分样品来说足以有效去除腐殖酸等抑制因子。对一些腐殖酸含量特别丰富的土壤, 缓冲液 R2 的量可以适当增加, 但不能超过 250 μ l, 否则会严重影响 DNA 的得率。

2. 加入 100 μ l 缓冲液 R3 (R3 如有沉淀 37 $^{\circ}$ C 水浴完全溶解后再用), 涡旋混匀。70 $^{\circ}$ C 水浴处理 10min。期间振荡几次。

注意: 如果要纯化革兰氏阳性菌的 DNA, 请在 70 $^{\circ}$ C 处理完后, 再 90 $^{\circ}$ C 水浴处理 2min。

3. 12000 rpm (~13,000g) 离心 1 分钟, 取 600 μ l 上清到 1.5ml 离心管中, 加入 180 μ l 缓冲液 R4 混匀。

注: 转移上清时确保不要吸取到沉淀, 转移的上清量最好不超过 80%。

4. 冰上放置 5 分钟。12000 rpm (~13,000g) 离心 1 分钟。转移上清到新的 1.5ml 离心管中。

注: 转移上清时确保不要吸取到沉淀, 转移的上清量最好不超过 80%。

5. 加入与上清等体积的缓冲液 R5 (使用前请检查是否已加入异丙醇), 颠倒混匀。

6. 取 750 μ l 混合液加到吸附柱中 (吸附柱放入收集管中), 12000 rpm (~13,000g) 离心 30 秒, 倒掉滤出液。

7. 将剩余的混合液加到吸附柱中 (吸附柱放入收集管中), 12000rpm (~13,000g) 离心 30 秒, 倒掉滤过液。

8. 向吸附柱 CG 中加入 500 μ l 漂洗缓冲液 WB1, 12,000 rpm (~13,000 \times g) 离心 30 秒, 倒掉废液。

9. 向吸附柱 CG 中加入 600 μ l 漂洗缓冲液 PW (使用前请先检查是否已加入无水乙醇), 12,000 rpm (~13,000g) 离心 30 秒, 倒掉废液, 吸附柱 CG 放入收集管中。

10. 向吸附柱 CG 中加入 600 μ l 漂洗缓冲液 PW, 12,000 rpm (~13,000g) 离心 30 秒, 倒掉废液, 将吸附柱 CG 放入收集管中。

11. 12,000 rpm (~13,000g) 离心 2 分钟, 以彻底晾干吸附材料中残余的漂洗液。

注: 此步骤非常重要, 其目的是将吸附柱中残余的漂洗液去除。漂洗液中乙醇的残留会影响后续的酶反应 (酶切、PCR 等) 实验。

12. 将吸附柱 CG 转入一个干净的 1.5ml 离心管中, 向吸附膜的中间部位悬空滴加 50–100 μ l 经 70 $^{\circ}$ C 水浴预热的洗脱缓冲液 EB, 室温放置 2 分钟, 12,000 rpm (~13,000g) 离心 2 分钟。

注: ① 洗脱缓冲液体积最好不少于 50 μ l, 体积过小影响回收效率。

② 洗脱液的 pH 值对于洗脱效率有很大影响。若用水做洗脱液应保证其 pH 值在 7.0-8.5 范围内, pH 值低于 7.0 会降低洗脱效率。

13. DNA 产物 -20 $^{\circ}$ C 保存。

大量操作步骤 (针对含微量核酸的样品)

1. 称 1-5g 土壤置于 10ml 离心管中, 加入 1g Glass Beads, 再加入 3ml 缓冲液 R1 与 200 μ l 缓冲液 R2。涡旋器高速震荡 3-5 分钟。

2. 加入 600 μ l 缓冲液 R3, 涡旋混匀。70 $^{\circ}$ C 水浴处理 10 分钟。期间振荡几次。

3. 3000g 离心 3 分钟, 转移上清到新的离心管中, 加入 550 μ l 缓冲液 R4 混匀。

4. 冰上放置 5 分钟。8000g 离心 10 分钟。转移上清到新的离心管中。

5. 以下按标准操作步骤的第五步继续操作。

● DNA 浓度及纯度检测:

基因组 DNA 片段的大小与样品保存时间、操作过程中的剪切力等因素有关。提取的 DNA 片段可用琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测浓度与纯度。可配制 0.8-1.0% 琼脂糖凝胶, 使用 λ /HindIII 判断基因组的大小, 完整的基因组大小应在 23kb 以上。使用分光光度计检测时, OD_{260}/OD_{280} 比值应为 1.7–1.9 之间, 如果洗脱时不使用洗脱缓冲液, 而使用去离子水洗脱, 比值可能偏低, 但并不表明 DNA 纯度不高。

● 常见问题分析:

常见问题	可能原因	建议
没有洗脱出 DNA	缓冲液 R5 没有加入异丙醇	样品过柱前, 必须用异丙醇调整核酸结合条件, 否则核酸不能挂柱。
	漂洗缓冲液 PW 中没有加入乙醇	漂洗缓冲液 PW 使用前请按照标签加入无水乙醇。无水乙醇加入量不正确会导致核酸提取量大大降低。
低浓度的 DNA 量	缓冲液 R2 使用过量	按照步骤 1 加入适量缓冲液 R2
	洗脱体积太小	洗脱体积不能低于 50 μ l, 如洗脱体积太小, 回收率将大大降低。
	洗涤不恰当	漂洗缓冲液 PW 使用前请按照标签加入无水乙醇。无水乙醇加入量不正确会导致核酸提取量大大降低。
低 A ₂₆₀ /A ₂₈₀ 比率	蛋白污染	不要忽略步骤 8 中用漂洗缓冲液 WB1 冲洗吸附柱
	洗脱液 pH 值不合适	确保使用的洗脱液 pH 在 8.0 以上, 如低于 8.0 将导致 DNA 洗脱量过低。
下游应用不好	提取的 DNA 含盐量高	漂洗缓冲液 PW 使用前请按照标签加入无水乙醇。
	提取的 DNA 含有乙醇	步骤 11 空甩柱子 2 分钟非常关键, 彻底去除漂洗液中的乙醇。
	抑制 PCR 反应	增加缓冲液 R2 用量, 彻底去除腐殖酸等 PCR 抑制因子; 步骤 4 中确保不要吸取到沉淀。