



中科瑞泰（北京）生物科技有限公司

Tel: 400-699-06931

http:// www.real-tims.com.cn

E-mail: real-times@vip.163.com

土壤基因组 DNA 提取试剂盒

货号	产品名称	规格
RTG2403	土壤基因组 DNA 提取试剂盒	50 次

● 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 (浓缩液)	14 ml	常温
漂洗缓冲液 PW (浓缩液)	13 ml	常温
洗脱液 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°C 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°C 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°C, 70°C 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 WB1 和漂洗缓冲液 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°C 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除去腐殖酸等抑制因子。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(\sim 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(\sim 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(\sim 13,000g)离心 30 秒, 倒掉滤出液。
7. 将剩余混合液加到吸附柱中(吸附柱放入收集管中), 12000rpm(\sim 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(使用前请先检查是否已加入无水乙醇), 12,000 rpm (\sim 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 (\sim 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 (\sim 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(\sim 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(\sim 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 1-5 g 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。8000 g 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，OD₂₆₀/OD₂₈₀ 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。