

PowerSoil® DNA Isolation kit

强力土壤®DNA提取试剂盒

货号	提取次数
12888-50	50次
12888-100	100次

宝杰罗生物科技有限公司

地址：北京市朝阳区广渠东路3号院申奥商务楼

邮编：100022

电话：010-65945597/ 010-65919547

传真：010-65919547

手机：13717768726

E-mail: biogenro88@126.com

公司网站：

<http://www.biogenro.net>

<http://www.biogenro.com>

简介

PowerSoil® DNA Isolation Kit包含了我们创新专利抑制因子去除技术®（IRT），用于提取所有类型环境样品高质量DNA。环境样品包括堆肥、底泥、粪肥等富含腐植酸的各种难提土样样品。提取出来的高质量DNA可直接进行PCR扩增。PCR扩增结果表明提取到了多种微生物，其中包括细菌（如枯草芽孢杆菌、炭疽杆菌）、真菌（如酵母、霉菌）、藻类和放线菌（如链霉菌）。

珠磨研磨

PowerSoil® DNA Isolation Kit 不需要使用高速度强力珠磨研磨设备。若目的微生物需要比涡旋仪还要强力的均质器才能提取得到，此试剂盒也可以用在PowerLyzer™ 珠磨研磨机上。MO BIO现在专门提供了PowerLyzer™ PowerSoil® DNA Isolation Kit（货号：12855-50），一款使用了适合强力珠磨研磨的研磨珠套管的土壤DNA提取试剂盒。

相关产品	货号	数量
PowerMax® Soil DNA Isolation Kit	12988-10	10 Preps
PowerSoil®-htp 96Well Soil DNA Isolation Kit	12955-4	4×96 Preps
	12955-12	12×96 Preps
Ceramic Bead Tubes, 1.4 mm	13113-50	50 tubes
Glass Bead Tubes, 0.5 mm	13116-50	50 tubes
Glass Bead Tubes, 0.1mm	13118-50	50 tubes
PowerVac™ Manifold	11991	1 manifold
PowerVac™ Mini System	11992	1 unit + 20 adapters
PowerVac™ Mini Spin Filter Adapters	11992-10	10 adapters
	11992-20	20 adapters

设备要求:

微型离心机 (10000g)

移液器 (50µl~500µl)

Vortex-Genie®2 涡旋仪 (MO BIO货号#13111-V-220)

涡旋仪适配器 (MO BIO货号#13000-V1或13000-V1-24)

试剂盒组分

	货号: 12888-50	货号: 12888-100
组分	量	量
PowerBead Tubes (contain 750 µl solution)	50	100
PowerSoil®Solution C1	3.3ml	6.6ml
PowerSoil®Solution C2	14ml	28ml
PowerSoil®Solution C3	11ml	22ml
PowerSoil®Solution C4	72ml	144ml
PowerSoil®Solution C5	30ml	2×3ml
PowerSoil®Solution C6	6ml	12ml
PowerSoil®Spin Filters (units in 2 ml tubes)	50	100
PowerSoil 2 ml Collection Tubes	200	400

△实验前请先逐一检查试剂!

保存

组分室温 (15-30°C) 保存。

操作步骤:

1、加入0.25g土壤样品到一个PowerBead Tubes中

这一步发生了什么:加入样品后, 下一步就是研磨均质以及细胞裂解。PowerBead Tube中含有的缓冲液可 (a) 有助散开土壤, (b) 初步溶解腐植酸, (c) 保护核酸免于降解。

2、轻轻涡旋混匀

这一步发生了什么:混匀分散开各组分。

3、检测C1溶液。若出现沉淀, 60°C水浴至全溶解

这一步发生了什么: C1溶液含有SDS以及其它用于细胞裂解的试剂。SDS作为去垢剂, 能破坏细胞膜上的脂肪酸、脂质。温度过低时会产生沉淀。60°C孵育可重溶SDS, 并可趁热使用。

4、加入60µl C1溶液, 上下颠倒数次混匀

5、把PowerBead Tubes固定在涡旋仪适配器上, 最大转速 (3200rpm, 若涡旋仪达不到此速度, 可适当延长5~10min) 涡旋连续振荡10min (若使用24头适配器同时处理12个样品, 涡旋时间延长5-10min)。

【注意: 涡旋振荡步骤对于研磨均质和细胞裂解至关重要。步骤1~4的化学试剂作用, 这一步引入机械作用。外形不规则而锋利的研磨珠随机碰撞, 充分打开细胞膜释放细胞内容物。】

这一步发生了什么: 微生物细胞在化学 (裂解缓冲液) 和机械 (涡旋振荡) 力共同作用下崩解。许多类型微生物细胞只有在这种化学加珠研磨作用力下才会裂解。使用涡旋仪适配器可提供相同的力矩和角度最大化研磨效

果。避免使用胶带固定, 以免震动过程中松脱影响研磨效果。

6、室温10000g离心30s

7、转移上清至一个干净的2ml Collection Tube (试剂盒提供) 中

【注意：注意：大约可获得400-500 μ l上清液。回收到的上清体积取决于土样的吸水性且不影响处理效果。上清可能颜色较深并含有少量土样，下面步骤可解决这两个问题。】

8、加入250 μ l C2溶液到上清中，涡旋混匀5s。4 $^{\circ}$ C孵育5min

这一步发生了什么：C2溶液是IRT（抑制因子去除技术）重要组成之一。含有组分可沉淀那些会影响DNA纯度和下游实验的非DNA的有机、无机物质，如腐植酸、细胞碎片、蛋白质等。

9、室温10000g离心1min

10、避开沉淀小珠，转移上清 \leq 600 μ l到一个新的收集管中

这一步发生了什么：沉淀物含有细胞碎片、土壤、研磨珠以及腐植酸等。为了更高的DNA得率和纯度，尽量避免吸到沉淀物。

11、加入200 μ l C3到上清中，涡旋混匀。4 $^{\circ}$ C孵育5min

这一步发生了什么：C3溶液是另一个IRT（抑制因子去除技术）重要组成。含有组分可进一步沉淀那些会影响DNA纯度和下游实验的非DNA的有机、无机物质，如腐植酸、细胞碎片、蛋白质等。

12、室温10000g离心1min

13、避开沉淀小珠，转移上清 \leq 750 μ l到一个新的收集管中

这一步发生了什么：沉淀物含有细胞碎片、土壤、研磨珠以及腐植酸等。为了更高的DNA得率和纯度，尽量避免吸到沉淀物。

14、C4溶液使用前先摇匀。加入1200 μ l C4溶液到上清中，涡旋混匀5s

这一步发生了什么：C4是一个高浓度盐溶液。此步为了调整DNA溶液的盐浓度。DNA在高盐环境下可牢牢地吸附在硅胶滤膜上，大部分其它非DNA的有机无机成分不会吸附。但仍然会少量残留。

15、加载约675 μ l 上清到Spin Filter中，室温10000g离心1min。弃去滤液，继续加载675 μ l上清，室温10000g离心1min。重复直至过滤完所有上清。

【注意：每个样品共需加载3次。】

这一步发生了什么：DNA在高盐环境下选择性地吸附到硅胶滤膜上。

16、加入500 μ l C5到Spin Filter中，室温10000g离心30s

这一步发生了什么：C5是以酒精为主的冲洗缓冲液，可进一步去除滤膜上非DNA成分的盐份、腐植酸等杂质。

17、弃去上清

这一步发生了什么：滤液不含DNA。

18、室温10000g离心1min

这一步发生了什么：进一步去除残留C5溶液（酒精冲洗液）。为避免残留的酒精成分影响PCR、酶切、胶回收等下游实验，必须充分去除C5溶液（可吹干）。

19、小心转移Spin filter到2ml Collection Tube（试剂盒提供）中，尽量避免C5溶液污染

【注意：注意：极力避免酒精冲洗液污染。】

20、加入100 μ l C6溶液到白色滤膜中心

【注意：注意：C6要加到滤膜中心，并保证整个薄膜能充分润湿。可选：无菌DNA-Free PCR Grade water 货号#17000-10也可适用于DNA洗脱。若担心DNA降解，可使用无菌TE缓冲液代替C6进行洗脱。】

21、室温10000g离心30s

22、弃去Spin Filter。此时收集管中的DNA可直接用于下游实验，无需进一步纯化

建议DNA冷冻保存（-20 $^{\circ}$ C~-80 $^{\circ}$ C）。C6溶液不含EDTA。

若使用PowerVac™ Manifold抽吸代替离心

每个样品使用一个Spin Filter离心管。保持Spin Filter安放在2ml Collection Tube中知道需要真空抽吸滤过。记号笔标记标注好Collection Tube顶部及Spin Filter。若Spin Filter在过滤过程中堵塞，仍可以改为常规离心继续提取DNA。

此操作说明书第四步需要外自备100%乙醇。

1、每一个样品需要安装一个铝质PowerVac™ Mini Spin Filter Adapter（MO BIO货号：11992-10或11992-20）到manifold的鲁尔接口上。轻轻用力安紧Spin Filter。关闭manifold其它所有不用的接口。

【注意：铝质PowerVac™ Mini Spin Filter Adapters可重复使用。】

- 2、加载650µl样品裂解物（接上文步骤14）到Spin Filter。
- 3、打开真空泵，打开使用的端口的阀门。打开阀门是扶稳Spin Filter，保持直立。等待裂解物全部通过滤膜，再加650µl裂解物。继续抽吸滤过。关闭阀门。
【注意：可关闭已抽滤的端口，以提高其它端口压力，加快抽滤速度。】
- 4、加入800µl 100%乙醇到Spin Filter。扶稳Spin Filter，打开阀门抽滤。抽滤完成后关闭阀门。
- 5、每个Spin Filter加入500µl C5溶液。打开阀门抽滤。当所有C5滤完后，继续抽滤1 min，抽干滤膜。关闭所有端口。
- 6、关闭真空泵。打开一个未使用的端口释放manifold的压力。若20个端口都在使用，断开真空泵连接。进入下一步操作前确保真空压力已释放。必须先关闭真空泵，防止滤液倒流。
- 7、拿下Spin Filter，放回到原来标记的相应2ml Collection Tube中。10000g离心1 min以充分干燥滤膜。
- 8、把Spin Filter转移到一个新的2ml Collection Tube（试剂盒提供）中，加入100µl C6到白色滤膜中心。
可选：可适用无菌DNA-Free Water洗脱DNA（货号：17000-10）。
- 9、室温10000g离心30s。
- 10、弃去Spin Filter。此时滤液中的DNA可直接用于下游实验，无需进一步处理。

疑点难点

加样量：

此试剂盒的设计加样量是0.25g。不同土样类型加样量请参照下表：

土样类型	建议最大加样量（g）
干沙土 Dry sandy soil	0.5
干粘土 Dry clay	0.25
湿粘土 Wet clay	0.25
陶土 Potting Soil	0.1
底泥 Sediment	0.25
壤土 Loam	0.25
泥炭土 Peat moss	0.1
肥沃农田土壤 Rich farm soil	0.25
改良土 Amended soil	0.15
堆肥 Compost samples	0.1

* 5g以上土壤DNA大量提取，建议用PowerMax Soil（货号：12988-10）

湿土：

若土样含水量较高，可先行于灭菌Tube室温10000g离心30s，尽量去除上清。然后转入PowerBead Tube进入下一步处理。

最终DNA呈棕色：

我们从未遇到使用PowerSoil的最终DNA呈棕色。若遇到此情况，请与我们联系。

可选裂解方法（真菌、孢子样品DNA提取）：

- 加入C1溶液后，涡旋3~4s混匀，70℃孵育5min。涡旋3~3s，70℃再孵育5min。涡旋3~4s。此可选步骤能增加DNA得率，但同时会降低DNA完整性。
- 若细胞非常难裂解，可加入C1溶液后70℃孵育10min，然后进行第五步继续操作。

附加应用与文献

根尖/菌根 (Root tips/Mycorrhizae)

微生物入侵植物根尖，以及菌根的现象在许多植物种类中比较普遍。为了更好地提取组织内外分布的微生物，建议把研成粉末的组织加入到Bead Tube中进行处理。

相关文献:

De Souza, F.A., G.A. Kowalchuk, P. Leeflang, J.A. van Veen, and E. Smit. 2004. PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Profiling of Inter- and Intraspecies 18s rRNA Gene Sequence heterogeneity is an Accurate and Sensitive method to Assess Species Diversity of Arbuscular Mycorrhizal Fungi of the Genus Gigaspora. *Appl. Environ. Microbiol.* 70 (3): 1413-1424.

微生物垫和生物薄膜 (Microbial Mats and biofilms)

微生物垫与生物薄膜广泛分布在自然环境中。生物垫或薄膜为栖息在其中的微生物群落提供保护，直接研磨均质整个微生物垫和生物薄膜，处理效率非常低。建议使用PowerBiofilm™ DNA and RNA Kit。

真菌垫 (Fungal Mats)

PowerSoil适合提取生长在培养基中的真菌DNA。处于生长旺期的真菌菌丝含有大量DNA，可采集这部分样品进行提取。为了提高破壁效率，样品加入到Bead tube后，可于-70℃或-20℃至完全冻结，然后立刻转移到65℃水浴。重复一遍，然后加入C1，进入下游步骤。。

土壤孢子 (细菌、真菌)

真菌孢子外壁含丰富的多糖，因此比细菌孢子更难裂解。采用上文的反复冻融，以及70℃孵育15min，可提高细胞裂解效率。若只是从纯培养中提取孢子，建议使用UltraClean Microbial DNA Isolation Kit (MO BIO Catalog# 12224-50)。

粪便样品以及牛粪肥

PowerSoil可以在不修改操作步骤的境况下提取绝大多数粪便样品。

相关文献:

1. Clement, B.G., and C.L. Kitts. 2000. Isolating PCR Quality DNA from Human Feces with a Soil DNA Kit. *Biotechniques* 28(4): 640-644.
2. Ibekwe, A.M., P. Watt, C. Grieve, V. Sharma, and S. Lyons. 2002. Multiplex Fluoregenic Real-Time PCR for Detectio and Quantification of Escherichia coli O157:H7 in Dairy Wastewater Wetlands. *Appl. Environ. Microbiol.* 68(10): 4853-4862.
3. Ibekwe, A.M., C.M. Grieve, and S.R. Lyon. 2003. Characterization of Microbial Communities and Composition in Constructed Dairy Wetland Wastewater Effluent. *Appl. Environ. Microbiol.* 69(9): 5060-5069.
4. Trochimchuk, T., J. Fotheringham, E. Topp, H. Schraft, and K.T. Leung. 2003. A comparison of DNA extraction and purification methods to detect Escherichia coli O157:H7 in cattle manure. *J. Microbiol. Methods* 54: 165-175.

瘤胃样品:

相关文献中详细描述了用PowerSoil提取瘤胃样品PCR级纯度DNA的方法。瘤胃样品中微生物非常活跃，不过同时也含有大量多糖多酚。这些杂质会抑制下游分子生物学实验。使用UltraClean Soil 或PowerSoil，加上文献提供的操作优化步骤，可提取到高质量的DNA。

相关文献:

Mackie, R.I., R.I. Aminov, W. Hu, A.V. Klieve, D. Ouwerkerk, M.A. Sundest, and Y. Kamagata. 2003. Ecology of Uncultivated Oscillospira Species in the Rumen of Cattle, Sheep and Reindeer as Assessed by Microscopy and Molecular Approaches. *Appl. Environ. Microbiol.* 69(11): 6808-6815.

昆虫样品:

此类样品可用UltraClean® Tissue & Cells DNA Isolation Kit进行提取。

珊瑚礁 (Coral Reef)

PowerSoil也同样适合提取珊瑚样品中共生的微生物PCR级纯度基因组DNA。从珊瑚礁上取1.3cm直径的珊瑚块，10X TE缓冲液冲洗获得微生物。把沉淀下来的微生物细胞连同缓冲液一起用PowerSoil或Ultrasoil提取DNA。下文献有更多操作细节。

相关文献:

Rohwer, F., M. Breitbart, J. Jara, F. Azam, and N. Knowlton. 2001. Diversity of bacteria associated with the Caribbean coral *Montastraea franksi*. *Coral Reefs* 20: 85-91.

