

Onestep-Lysis® Plus DNA Kit for Soil and Feces (Bead Beating)

土壤 / 粪便DNA提取试剂盒（强力型珠磨法）

目录号：AO3106

试剂盒组成

Component	AO3106 (50 T)	AO3106 (200 T)
PowerBead Pro	40 g	160 g
Sodium Phosphate Buffer	40 ml	80 ml * 2
MT Buffer	8 ml	40 ml
PPS (Protein Precipitation Solution)	10 ml	40 ml
IRS Solution	10 ml	40 ml
PQ Solution	60 ml	120 ml * 2
Buffer WB2 (concentrate)	13 ml	25 ml * 2
Buffer WB2 (concentrate)	第一次使用前按标签说明加入指定量无水乙醇	第一次使用前按标签说明加入指定量无水乙醇
Buffer EB	10 ml	20 ml
Spin Columns AC with Collection Tubes	50	200

保存方法

室温（15 - 30℃）保存。

产品介绍

使用Onestep-Lysis® Plus DNA Kit for Soil and Feces (Bead Beating)可以在20 min内快速、有效地从土壤等环境样品中直接分离出纯度较高且满足建库测序的高质量基因组DNA。快速DNA提取方法不使用有害的有机溶剂，如苯酚和氯仿。该试剂盒采用一种全新的、独特的方法来去除包括一些难处理的环境样本类型，如堆肥、淤泥、沉积物和粪肥，可从土壤样品中提取所有的细菌、真菌、植物和动物的基因组DNA。

试剂盒包括四个部分：

裂解

高强度陶瓷研磨珠，旨在有效地溶解所有不同来源的微生物，包括真菌孢子和芽孢、革兰氏阳性细菌、酵母、藻类、线虫和真菌。使用类似MP的Fast Prep珠磨设备进行研磨混匀处理，可在40 s内将土壤微生物细胞进行裂解。

均质化试剂

MT Buffer和Sodium Phosphate Buffer都经过精心挑选和准备，使完整的样本均质化和蛋白增溶，提取的基因组DNA含有最少的RNA残留。

杂蛋白和腐殖酸去除试剂

PPS和IRS Solution分别用来沉淀样本中杂蛋白和高腐殖酸，防止其对后续实验造成抑制。

DNA纯化和洗脱试剂

使用专门的硅胶基质膜进行程序化DNA纯化步骤，同时消除污染物，抑制污染物带来的并发反应。

- * PQ Solution促使DNA结合到吸附柱
- * Buffer WB2（盐乙醇洗涤液，第一次使用前按照标签标识加入指定量无水乙醇）
- * Spin Columns AC（DNA吸附硅胶柱）
- * Buffer EB（DNA洗脱液）

操作步骤（以下所有离心步骤均在室温下进行）

样本制备

取0.75 g PowerBead Pro（研磨珠）至2 ml离心管，加入0.25 - 0.5 g土壤样品。

注意：农田土、山林土、粉尘、沙土等可适当提高上样量，最高不超过0.5 g；腐土、堆肥、沉积物、淤泥和粪便、肠道内容物等建议上样量为0.25 g；液态样本则转移200 μl至离心管。

裂解

加入800 μl Sodium Phosphate Buffer和160 μl MT Buffer，上下颠倒混匀。

注意：储存温度低时MT Buffer可能会析出和沉淀，使用前请检查，如果有沉淀析出可65℃水浴加热至溶解后使用。

放入珠磨仪中研磨40 s匀浆。

如MP Fast Prep®匀浆仪速度参数设置为6.0。不同的珠磨仪因功率不同，应根据仪器设置合适的速度参数。

12,000 rpm (~13,400 g)离心2 min，转移上清到1.5 ml离心管。

1) 预期上清体积在550 - 700 μl之间，吸取少量样本碎片不会影响后续操作。2) 离心后上层可能会有泡沫，只需转移上清，不要吸取泡沫。

加入150 μl PPS，涡旋混匀10 s，12,000 rpm离心2 min，转移上清到1.5 ml离心管。

加入200 μl IRS Solution，涡旋10 s，12,000 rpm离心2 min，转移上清到2 ml离心管。

上清体积通常不超过800 μl，可以剩余少许上清以确保吸取溶液时不碰触管底沉淀。

向上清液中加入 1.5 倍体积 P Q S o l u t i o n , 颠倒混匀 10 次 (此时可能会出现絮状沉淀) 。将得到的溶液和可能产生的絮状沉淀分多次转入已装入收集管的吸附柱 (S p i n C o l u m n s A C) 中 , 12,000 r p m 离心 30 s , 弃废液。通常需要分 3 次转入 , 每次不超过 720 μ l 。

向吸附柱 A C 中加入 600 μ l B u f f e r W B 2 (使用前检查是否加入无水乙醇 !) , 12,000 r p m 离心 30 s , 弃废液。

重复步骤 7。

将吸附柱放回空收集管内 , 12,000 r p m 离心 2 m i n , 弃收集管。

注意：这一步的目的是去除吸附柱中残余乙醇，乙醇残留会影响后续的酶促反应（酶切、P C R 等）。

将吸附柱 A C 放入新的离心管中，向吸附膜的中间部位悬空滴加 50 - 100 μ l B u f f e r E B , 室温放置 3 - 5 m i n , 12,000 r p m 离心 1 m i n , 得到 D N A 溶液。

注意：1) 一定范围内，使用更少的 B u f f e r E B , 可回收相对更高浓度的 D N A , 但洗脱体积不应少于 30 μ l 。

2) B u f f e r E B 在 65 $^{\circ}$ C 水浴中预热可增加回收效率。

3) B u f f e r E B 中不含有螯合剂 E D T A 成分，不影响下游酶切、连接等反应。也可以使用水洗脱，但应该确保 p H 大于 7.5 , p H 过低影响洗脱效率。

4) 将离心得到的 D N A 溶液重新加入到吸附柱中进行二次洗脱，D N A 回收量可提高 10 - 15 %。