

# D5625 Soil DNA Kit

## 土壤 DNA 提取 常见问题及排查方法

1. 土壤 DNA 产量主要来源样品内微生物、植物动物残渣，冰冻或贮存过程中 DNA 会发生不同程度的降解导致 DNA 含量降低或条带成较严重的涂抹状（即降解）。建议尽量使用新鲜样品或贮存时间较短样品进行 DNA 提取。
  2. 如果土壤样品中的水分含量比较多，建议先将水分离心去除后再进行提取。
  3. 实验前检查 DS Buffer 与 XP1 Buffer 是否有沉淀物析出，久置或低温都会让 DS Buffer 与 XP1 Buffer 析出沉淀，如有沉淀析出，需按照说明书提示：在 65°C 水浴至沉淀完全溶解。
  4. 实验前，HBC Buffer 必须按照说明书加入【异丙醇】稀释备用。请开盖闻气味确认已加入异丙醇稀释。稀释错误或未稀释会导致 DNA 无法挂柱结合，致提取失败。
  5. 实验前，DNA Wash Buffer 必须按照说明书加入【无水乙醇】稀释备用。请开盖闻气味确认是否已加入乙醇稀释。稀释错误或未稀释会导致 DNA 无法挂柱结合，致提取失败。
  6. 土壤样品主要是在 Disruptor Tubes 中依靠玻璃珠涡旋裂解，涡旋后应是个均匀的状态，如果涡旋后明显是不均匀的或有成块的土壤，可适当延长涡旋时间至其完全混匀。对于较大或较硬的土块，可在加入 Disruptor Tubes 之前先碾压细碎。如产物出现拖尾或严重涂抹的情况，可缩短涡旋时间至 3min，可缓解 DNA 断链情况。
  7. 在 250-1000mg 方案内，如异丙醇沉淀步骤无法看到沉淀（DNA 含量较低），可把离心后的管子置于 -20°C 冻存半小时，取出常温或 4°C 离心 10min，提高离心速度，延长离心时间至 20~30min，均可帮助 DNA 沉淀的析出。
  8. 若颜色比较深，或后续扩增不成功：
    - (1) 可能是土壤样品中含有的腐殖酸比较多导致的，如果后续扩增不成功，建议梯度稀释模板 2/5/10/50 倍再次进行 PCR，通常放大稀释倍数可以帮助 PCR 成功扩增；
    - (2) 在下次提取时，建议将加入 cHTR Reagent，静置 2min，离心取上清的步骤重复一次，cHTR Reagent 能吸附腐殖酸。
- 注意：试剂盒中 cHTR Reagent 的量是按照标准试剂盒配备的，如有重复该步骤的需要，cHTR Reagent 不够用可提供单独购买。
9. 将混合液转移到 HiBind DNA Mini Column 前，必须加入与转移出的上清等体积的 XP1 Buffer 涡旋混匀，正确调节 DNA 与柱子的结合条件。如没有加入或加入比例错误，DNA 将被全部冲掉，致提取失败。
  10. 注意过柱前需要加入等体积 XP1 Buffer 调节 DNA 与柱子的结合条件，否则 DNA

无法挂柱，致使提取失败。

11. 注意不要省略空柱子离心步骤，该步骤能除去柱子中残留的乙醇，否则可能会影响下游实验；如产物点电泳时无法正常沉降，绝大部分情况下由于空甩不完全，乙醇残留所致，可在下次提取中，提高离心机速度或延长空甩时间至 5~10min，可解决残留问题。

12. 如产物表现为电泳无条带或条带暗淡，通常可通过增加电泳上样量来解决。

13. 如产物浓度偏低：

(1) 建议将加入 DS Buffer 涡旋后的 70°C 孵育 10min 时间延长；

(2) 建议减少最后一步加入 Elution Buffer 的体积至 50 $\mu$ l；将 Elution Buffer 预热至 65°C 对提高产量有帮助；另外，在 DNA 提取时，【务必】进行二次洗脱，方可确保绝大部分 DNA 被完全洗脱。洗脱方法：将第一次洗脱的 Elution Buffer 重新吸回 HiBind<sup>®</sup> DNA Mini Column，室温等待 2-3min，再次离心。

14. 土壤属于复杂样本，提取的 DNA 条带通常会出现不同程度的涂抹拖带，属正常现象。若电泳条带涂抹拖带比较严重：

(1) 在产物中加入 RNase 至终浓度 < 20ng/ $\mu$ l 再跑电泳看看，如有改善，建议下次提取过程中按照说明书，增加 RNase 处理的步骤；

(2) 如加入 RNase 处理后仍得不到改善，建议将土壤样品和 725  $\mu$ l SLX-Mlus Buffer 加入到匀浆管后的涡旋的时间缩短至 2-3min。

15. 若电泳条带呈现弥散，建议将加入 DS Buffer 涡旋后的孵育条件：70°C 孵育 10min 改为 60°C 孵育 10min 或 70°C 孵育 5min。

如按照上述步骤仍无法排查问题，请提供单位名称及试剂盒条形码（即盒外标签 Lot 开头数字字母组合）核验正品货源，添加技术支持 QQ: 800848200 获取更多信息。