

土壤核酸提取试剂盒（磁珠法）说明书

说明书版本：1.0

【产品名称】

中文名称：土壤核酸提取试剂盒

英文名称：Soil Nucleic Acids Extraction Kit

【包装规格】

产品名称	货号	规格
Soil Nucleic Acids Extraction Kit	SN603-M10	10 T/盒
Soil Nucleic Acids Extraction Kit	SN603-M48	48 T/盒
Soil Nucleic Acids Extraction Kit	SN603-M96	96 T/盒

【预期用途】

用于土壤样本总核酸的提取、富集和纯化。

【检验原理】

土壤核酸提取试剂盒（本试剂盒）采用超顺磁性纳米颗粒以及独特的除杂技术，专门为土壤 DNA 提取而设计，适用于从新鲜或冷冻的土壤样本中提取及纯化核酸，能有效去除样本中的杂质，获得高质量、高纯度的总核酸。本试剂盒既可以进行手动操作，也适合于用自动化工作站进行高通量操作，所获核酸产物可供后续各种实验使用，如酶切、PCR、RT-PCR、文库构建、高通量测序等。

【主要成分】

表1 试剂盒主要成分及规格（如手工操作则不用试剂Buffer MB）

试剂组分名称	规格与数量(10T/盒)	规格与数量(48T/盒)	规格与数量(96T/盒)
Buffer SLB1	5 mL/瓶×1 瓶	25 mL/瓶×1 瓶	50 mL/瓶×1 瓶
Buffer SLB2	6.5 mL/瓶×1 瓶	33 mL/瓶×1 瓶	65 mL/瓶×1 瓶
Buffer PS	3 mL/瓶×1 瓶	15 mL/瓶×1 瓶	30 mL/瓶×1 瓶
Buffer SW1	8 mL/瓶×1 瓶	40 mL/瓶×1 瓶	80 mL/瓶×1 瓶
2 ml beads Tubes	0.8 g/管×10 管	0.8 g/管×148管	0.8 g/管×96 管
Buffer MB(Auto)	6 mL/瓶×1 瓶	30 mL/瓶×1 瓶	60 mL/瓶×1 瓶
Buffer SW2	16 mL/瓶×1 瓶	78 mL/瓶×1 瓶	155 mL/瓶×1 瓶
Buffer SE	2 mL/瓶×1 瓶	10 mL/瓶×1 瓶	20 mL/瓶×1 瓶
蛋白酶 K	0.2 mL/支×1 支	1 mL/支×1 支	2 mL/支×1支
SN300（磁珠）	0.5 mL/支×1 支	2.5 mL/支×1 支	5 mL/支×1支

【储存条件及有效期】

本试剂盒中不同试剂组分存储条件不同，请按表2所示分别储存。

表2 试剂储存条件及有效期

试剂组分名称	存储条件	有效期
蛋白酶 K	2-8°C	12 个月
SN300(磁珠)	2-8°C	12 个月
其他试剂	15°C-30°C 干燥环境	12 个月

注意：

1. 蛋白酶 K（货号：SN105）可 2-30°C 运输，请在收货后置于 2-8°C 储存；
2. 若溶液有沉淀析出，为正常现象，不影响试剂性能，使用前请将该溶液置于 37°C 水浴中预热 10 分钟，待沉淀溶解，摇匀后使用。

【自备材料】

水浴锅或金属浴。

【适用范围】

本试剂盒适用仪器：全自动核酸提取纯化仪（如天隆、赛默飞等品牌）。

【样本要求】

1. **新鲜制备的样本**：新鲜制备的土壤样本指 2小时内采集并置于土壤保存液中的样本，通常可常温保存 7天或在-80°C（及以下）保存 1 年；或

2小时内采集并置于土壤采集管（袋）中，于-80°C（及以下）保存 1 年。如采集后超过 2小时未进行处理，则会导致样本中微生物死亡，进而释放大量核酸酶，导致核酸结构被破坏及所提取的核酸产量下降。

2. 新鲜采集的样本：现取现用的样本，将样本置于 4°C保存、并于24小时内完成提取；无需现取现用的样本请参考“样本要求1”进行保存。为避免样本反复冻融，解冻时需加入土壤保存液，待混合均匀后分装保存（用阔口吸头吸取样本悬液 3-5 mL 分装至 5 mL 离心管中，于 -80°C冷冻保存，取用时每次仅取用单管）。

3. 样本运输：置于土壤保存液中的样本可常温运输，运输时间不超过7天；置于采样杯/管（袋）中的样本需干冰运输，运输时间不超过 5天（运输期间避免融化）。

4. 样本安全性：所有样本均被视为有潜在感染性的物品，含有病毒的临床样本建议灭活处理后再提取核酸，操作时按照国家相关法规及标准执行。

5. 【操作步骤】

5.1 操作者自备物料清单

5.1.1 手工操作需自备如下物料

表3 手工操作自备物料清单

类型	名称	备注
仪器与试剂	适配1.5 mL离心管的小型离心机	转速不低于 5000 rpm
	漩涡混匀仪	无特殊要求
	恒温混匀仪	可采用水浴锅替代
	适配1.5 mL离心管的磁力架	无特殊要求
	移液器	20 μ L, 200 μ L, 1 mL
	保存液（以 EDTA-2Na、柠檬酸钠等酶抑制剂为主成分）或 1×PBS	无特殊要求
耗材	1.5mL 或2.0 mL 离心管	无 DNase、无 RNase
	吸头	20 μ L, 200 μ L, 1 mL
	50 mL 离心管	无 DNase、无 RNase

5.1.2 自动化操作需自备如下物料

表4 自动化操作自备物料清单

类型	名称	品牌	备注
仪器与试剂	漩涡混匀仪	无特殊要求	无特殊要求
	板式离心机	无特殊要求	无特殊要求
	移液器	无特殊要求	20 μ L, 200 μ L, 1 mL
	保存液(以 EDTA-2Na、柠檬酸钠等酶抑制剂为主成分)或 1 \times PBS	无特殊要求	无特殊要求
耗材	深孔板 (96孔)	无特殊要求	无特殊要求
	吸头	无特殊要求	20 μ L, 200 μ L, 1 mL
	50 mL 离心管 (无 DNase 和 RNase)	无特殊要求	无特殊要求

5.2 用前阅读

5.2.1 实验前请仔细阅读说明书;

5.2.2 请使用表3/表4推荐的耗材;

5.2.3 请提前取出试剂套装中各组分, 使处于室温15-25 $^{\circ}$ C, 充分混匀后分装;

5.2.4 冻存样本避免反复冻融, 否则会导致样本中核酸数量及质量下降;

5.2.5 若Buffer SLB1或Buffer SW1 中有沉淀, 可置于 37 $^{\circ}$ C 水浴中重新溶解, 摇匀后不影响使用;

5.2.6 本试剂盒中的洗脱缓冲液Buffer SE的组分为10 mM Tris-HCl (pH8.0), 操作者可根据自身需求自备洗脱效果相似的其它洗脱缓冲液。

5.3 样本预处理

5.3.1 **土壤保存液保存型样本:** 将保存有土壤样本的保存液试管震荡至样本均匀悬浮, 静置 5 分钟后吸取200 μ L上层液体至2 ml 含微珠的匀浆管中 (为避免固体堵住枪头, 可事先将枪头尖端适当剪去), 先后加入500 μ L Buffer SLB1、300 μ L Buffer PS, 在涡旋震荡仪上以不低于2800 rpm的转速涡旋10分钟 (或使用珠磨仪进行珠磨), 遂以12000 rpm转速离心 10 分钟, 取 400 μ L 上层液体作为待提取样本。

注：若离心机转速无法达到12000 rpm，则最低转速需为5000 rpm，且转速每下降1000 rpm，离心时间延长2分钟（如：转速8000 rpm，则离心18分钟）。

5.3.3 固态土壤样本：称取 $\leq 0.25\text{g}$ 土壤至2 ml 含微珠的匀浆管中（如为富含有机质的土壤如黑土，则土壤用量 $\leq 0.1\text{g}$ ），加入0.5mL Buffer SLB1 以及0.3mL Buffer PS，在涡旋仪上高速涡旋10 - 15 分钟以裂解微生物，结束后，遂以12000 rpm转速离心 5 -10 分钟，取 400 μL 上层液体作为待提取样本。

（备注：针对土壤中普通微生物，65 $^{\circ}\text{C}$ 水浴15分钟；针对极难裂解的细菌，90 $^{\circ}\text{C}$ 水浴10分钟。部分细菌或真菌细胞壁较厚，如葡萄球菌属等，这类微生物极难裂解，90 $^{\circ}\text{C}$ 水浴10分钟可提高其裂解效果，但同时也会导致DNA片断化，则可先用70 $^{\circ}\text{C}$ 水浴来提取DNA，再根据结果调整水浴温度和涡旋时间；处理如富含有机质的底泥等特殊样品时，70 $^{\circ}\text{C}$ 加热也可能会导致DNA片段化，则可省略本水浴加热步骤。）

5.4 手动核酸提取操作步骤

5.4.1 取400 μL 预处理后的样本，加入50 μL 磁珠SN300（货号：SNP300-A），20 μL 蛋白酶（货号：SN105）以及650 μL Buffer SLB2，充分振荡混匀15秒，将离心管置于恒温混匀仪上（恒温混匀仪温度设置为70 $^{\circ}\text{C}$ ，若目标核酸类型为RNA则设置为65 $^{\circ}\text{C}$ ），孵育10 分钟，Vortex 震荡混匀2 次，每次3 秒（注意：磁珠SN300使用前必须充分涡旋振荡混匀）；

5.4.2 将离心管置于磁力架静置2 分钟，磁珠完全吸附后，小心吸弃上清液体；

5.4.3 将离心管从磁力架上取下，加入 800 μL Buffer SW1，充分振荡混匀 1 分钟（注意：加入Buffer SW1 后振荡混匀务必充分，否则会影响所提取核酸的纯度）；

5.4.4 将离心管置于磁力架静置 2 分钟，磁珠完全吸附后，小心吸弃上清液体；

5.4.5 将离心管从磁力架上取下，加入 800 μL Buffer SW2，充分振荡混匀 30 秒；

5.4.6 将离心管置于磁力架静置 1 分钟，磁珠完全吸附后，小心吸弃上清液体；

5.4.7 重复步骤 “5.4.6” 一次，尽可能吸弃离心管中残留的液体；

- 5.4.8 将离心管置于磁力架上，开盖，静置约10 分钟（即室温干燥），确保液体挥发干净；
- 5.4.9 将离心管从磁力架上取下，加入100 μL Buffer SE，振荡混匀后置于恒温混匀仪上，温度控制在 65 $^{\circ}\text{C}$ ，孵育 3 分钟；
10. 孵育结束，将离心管置于磁力架上，待磁珠完全吸附后，小心将上清产物转移至新的 1.5 mL 离心管中，做好标记并于-20 $^{\circ}\text{C}$ 以下保存。

6. 自动化核酸提取操作步骤

6.1 自动化提取前准备

6.1.1 机器准备

- 6.1.1.1 运行前，请确保核酸提取仪已根据《核酸提取仪设备清洁说明书》完成【前期清洁】；
- 6.1.1.2 运行前请确保核酸提取仪已调至准备状态。

6.2 耗材准备

根据表5列出的核酸提取仪自备物料清单准备(所列为运行一次核酸提取流程所需要的自动化耗材)。

表5 核酸提取仪-自备物料清单

名称	品牌	货号	数量
1mL 带滤芯吸头	无	无	6 盒
深孔板 (96 孔)	无	无	6 块

6.3 样品准备

- 6.3.1 核酸提取仪可单次对 1 - 96 个样本进行提取；
- 6.3.2 参照“5.3 样本预处理”完成土壤样本的预处理；
- 6.3.3 取出 1 块深孔板并标记为Buffer SLB2，取离心后的样本、以 400 μL /孔加样（确保深孔板底部无气泡，侧壁无挂液）。

6.4 试剂准备

- 6.4.1 Buffer SW1 准备：直接取用；
- 6.4.2 Buffer SW2 准备：直接取用；
- 6.4.3 SN300准备：按每孔50 μL 磁珠SN300与500 μL Buffer MB 比例混合，获得磁珠工作液；
- 6.4.4 取出 5块 96 孔深孔板，分别标记为【SN300】、【Buffer SW1】、

【Buffer SW2-1】、【Buffer SW2-2】、【Buffer SE】，并按照表6 加入相应试剂。

表6 试剂板试剂用量表

试剂板	试剂量
Buffer SLB2	650 μL(Buffer SLB2)+400μL(预处理样品)+25μL(Proteinase K)/孔
磁珠工作液	550 μL/孔
Buffer SW1	800 μL/孔
Buffer SW2-1	800 μL/孔
Buffer SW2-2	800 μL/孔
Buffer SE	100 μL/孔

注意：磁珠SN300 在添加前，需使用涡旋振荡仪充分混匀。

6.5 核酸提取仪提取

6.5.1 提取操作

6.5.1.1 参照核酸提取仪界面或模式选择，设置运行参数，并依次按顺序装入【6.4试剂准备】的6块深孔板（确认所加样本已经过预处理）；

6.5.1.2 点击【运行】按钮后，提取开始；

6.5.1.3 整个流程运行约 20 分钟，操作者可根据需要进行【暂停】和【恢复】，流程运行结束后，取出洗脱液Buffer SE位置的核酸产物；

6.5.1.4 根据后续实验需要，进入下一步操作；

6.5.1.5 处理废弃的深孔板、废料袋，将其投放至指定废品区域。如果当天不再进行实验，按照《核酸提取仪设备清洁说明书》要求清洁台面。

注意：实验结束，请立即取出提取产物，避免产物长时间放置在洗脱液Buffer SE位置，否则产物质量会下降。

【注意事项】

1. 本产品仅用于科研用途，不用于临床诊断，使用前请细阅本说明书；
2. 试验前请熟悉和掌握需使用的各种仪器的操作方法和注意事项；
3. 所有试剂从规定的存储环境中取出时，按照要求使用，使用前试剂应摇匀；
4. 每次加样均应使用移液器；
5. 所有样本及试剂应避免直接接触皮肤和眼睛，切勿吞咽，一旦发生这种情况立即用大量清水冲洗并及时到医院就诊；
6. 所有样本和各种废弃物均应按相关法规规定的处理。

【FAQ手册】

现象	可能原因	解决方案
提取量低于预期	土壤样本保存时间过长	使用新鲜样本
	裂解不充分	Silica beads使用前未摇匀或振荡器转速过低导致Silica beads破碎能量不足
	实际样本为半固体土壤样本，但按液体土壤样本进行的预处理	使用正确的土壤样本预处理方案
核酸纯度低于预期	蛋白酶K无活性	使用具备酶活性的蛋白酶K
	蛋白酶K活性降低	勿将蛋白酶K与Buffer SLB1或SLB2预先混合
	乙醇残留	室温晾干磁珠、彻底去除乙醇（此步骤对后续有酶促反应的实验亦很关键）
	磁珠结块严重	磁珠使用前充分混匀
磁珠滞留	磁富集时间过短	参照说明书具体步骤，必要时可延长磁富集时间
洗脱液有颜色	磁珠过早加入（如在样本预处理步骤中加入）	磁珠应当在步骤5.4或6.4.4时加入
	土壤样本富含有机质	适当降低土壤用量

【企业信息】

企业名称： 深圳思凝一云科技有限公司

生产地址： 广东省深圳市宝安区新安街道留仙大道2号汇聚创新园1栋508

客服电话： 0755-23205183

技术支持： info@shiningbiotek.com

网 址： https://www.siningene.cn

