

HiPure Stool DNA Mini Kit B

粪便 DNA 小提试剂盒(B)

HiPure Stool DNA Kit B 是专门为粪便 DNA 提取而设计的。试剂盒适合于从 $\leq 0.2\text{g}$ 的粪便样品中提取高纯度的微生物或宿主细胞 DNA。纯化的 DNA 可直接用于 PCR、Southern 杂交、酶切、二代测序等实验。

产品组份

产品编号	D3141-01B	D3141-02B	D3141-03B
纯化次数	10 次	50 次	250 次
HiPure DNA Mini Columns I	10	50	250
2ml Collection Tubes	10	50	250
Buffer SSL	15 ml	70 ml	2 x 180 ml
Buffer AL	10 ml	20 ml	100 ml
Buffer GW1 *	6.6 ml	13 ml	66 ml
Buffer GW2 *	6 ml	20 ml	2 x 50 ml
Proteinase K	6 mg	24 mg	120 mg
Protease Dissolve Buffer	2 ml	2 ml	10 ml
Buffer AE	5 ml	15 ml	60 ml
说明书	1	1	1

保存条件

本产品室温(15~25℃)可保存 18 个月。Proteinase K 干粉温运输和保存,溶解后的 Proteinase K 需保存于-20~8℃。低温下, Buffer SSL 可能会有沉淀形成,需 37℃ 水浴让沉淀完全溶解。Buffer SSL 试剂含有聚乙烯吡咯烷酮(PVP, Polyvinylpyrrolidone),长期放置时, Buffer SSL 从变成橙黄色,不影响提取结果。

准备事项

- 无水乙醇(96-100%)
- 70°C 水浴锅或振荡金属浴
- 溶解 Proteinase K (20mg/ml): 加入适量的 Protease Dissolve Buffer 溶解 Proteinase K 至终浓度为 20mg/ml, 轻轻颠倒让蛋白酶 K 充分溶解。Proteinase K 干粉可在室温下保存一年, 但溶解的 Proteinase K 须分装保存于-20°C。
- Buffer GW1 使用前, 须按瓶子标签所示, 加入无水乙醇进行稀释。
- Buffer GW2 使用前, 须按瓶子标签所示, 加入无水乙醇进行稀释。
- 吸取液体粪便时, 把 1ml 移液枪头的头部剪去小部分, 以方便转移样品。处理富含纤维的动物粪便样品(牛羊等), 样品量控制在 70~100mg, 处理水份极少的动物粪便(如老鼠粪便), 样品量为 50~60mg。

实验步骤

1. 转移 100~200mg 粪便样品至 2ml 离心管中, **立即加入 1.2ml Buffer SSL 至样品中**, 最高涡旋 1 分钟充分打散样品。

若样品是液体状的, 吸取 0.15~0.2ml 样品。处理板结的样品可能需要延长涡旋时间才能充分打散样品。Buffer SSL 要尽快加入, 冻藏的粪便样品在加入 Buffer SSL 之前不要解冻。

2. 70C 水浴 10 分钟。
若需要提取难裂解细菌 DNA 时, 把水浴温度提高至 90C。若只需提取人源 DNA, 省略 70C 或 90C 温育步骤, 以减少细菌 DNA 的干扰。
3. 涡旋 15 秒。室温下, $\geq 14,000 \times g$ 离心 10 分钟。
4. 转移 250 μ l 上清液至新的 1.5ml 离心管中。
若需去除 RNA, 加入 2 μ l RNase A 至裂解液中, 室温静置 15 分钟。
5. **加入 20 μ l Proteinase K 和 250 μ l Buffer AL 上清液中**。颠倒混匀 10 次。70C 水浴 10 分钟。
6. **加入 250 μ l 无水乙醇至样品中**, 颠倒混匀 10 次。

7. 把 HiPure DNA Mini Column I 装在 2ml 收集管中。**转移混合液至柱子中。**10,000 × g 离心 30~60 秒。
8. 倒弃流出液，把柱子装回收集管中。**加入 500µl Buffer GW1(已用无水乙醇稀释)至柱子上。**10,000 × g 离心 30~60 秒。
Buffer GW1 须用无水乙醇稀释。按瓶子标签或说明书指示进行稀释。
9. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。**加入 600µl Buffer GW2(已用乙醇稀释)至柱子中。**10,000 × g 离心 30~60 秒。
Buffer GW2 须用无水乙醇稀释。按瓶子标签或说明书指示进行稀释。
10. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。**加入 600µl Buffer GW2(已用乙醇稀释)至柱子中。**10,000 × g 离心 30~60 秒。
11. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。13,000 × g 离心 2 分钟甩干柱子。
12. 将柱子装在 1.5ml 离心管中。**加入 30~100µl 预热至 70°C 的 Buffer AE 至柱子的膜中央，**室温放置 2 分钟。13,000 × g 离心 1 分钟。
13. 丢弃 DNA 结合柱，把 DNA 保存于-20°C。

常见问题

1. 柱子堵塞

- **样品裂解不充分:** 样品与 Buffer AL 混匀不充分。重新提取，加入 Buffer AL 后先颠倒混匀 3~5 次，然后以最高速度涡旋让样品与 Buffer AL 充分混匀。
- **Proteinase K 活性下降:** 重新制备 Proteinase K。使用后 Proteinase K 必须保存于 -20~-8℃。Proteinase K 与 Buffer AL 不能预先混合。
- **样品用量太多:** 减少样品量，处理复杂粪便样品，样品量控制在 50mg。

2. DNA 纯度不达标

- 参考柱子堵塞部分。
- **样品裂解不充分:** 样品与 Buffer ATL 混匀不充分。重新提取，加入 Buffer ATL 要充分混匀打散样品。

3. DNA 产量低

- 参考柱子堵塞部分。
- Buffer DW2 未加入乙醇稀释。
- 第四步加入乙醇后混匀不充分或乙醇加入的体积不够。
- 洗脱不充分: 洗脱液需加到膜中央，增加洗脱体积或次数。