

HiPure Stool DNA Mini Kit

粪便 DNA 小提试剂盒

HiPure Stool DNA Kit 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	D3141-01	D3141-02	D3141-03
纯化次数	10 次	50 次	250 次
HiPure DNA Mini Columns II	10	50	250
2ml Collection Tubes	10	50	250
Glass Beads (0.1-0.6mm)	7 g	30 g	140 g
Buffer ATL	15 ml	60 ml	270 ml
PVP-10	0.2 g	1 g	5 g
Buffer PCI	10 ml	50 ml	200 ml
Buffer AL	10 ml	30 ml	150 ml
Buffer GW1 *	6.6 ml	13 ml	66 ml
Buffer GW2 *	6 ml	20 ml	2 x 50 ml
RNase A	5 mg	10 mg	45 mg
Proteinase K	6 mg	24 mg	120 mg
Protease Dissolve Buffer	1.8 ml	5 ml	15 ml
Buffer AE	5 ml	15 ml	60 ml
说明书	1	1	1

保存条件

本产品除 Buffer PCI 外，可在室温(15~25℃)保存 18 个月。Buffer PCI、Proteinase K 干粉和 RNase A 干粉室温运输，收到产品后 Buffer PCI, Proteinase K 干粉和 RNase A 保存于 2~8℃，溶解后的 Proteinase K/RNase A 需保存于-20~8℃。

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。
- 溶解 RNase A (15mg/ml): 加入适量的 Protease Dissolve Buffer 溶解 RNase A 至终浓度为 15mg/ml, 颠倒混匀让 RNase A 充分溶解。RNase A 干粉可在室温下, 但溶解的 RNase A 须保存于-20~8°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。
- 使用前, 把 PVP-10 粉末倒至 Buffer ATL 瓶子中, 颠倒混匀, 完全溶解后使用。
- 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. 在 2ml 离心管中, 加入 0.5g Glass Beads(0.1-0.6mm)。
2. 转移 100~150mg 粪便样品至含 Glass Beads 的离心管中, **加入 0.6ml Buffer ATL/PVP-10 和 0.6ml Buffer PCI 至样品中, 在涡旋仪上高速涡旋 10 分钟或使用珠磨仪进行珠磨。**
3. 65°C 水浴 15 分钟。
4. 室温下, 14,000 x g 离心 10 分钟。
5. 转移 500 μ l 上清至 2ml 离心管中, 加入 10 μ l RNase A 至上清液中, 室温静置 10 分钟。
6. **加入 20 μ l Proteinase K 和 500 μ l Buffer AL 至上清液中。**颠倒混匀, 70°C 消化 10 分钟。

7. 加入 500 μ l 无水乙醇至混合液，涡旋混匀 15 秒。
8. 把 HiPure DNA Mini Column II 装在 2ml 收集管中。转移一半体积的混合液至柱子中。10,000 \times g 离心 30~60 秒。
9. 倒弃滤液把柱子装回收集管中。把剩余的混合液转移至柱子中。10,000 \times g 离心 30~60 秒。
10. 倒弃流出液，把柱子装回收集管中。加入 500 μ l Buffer GW1(已用无水乙醇稀释)至柱子上。10,000 \times 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。
11. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。加入 650 μ l Buffer GW2(已用乙醇稀释)至柱子中。10,000 \times 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。
12. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。加入 650 μ l Buffer GW2(已用乙醇稀释)至柱子中。10,000 \times g 离心 30~60 秒。
13. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。13,000 \times g 离心 2 分钟甩干柱子。
14. 将柱子装在 1.5ml 离心管中。加入 30~100 μ l 预热至 65 $^{\circ}$ C 的 Buffer AE 或灭菌水至柱子的膜中央，室温放置 2 分钟。13,000 \times g 离心 1 分钟。
15. 丢弃 DNA 结合柱。把 DNA 保存 2-8 $^{\circ}$ C，长期保存需保存于-20 $^{\circ}$ 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 $-20\sim-8^{\circ}\text{C}$ 。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 GW1/GW2 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。