

HiPure Stool DNA Mini Kit

粪便 DNA 小提试剂盒

产品简介

本试剂盒采用珠磨法与柱法纯化技术相结合，适合从不超过 200mg 粪便样品中快速提取高纯度总 DNA。纯化柱优选高性能的超细玻璃纤维滤膜为材料，高效、专一吸附 DNA。试剂盒采用硅胶柱纯化技术和独创的高盐介导吸附方法，可高效去除 RNA 和抑制因子，整个过程无需酚氯仿的提吸附剂可高效地吸附溶液中的腐殖酸等抑制因子。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
混合玻璃珠 (0.1-0.6mm)	10 g	40 g	180 g
塑料小勺子	2 个	4 个	10 个
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°C)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°C，溶解后的 Proteinase K/RNase A 需保存于-20~8°C。

准备事项

- 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 离心管或螺口离心管，加入 0.5~0.6g 玻璃珠 (0.1-0.6g) 以及 50~200mg 粪便样品，100~200 μ l 液体样品，或 200~300 μ l 含保存液的粪便悬液。

人类粪便样本可能含有未消化的食物物质（例如，作物或水果壳，未消化的种子），这些颗粒最好不要转移。动物粪便样本，降低样本量可能会得到更好的结果。非常干燥的粪便样品，如兔或小鼠粪便，可能会吸收裂解液，导致离心后样品体积不足。在这些情况下，建议减少粪便物质量，如 50mg。对于困难的粪便样本，如脂质、多糖或富含蛋白质的粪便，建议使用 60-100mg

开始提取，减少起始物质也可能提高裂解效率和 DNA 的纯度。

处理液体粪便样品，建议取 0.2ml 进行操作，若样品中水份较多，可以取转移的样品离心后去除多余的水份，残渣和残液总体积不要超过 0.2ml。

处理保存液处理的粪便样品，建议取 0.2~0.3ml 进行提取。

采用珠磨仪或水平转子的涡旋仪时，建议使用螺口冻存管，以防止液体泄漏。

2. **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高速珠磨 30-60 秒。**
 - 涡旋仪：推荐使用美基涡旋仪 MagMix A，这台涡旋仪带 2ml 离心管的夹具，可一次高效处理 10~20 个样品。
 - PowerLyzer 珠磨仪：建议 2000rpm 珠磨 30 秒，暂停 30 秒，再 2000rpm 珠磨 30 秒。
 - FastPrep24 珠磨仪：建议 5m/s，珠磨 30 秒，暂停 30 秒，再 5m/s 珠磨 30 秒。
 - Tissue lysis II 珠磨仪：建议 25Hz 珠磨 5 分钟，重新调整位置后再 25Hz 珠磨 5 分钟。
3. **65°C 水浴 10 分钟。室温下，14,000 × g 离心 10 分钟。**
4. **转移 500µl 上清液至新的离心管中，加入 10µl RNase A，混匀后室温静置 10 分钟消化 RNA。**
5. **加入 20µl Proteinase K 和 500µl Buffer AL 至样品中，颠倒混匀 6-8 次，70°C 温育 10 分钟。**
6. **加入 500µl 无水乙醇至样品中，颠倒混匀 6-8 次。**
7. **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。13,000 × g 离心 1 分钟。**
8. **倒弃滤液把柱子装回收集管，转移余下混合液至柱子。13,000 × g 离心 1 分钟。**
9. **倒弃滤液把柱子装回收集管。加入 600µl Buffer GW1。13,000 × g 离心 1 分钟。**
10. **倒弃滤液把柱子装回收集管。加入 600µl Buffer GW2。13,000 × g 离心 1 分钟。**
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。
11. **倒弃滤液，把柱子装回收集管。加入 600µl Buffer GW2 至柱子。13,000 × g 离心 1 分钟。**
12. **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。**
13. **将柱子装在 1.5ml 离心管中。加入 50~100µl 预热至 65°C 的 Elution Buffer 至柱子的膜中央，放置 3 分钟。13,000 × g 离心 1 分钟。**

Elution Buffer 成分为 10mM Tris,pH8.5 可以用 Buffer TE 或灭菌水(pH>6.5)代替。

14. 把洗脱液再转移至柱子的膜中央，放置 3 分钟。13,000 × g 离心 1 分钟。
15. 丢弃 DNA 结合柱。把 DNA 保存 2-8℃，长期保存需保存于-20℃。

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 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。