

FastPure Stool DNA Kit Handbook

FastPure 动物粪便基因组提取试剂盒说明书

产品组成

FastPure Stool DNA Mini Kit		
产品编号	EK-1212-50T	EK-1212-100T
纯化次数	50 次	100 次
Inhibit EX Buffer	60mL	120mL
Buffer AL	15mL	30mL
Buffer AW1	19mL	38mL
Buffer AW2	17mL	34mL
Buffer ATE	10mL	20mL
Proteinase K Solution	1.1mL	2.2mL
RNase A Solution	0.6mL	1.2mL
DNA Mini Columns	50 个	100 个
2mL Collection Tubes	50 个	100 个
使用手册	1	1

产品介绍

本试剂盒可快捷简单的从新鲜或冷冻的粪便样本中纯化总 DNA。本试剂盒纯化的基因组 DNA 片段大，纯度高，质量稳定可靠。使用本试剂盒回收的 DNA 可直接用于 PCR 等其它分子生物学下游实验。

存储条件

本产品除 Proteinase K 和 RNase A 溶液外，可在室温(15~25℃)保存 12 个月。Proteinase K 和 RNase A 溶液收到后请分装保存于-20℃。

需要额外准备的材料

- 无水乙醇 (96%-100%)
- 无菌 1.5mL/2mL 离心管
- 离心机
- 涡旋仪
- 水浴锅 (将温度调至 70℃)

开始前注意事项 请务必在使用本试剂盒之前阅读此注意事项。

- Inhibit EX Buffer 如有沉淀现象，可 37-70℃ 水浴至完全溶解。
- Inhibit EX Buffer 在存储过程中可能会出现颜色变化 (橙色)；这不会影响缓冲区的功能。
- Buffer AL 如有沉淀现象，可 70℃ 水浴至完全溶解。
- 所有离心均在室温 (15-25℃) 下完成。

开始前试剂准备

- Buffer AW1 按瓶子标签所示提前加入相应体积的无水乙醇
- Buffer AW2 按瓶子标签所示提前加入相应体积的无水乙醇

DNA 浓度及纯度检测

- 回收得到的 DNA 片段可用琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测纯度与浓度。
- DNA 应在 OD260 处有显著吸收峰，OD260 值为 1 相当于大约 50µg/mL 双链 DNA、40µg/mL 单链 DNA。
- OD260/OD280 比值应为 1.7-2.0，如果洗脱时不使用洗脱缓冲液，而使用 ddH₂O，比值会略低，因为 pH 值和离子存在会影响光吸收值，但并不表示纯度低。

操作步骤:

1. 取 180-220mg 的粪便放入 2mL 离心管中, 并将该管放置在冰上等待使用。后续所有操作应在室温下进行。

当样品少于 180mg 也可正常进行。在使用少量的粪便时, 不需要减少缓冲液的量。如果样品为液体, 则将样品量改为 200 μ L (用剪去尖部的枪头能更好的吸取); 如果样品为冷冻的粪便, 则用手术刀切取 180-220mg, 注意在使用冷冻粪便时应避免样品在步骤 2 加入 Inhibit EX Buffer 前解冻, 这会使 DNA 降解。

2. 在每个粪便样品中添加 1mL Inhibit EX Buffer, 涡旋 1min 或直到样品完全混匀。

彻底涡旋样品很重要, 这有助于确保最终洗脱液中的获得最多 DNA。

3. 在 70 $^{\circ}$ C 下水浴加热 5min, 期间可适当涡旋 2-3 次, 每次涡旋约 15s。

提取革兰氏阳性菌或某些寄生虫 DNA 时, 可将温度调至 95 $^{\circ}$ C 加热 10min。若仅提取动物宿主细胞 DNA, 可跳过此步骤。

4. 最大转速 (~13,400 \times g)离心 3min 以沉淀颗粒物, 吸取 200 μ L 上清液转移至新的 2mL 离心管中。

转移上清液时应避免吸到任何固体颗粒, 如果上清中仍有可见颗粒, 应再次离心样品。

5. 在装有 200 μ L 上清液的离心管中加入 15 μ L Proteinase K 溶液。再加入 200 μ L Buffer AL 并涡旋 15s 使溶液混匀。

注意: Proteinase K 溶液不能与 Buffer AL 先混合, 需先后混匀加入。Buffer AL 与样品需完全混匀。若需要更高产量, 可吸取更多上清液, 但后续的 Proteinase K、Buffer AL 和乙醇需按比例相应增加

6. 70 $^{\circ}$ C 下水浴加热 10min。

7. (可选步骤) 若需去除 RNA, 加入 10 μ L RNase A Solution (20mg/mL)至溶液中, 混匀后室温静置 10min。

8. 向离心管中加入 200 μ L 的无水乙醇, 涡旋混匀。

9. 将上述混匀的溶液转移至吸附柱上, 盖上盖子, 最大转速 (~13,400 \times g)离心 1min。

如果溶液未完全通过吸附柱, 则再次离心直至全部溶液通过吸附柱。

10. 倒弃流出液, 把柱子重新装回收集管中。加入 500 μ L Buffer AW1 (请先检查是否已加入无水乙醇) 至柱子上并以 12,000 \times g 离心 1min。

11. 倒弃流出液, 把柱子重新装回收集管中。加入 500 μ L Buffer AW2 (请先检查是否已加入无水乙醇) 至柱子中, 12,000 \times g 离心 1min。

12. 重复操作步骤 11 一次。

13. 倒弃流出液, 把柱子重新装回收集管中。最大转速 (~13,400 \times g)离心空柱 2min, 以甩干柱子的残留物质。(这一步要尽量提高离心速度以减少乙醇的残留)。

注意: 乙醇的残留会影响后续的酶反应 (酶切、PCR 等) 实验, 彻底晾干吸附材料中残余的漂洗液。

14. 将柱子转移至新的 1.5mL 无菌的离心管, 敞开盖子室温静置 10min 以彻底晾干漂洗液。

注意: 粪便样本对 PCR 抑制极其敏感, 任何乙醇残留都会与残留的抑制剂产生叠加效应, 导致扩增失败。

15. 加入 30~100 μ L 预热至 70 $^{\circ}$ C 的 Buffer ATE 至柱子的膜中央, 静置 2min 后以最大转速 (~13,400 \times g)离心 2min 收集离心下的基因组 DNA。

16. 弃去柱子, 将基因组 DNA 溶液于 -20 $^{\circ}$ C 保存 (短期可保存 2-8 $^{\circ}$ C) 或进行下游实验。

常见问题:**1. DNA 产量低**

- 样品储存错误: 粪便样品建议储存在 -20 $^{\circ}$ C 或 -80 $^{\circ}$ C
- 粪便样本在 Inhibit EX Buffer 中未充分匀浆: 用新样品重复 DNA 纯化过程。确保将样品和 Inhibit EX 缓冲液混合, 直到样品完全均质
- Buffer AL 混匀不充分: 用新样品重复 DNA 纯化程序。确保通过涡旋立即彻底混合样品和 Buffer AL
- 试剂准备有误: Buffer AW1 和 Buffer AW2 没有加入乙醇稀释或体积不准确(乙醇浓度需控制在 80%)

2. DNA 在下游反应表现不佳

- 下游反应中使用的 DNA 过多: PCR 可能会被过量的 DNA 模板抑制, 减少下游反应中使用的 DNA 量。
- 靶细胞裂解效率低下: 如果靶细胞难以裂解, 如某些细菌和寄生虫, 则洗脱液中靶 DNA 的量可能较低。在未来的准备工作中, 根据需要将裂解温度提高至 95 $^{\circ}$ C 和/或孵育时间。

3. 提取出的 DNA 颜色发黄/发褐

- 样本中血红素降解产物或多糖多酚含量极高, 减少起始粪便量至 100-150mg 同时增加一次 Buffer AW1 的洗涤。