

HiPure Stool DNA Mini Kit B

粪便 DNA 小提试剂盒 B

产品简介

本试剂盒采用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。本试剂盒采用独特的缓冲液系统，可以将粪便样本中的腐殖酸和粘多糖尽可能的去除，使用本试剂盒回收的 DNA 杂质少，完整性好，可直接用于 PCR、酶切等其它分子生物学下游实验。

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 Solution	6 mg	24 mg	120 mg
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。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 会变成橙黄色，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
- 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 1~2 分钟充分打散样品。**

为方便打散粪便样品，可以加入两粒钢珠（自备）辅助打散样品。处理液体粪便样品，建议取 0.2~0.4ml 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 0.4ml。

处理保存液处理的粪便样品，建议取 0.5ml 进行提取。

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. **70°C 水浴 10 分钟。**
3. **涡旋 10 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。70°C 水浴 10 分钟。**
6. **加入 250 μ l 无水乙醇至样品中，颠倒混匀 6~8 次。**
7. **把 HiPure DNA Mini Column I 装在 2ml 收集管中，转移全部混合液至柱子中。12,000**

x g 离心 30~60 秒。

8. **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。12,000 x 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 600 μ l Buffer GW2(已用乙醇稀释)至柱子中。12,000 x 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 600 μ l Buffer GW2(已用乙醇稀释)至柱子中。12,000 x g 离心 30~60 秒。

11. **倒弃滤液**，把柱子装回收集管中。12,000 x g 离心 2 分钟甩干柱子。

12. **将柱子装在 1.5ml 离心管中**。加入 30~100 μ l 预热至 70°C 的 Buffer AE 至柱子的膜中央，室温放置 2~3 分钟。12,000 x g 离心 1 分钟。

若需要获得最高产量，建议重复第 12 步进行第二步洗脱。把 Buffer AE 预热至 55°C，并重复 2-3 次洗脱有利于提高产量。重复洗脱时，可以把得到洗脱液再转移至柱子进行第二次或第三次洗脱，提高回收率的同时又可获得更高浓度的 DNA。

Buffer AE 成分为 10mM Tris,pH9.0, 0.5mM EDTA, 可以用 Buffer TE 或灭菌水(pH>6.5)代替。

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。