



北京艾德莱生物科技有限公司

Aidlab Biotechnologies Co., Ltd

- ◆ 粪便基因组DNA快速提取试剂盒
 - ◆ 目录号 DN23
 - ◆ 使用手册
 - ◆ 实验室使用，仅用于体外
-

粪便基因组 DNA 快速提取试剂盒

目录号: DN23

目录编号	包装单位
DN2301	50次

❖ 适用范围:

适用于快速提取各种粪便DNA

❖ 试剂盒组成、储存、稳定性:

试剂盒组成	保存	50 次
平衡液	室温	5ml
缓冲液 ASL	室温	70 ml
杂质清除剂 AB	室温	5 ml
结合液 CB	室温	11 ml
抑制物去除液 IR	室温	25 ml
漂洗液 WB	室温	13 ml 第一次使用前按说明加指定量乙醇
洗脱缓冲液 EB	室温	15 ml
蛋白酶 K 溶液 20mg/ml	4℃	1 ml
吸附柱 AC	室温	50 个
收集管 (2ml)	室温	50 个

本试剂盒在室温储存 12 个月不影响使用效果。

杂质清除剂 AB 升级, 可以室温存放, 使用更方便。

储存事项:

1. 缓冲液 ASL 或者结合液 CB 低温时可能出现析出和沉淀,可以在 70℃水浴几分钟帮助重新充分溶解,恢复澄清透明后冷却到室温即可使用。
2. **蛋白酶 K 保存在即用型甘油缓冲液中**, 常温运输。收到后, 不超过 25℃室温至少保存 6 个月, 4℃保存 12 个月, -20℃保存 2 年。
3. 避免试剂长时间暴露于空气中产生挥发、氧化、pH 值变化, 各溶液使用后应及时盖紧盖子。

❖ 产品介绍:

常规的 DNA 纯化方式并不能有效地去除粪便中存在的大量抑制因子而导致下游实验的失败, 如 PCR 不能扩增出所需片段。该试剂盒采用 DNA 吸附柱和新型独特的溶液系统, 能有效去除动物粪便中各种影响下游实验(如 PCR)的抑制因子, 并能高效地回收粪便中的基因组 DNA。动物粪便样品经特殊缓冲液 ASL 重悬后, 70℃处理 5 分钟裂解细菌; 离心去除不溶解的杂质, 蛋白酶 K 消化进一步去除蛋白和杂质; 然后基因组 DNA 在高离序盐状态下选择性吸附于离心柱内硅基质膜, 再通过一系列快速的漂洗—离心的步骤, 抑制物去除液和漂洗液将细胞代谢物、蛋白等杂质去除, 最后低盐的洗脱缓冲液将纯净基因组 DNA 从硅基质膜上洗脱。



❖ **产品特点：**

1. 离心吸附柱内硅基质膜全部采用进口世界著名公司特制吸附膜，柱与柱之间吸附量差异极小，可重复性好。克服了国产试剂盒膜质量不稳定的弊端。
2. 不需要使用有毒的苯酚等试剂，也不需要乙醇沉淀等步骤。
3. 快速，简捷，单个样品操作一般可在 40 分钟内完成。
4. 多次柱漂洗确保高纯度， OD_{260}/OD_{280} 典型的比值达 1.7~1.9，可直接用于 PCR，Southern-blot 和各种酶切反应。

❖ **注意事项**

1. **所有的离心步骤均在室温完成**，使用转速可以达到13,000rpm的传统台式离心机，如Eppendorf 5415C 或者类似离心机。
2. 开始实验前将需要的水浴先预热到 70℃ 备用。
3. 结合液 CB 和抑制物去除液 IR 中含有刺激性化合物，操作时要戴乳胶手套，**避免沾染皮肤，眼睛和衣服。若沾染皮肤、眼睛时，要用大量清水或者生理盐水冲洗。**
4. **洗脱液 EB 不含有螯合剂 EDTA**，不影响下游酶切、连接等反应。**也可以使用水洗脱，但应该确保 pH 大于 7.5**，pH 过低影响洗脱效率。用水洗脱 DNA 应该保存在-20℃。DNA 如果需要长期保存，可以用 TE 缓冲液洗脱（10mM Tris-HCl，1mM EDTA，pH 8.0），但是 EDTA 可能影响下游酶切反应，使用时可以适当稀释。
5. PCR 可能被过量的 DNA（一般大于 1 μ g）抑制，使用最小用量的洗脱 DNA（适当稀释）反而可以得到更好的扩增。一般加入的洗脱 DNA 体积不要超过总 PCR 反应体积的 10%。**我们建议在 PCR 反应体系中加入终浓度 0.1 μ g/ μ l 的 BSA（牛血清白蛋白）有助于得到最佳扩增效果。**





❖ 关于平衡液的使用

1. **介绍：**核酸吸附硅胶膜柱子长期放置过程中会同空气中的电荷/尘埃发生反应而影响其核酸的结合能力。硅胶柱经平衡液预处理后可大大减少柱子中硅胶膜的憎水基团，提高核酸的结合能力。从而提高硅胶柱子回收效率或者产量。平衡液是强碱性溶液，若不小心碰到，请用大量自来水清洗。用完后需盖紧瓶盖，以免接触空气。室温保存。在保存过程中可能有沉淀生成，请加热至 37℃ 使沉淀完全消失。
2. **使用方法：**取一个新的硅胶膜吸附柱子装在收集管中，吸取 100 μ l 的平衡液至柱子中。13000 rpm 离心 1 分钟，倒掉收集管中废液，将吸附柱子重新放回收集管。此时平衡液预处理柱子完毕。接后续的操作步骤。

❖ 操作步骤：（实验前请先阅读注意事项）

提示：第一次使用前请先在 15ml 漂洗液 WB 中加入 60ml 无水乙醇，充分混匀，加入后请及时在方框打钩标记已加入乙醇，以免多次加入！

1. 收集约 200-220mg 粪便到一个 2ml 离心管，置冰上。

如果是冰冻的标本，加入缓冲液 ASL 前不能解冻，否则 DNA 容易降解。

2. 加 1.4ml 缓冲液 ASL，连续涡旋振荡 1 分钟或者直到完全混匀均一。

注意完全涡旋混匀，否则会严重降低产量。

3. 将重悬物 70℃ 温育 5 分钟。

该加热步骤可以提高 3-5 倍 DNA 产量，并且帮助裂解细菌和寄生虫。对于某些难裂解的细胞（如革兰氏阳性菌）可以提高到 95℃。

4. 涡旋振荡 15 秒，室温放置 1 分钟。最高速离心 1 分钟沉淀粪便颗粒。
5. 转移 900 μ l 上清到一个 1.5ml 离心管，加入 100 μ l 杂质清除剂 AB，立刻涡旋振荡 1 分钟或者直到完全混匀均一，室温放置 1 分钟。最高速离心 3 分钟去除杂质。
6. 转移所有上清到一个 1.5ml 离心管，最高速离心 3 分钟。



-
7. 转移 210 μ l 上清到一个 1.5ml 离心管，加入 20 μ l 蛋白酶 K (20mg/ml)溶液，充分混匀，加入 200 μ l 结合液 CB，涡旋振荡 15 秒，充分混匀。70 $^{\circ}$ C 温育 10 分钟。

如果产量偏低，可以转移更多的上清，并且相应的按比例提高蛋白酶 K 和结合液的和后面的异丙醇使用量。

平衡液预处理吸附柱备用：

使用平衡液预处理硅胶膜吸附柱为必做步骤，具体方法参见前文“关于平衡液的使用”

8. 冷却后加入 100 μ l 异丙醇，涡旋混匀。
9. 将上一步所得溶液和可能出现的沉淀都加入一个吸附柱 AC 中，(吸附柱放入收集管中) 13,000rpm 离心 30 秒，倒掉收集管中的废液。
10. 加入 500 μ l 抑制物去除液 IR，12,000rpm 离心 30 秒，弃废液。
11. 加入 600 μ l 漂洗液 WB (请先检查是否已加入无水乙醇!)，12,000rpm 离心 30 秒，弃掉废液。
12. 加入 600 μ l 漂洗液 WB，12,000rpm 离心 30 秒，弃掉废液。
13. 将吸附柱 AC 放回空收集管中，13,000rpm 离心 2 分钟，尽量除去漂洗液，以免漂洗液中残留乙醇抑制下游反应。
14. 取出吸附柱 AC，放入一个干净的离心管中，在**吸附膜的中间部位**加 100—150 μ l 洗脱缓冲液 EB (洗脱缓冲液可事先在 65-70 $^{\circ}$ C 水浴中预热)，室温放置 2 分钟，12,000rpm 离心 1 分钟。将得到的溶液重新加入离心吸附柱中，室温放置 2 分钟，12,000rpm 离心 1 分钟。
- 洗脱体积越大，洗脱效率越高，如果需要 DNA 浓度较高，可以适当减少洗脱体积，但是最小体积不应少于 50 μ l，体积过小降低 DNA 洗脱效率，减少 DNA 产量。**
15. DNA 可以存放在 2-8 $^{\circ}$ C，如果要长时间存放，可以放置在 -20 $^{\circ}$ C。

❖ 问题与解决方法:

问题	评论与建议
洗脱液没有 DNA 或者产量低	<ul style="list-style-type: none">*样品储存不当-建议: 样品应该储存在 4℃ 或者 -20℃*在缓冲液 ASL 中涡旋匀浆不充分-建议: 样品在 ASL 中充分的涡旋直到均一。*和结合液 CB 混匀不充分-建议: 上清和结合液 CB 立即充分间断涡旋混匀。*上离心柱前忘记加异丙醇-建议: 记住加异丙醇*DNA 洗脱不充分-建议: 洗脱前在室温放 5 分钟*第一次使用前, 漂洗液 WB 中忘记加无水乙醇-建议: 在漂洗液 WB 中加入指定量无水乙醇。
A260/A280 比值异常高	<ul style="list-style-type: none">*残留 RNA 过高-建议: 洗脱缓冲液加 RNase A, 室温 10-30 分钟。
DNA 下游反应不正常	<ul style="list-style-type: none">*BSA 没有加到 PCR 反应体系-建议: PCR 反应体系中加入终浓度 0.1 μg/μl 的 BSA。*下游反应中使用的 DNA 过量了-建议: 假如 DNA 使用太多, 可能会抑制 PCR 反应, 因此可减少洗脱 DNA 使用量*非特异性扩增条带-建议: 洗脱液中目的 DNA 量太低, 背景 DNA 过高, 可以考虑使用热启动 PCR 聚合酶*某些目的细胞裂解困难, 不充分导致产量低-建议: 可以把裂解液温育时间提高到 95℃*没有足够 DNA 洗脱下来-建议: 查看上面可能的原因
最初的离心步骤第 4 步骤后没有见到多少上清	<ul style="list-style-type: none">*离心力不够-建议: 可以尝试 14000rpm 离心 5 分钟