

# 操作手册

## 粪便 DNA 提取试剂盒（5 克样品）

Catalog No. TB611- 10

### Highlights

- 可最多 5 克土壤，粪便等样品中提取基因组 DNA。
- 获得的基因组 DNA 产量高、纯度好，可以直接用于酶切、PCR、测序等分子生物学实验。
- 无需使用蛋白酶 K 和其它有机变性剂。
- 此产品仅供科研使用。

Ver.1.2.6

## 产品组成:

试剂盒组成	保存	2 次	10 次
DNA/RNA 保护剂	室温	50 ml	250 ml
基因组 DNA 洗涤液 1	室温	20 ml	100 ml
基因组 DNA 洗涤液 2	室温	50 ml	250 ml
基因组 DNA 洗脱液	室温	5 ml	25 ml
DNA 结合液	室温	10 ml	50 ml
DNA 洗涤液	室温	1.5 ml	6 ml
裂解管	室温	2 个	10 个
磁珠	室温	250 $\mu$ l	1.2 ml
3 号柱 G+收集管	室温	2 套	10 套
过滤器（选配）	室温	2 个	10 个

**Note** –售出后一年内产品质量是可以保证。试剂已经过大量的常规检测来保证其可操作性。此产品仅供研究并且需要由专业人员来使用。试剂盒中的部分试剂是有刺激性的。请带好手套和防护眼镜。

## 注意事项:

环境温度低时基因组结合液或者基因组 DNA 洗涤液 1 可能出现析出和沉淀，可以在 37°C 水浴几分钟帮助重新溶解，**恢复澄清透明后冷却到室温**即可使用。

## 特性:

- **样品:** 可有效的从 5g 以内的哺乳动物粪便提取到细菌，真菌，病毒，线粒体和宿主 DNA.
- **DNA 纯度:** 获得的基因组 DNA 产量高、纯度好，可以直接用 PCR，高通量测序等各种分子生物学实验。
- **基因组 DNA 大小:** 一般经过震荡后，可回收到 15-20 kb 大小左右的基因组 DNA。
- **操作温度:** 室温 (15-30°C)

## 试剂制备

**DNA 洗涤液** 在使用之前一定要配好，添加好乙醇后在试剂瓶上做好标记!!!

应添加 6 ml 100%的乙醇（26 ml 95%的乙醇）到1.5ml的**DNA洗涤液**中  
24 ml 100%的乙醇（26 ml 95%的乙醇）到6ml的**DNA洗涤液**中

## 操作步骤:

1. 直接添加 25 ml 的 DNA/RNA 保护剂到裂解管中，然后添加 5g 以内的哺乳动物粪到裂解管中，在涡旋仪上最大速下振荡 10-15 分钟混匀（如果使用高频振荡器时间可以适当缩短时间）。如破碎不完全会直接影响得率。
2. （选做）添加 100 $\mu$ l 的蛋白酶 K 溶液到裂解管中，涡旋振荡 1 分钟，室温下孵育 1 小时。
3. 将裂解管放到离心机里，在 $\geq 5,000$  RPM 下离心 10 分钟。
4. 将上一步所得上清 20ml 以内转移到 50ml 的离心管内，并添加等体积 异丙醇。
5. 涡旋振荡磁珠取 100 $\mu$ l 添加到上述混合物中，上下颠倒混匀 20 分钟左右，每 2-3 分钟混匀几次。
6. 将 50mL 离心管放在磁力架上，静置 3 分钟，待磁珠充分吸附在管壁上，吸弃废液。
7. 将离心管从磁力架中取出，添加 10ml 的基因组 DNA 洗涤液 1，涡旋振荡直至磁珠从管壁上脱落，静置 3 分钟，再次放入磁力架中，静置 3min，待磁珠充分吸附在管壁上，吸弃废液。
8. 将离心管从磁力架中取出，添加 10ml 的基因组 DNA 洗涤液 2，涡旋振荡直至磁珠从管壁上脱落，静置 3 分钟，再次放入磁力架中，静置 3min，待磁珠充分吸附在管壁上，吸弃废液。
9. 重复步骤 8.
10. 用移液器尽可能多的吸净残余液体。
11. 将离心管开盖在 55 $^{\circ}$ C 下加热 10 分钟，如果没有加热模块可以在室温下放置 20-30 分钟。
12. 添加 1200-1500  $\mu$ l 的基因组 DNA 洗脱液混匀磁珠 10 分钟，期间反复抽吸。
13. 磁吸磁珠。将上清（含有洗脱的 DNA）转移到干净的离心管中。

以下离心力均在 10,000-16,000 x g 范围内

14. 在一个 1.5 ml 小型离心管中, 添加 1 倍体积的 **DNA 结合液** 到每 1 体积的 DNA 样品中. 混匀.

DNA结合液 : DNA 样品	Example
1 : 1	400 $\mu$ l : 400 $\mu$ l
1 : 1	1200 $\mu$ l : 1200 $\mu$ l
1 : 1	1500 $\mu$ l : 1500 $\mu$ l

15. 将混合物移置到 **3号柱 G** 中并套在收集管内。离心 1 分钟，去除滤出液。

注意：柱所能容纳的样品体积为 800  $\mu\text{l}$ 。所以，如果样品体积超过 800  $\mu\text{l}$  时，柱就要被多次填充和离心。

16. 添加 600  $\mu\text{l}$  **DNA洗涤液** 到柱中。离心 1分钟, 去除滤出液。

17. 重复步骤16

18. 空转2分钟以去除残留的乙醇，以免抑制下游反应。

19. 直接添加 100  $\mu\text{l}$  (或更多) 的DNA洗脱液到柱基质中。将柱移到 1.5 ml 小型离心管内离心1分钟来洗脱 DNA。

#### 附录（选做）

如粪便样品粘稠杂质较多则在第 3 步完成后添加额外的步骤 将过滤柱套在一个 50ml 的离心管内，将上一步所得上清 15 ml 以内转移到过滤柱内，在 $\geq 5,000$  RPM 下离心 10 分钟。然后进行第 4 步继续操作。

粪便中含有的腐殖酸是抑制PCR反应的主要因素，本试剂盒本身有去除腐殖酸的作用，如需去除更多的腐殖酸，可购买我公司抑制物去除柱来完全去除腐殖酸。

1. 将抑制物去除柱套在一个收集管内，添加600 $\mu\text{l}$ 的抑制物去除液，在 $\geq 8,000 \times g$ 下离心3分钟。

2. 将最终洗脱的基因组DNA放入制备好的抑制物去除柱内，抑制物去除柱套在一个干净的1.5ml离心管内，并在 $10,000 \times g$ 下离心3分钟，得到的DNA可进行后续PCR等试验。