

For research use only

Version Number: 1.1

Stool DNA Isolation Kit

For genomic DNA purification from various stool samples

试剂盒组成	DE-05713
	50 T
Buffer SL1 *	30 mL
Buffer SL2 *	30 mL
Buffer SL3 *	30 mL
Buffer PW *	25 mL
Buffer WB	25 mL
Buffer EB	10 mL
Buffer TE	55 mL
Foregene Protease	1.25 mL × 2
Lysozyme	500 mg
DNA-Only Column	50 套
说明书	1 份

*: Buffer SL1、SL2、SL3、PW 中含有具刺激性离液盐，操作时注意戴上手套和进行相关防护措施。

产品简介

本试剂盒提供了从各种来源的粪便样本中快速简便的提取细菌、食物残渣等基因组 DNA 的方法。粪便样品中存在大量的抑制因子，这些物质即使微量存在于纯化后的 DNA 中也会对下游反应，如对 PCR、限制性酶切等产生影响。因而纯化粪便 DNA 的关键在于如何有效的去除粪便中的抑制因子。

本试剂盒采用可以特异性结合 DNA 的 DNA-Only Column、全新的 Foregene Protease 以及独特的缓冲液体系，可以有效的去除粪便中各种抑制因子，无需有机溶剂抽提或乙醇及异丙醇沉淀，在 40 分钟内即可完成对粪便样品中 DNA 的提取操作。

储存条件

❖ 本试剂盒在常温(15–25°C)干燥条件下，可保存 24 个月；如需保存更长时间可置于 2–8°C。

注意：若低温保存，溶液容易产生沉淀。在使用前务必将试剂盒内的溶液在室温中放置一段时间，必要时可在 37°C 水浴中预热 10 分钟，以溶解沉淀，混匀后再使用。

- ❖ Foregene Protease 溶液具有独特配方，常温保存长期(3 个月)具有活性；在 4°C 保存，其活性和稳定性会更好，因此建议将其置于 4°C 保存，切记不能置于 -20°C 保存。
- ❖ 干粉 Lysozyme -20°C 保存；配制好的 Lysozyme 溶液分成小份 -20°C 保存。

注意事项：(请务必在使用试剂盒前仔细阅读注意事项)

- ❖ 每个粪便样本单次基因组 DNA 提取用量 50-200 mg 为宜。
- ❖ Buffer SL2 在使用前应充分混匀，形成悬浊液，否则会影响 DNA 的质量和产量。
- ❖ 使用前，仔细检查 Buffer SL3 和 Buffer PW 中是否有沉淀析出，若有沉淀析出，请将其置于 37°C 溶解，混匀后再使用。
- ❖ 试剂盒使用前，请务必检查 Buffer WB 是否按说明添加了无水乙醇。Buffer WB 在使用前添加 60 mL 无水乙醇(DE-05713)。
- ❖ 在样品裂解过程中，应始终保持样品浸于裂解缓冲液中，若样品黏附在管盖及内壁，可通过短暂离心进行处理。
- ❖ 洗脱体积： Buffer EB 不应少于 50 μ L，否则会影响 DNA 产量。
- ❖ 切记不要在任何 Buffer 中添加 RNA 酶。
- ❖ 所有离心步骤均为使用台式离心机常温(15-25°C)离心。
- ❖ 所有实验步骤均在常温(15-25°C)进行。

Lysozyme 溶液配制

使用前，Lysozyme 配制成浓度为 100 mg/mL 的溶液。避免反复冻融，分装成小份后于 -20°C 保存。使用前，将 Lysozyme 溶液在室温下溶解，每个样品用量为 100 μ L。

操作步骤 (请严格按照本操作说明进行相关实验操作)

使用前请先在 Buffer WB 中加入无水乙醇，加入体积请参照瓶上的标签。

- 称取 **50-200 mg** 粪便样品，置于 2 mL 离心管中。
注意：如果样本是悬浊液，可 13,300 rpm(17,000 \times g)离心 1 min，收集沉淀后再称取 50-200 mg 置于 2 mL 离心管中。
- 离心管中加入 **1 mL Buffer TE**、**100 μ L Lysozyme** 充分混匀后，37°C 摇床温浴 10 min(转速：180 rpm)。
- 温浴结束后，13,300 rpm(~17,000 \times g)离心 1 min，用移液器吸除上清。
注意：应尽量吸净残留上清，以免影响后续操作。
- 留有沉淀的离心管中加入 **600 μ L Buffer SL1**，**50 μ L Foregene Protease**，上下颠倒充分混匀。

- 将离心管置于 65°C 水浴或金属浴 5 min，其间上下颠倒充分混匀一次。
注意：颠倒混匀需剧烈晃动离心管约 5 sec，至离心管中的样品无结块，以便样本与裂解液充分反应。否则，将会影响 DNA 的得率和纯度。
- 13,300 rpm (~17,000 ×g) 离心 1 min，用移液器将上清液转移至新的 2 mL 离心管中，应避免吸到沉淀，弃掉留有沉淀的离心管。
- 向留有上清液的离心管中加入 **600 μL Buffer SL2**，上下颠倒充分混匀，室温静置 2 min。
注意：Buffer SL2 在使用之前需充分混匀，形成悬浊液，无分层，无结块。否则，将会影响 DNA 的得率和纯度。
- 13,300 rpm (~17,000 ×g) 离心 1 min，用移液器取 600 μL 上清液转移至新的 2 mL 离心管中，应避免吸到沉淀
注意：剩余的上清液可以弃掉或者将其转移至另一新的离心管中按体积比例加入 Buffer SL3 和乙醇进行步骤 9、10 和 11。例如剩余的上清液为 400 μL，则按比例加入 400 μL Buffer SL3 进行步骤 9，再加入 160 μL 乙醇进行步骤 10，之后过柱。
- 向离心管中加入 **600 μL Buffer SL3**，上下颠倒充分混匀，置于 65°C 水浴或金属浴 5 min，其间上下颠倒充分混匀一次。
- 向离心管中加入 **240 μL 乙醇**(96-100%) 涡旋充分混匀 10 sec，瞬时离心收集附着在管盖和管壁的液滴。
- 将离心柱放入收集管中，取 800 μL 混合液加入离心柱 (DNA-Only Column) 中，12,000 rpm (~13,400 ×g)，离心 1 min，弃掉收集管中废液
- 将离心柱放回收集管中，将剩余混合液全部加入离心柱中，12,000 rpm (~13,400 ×g)，离心 1 min，弃掉收集管中的废液。
- 将离心柱放回收集管中，向离心柱中加入 **500 μL Buffer PW**，12,000 rpm (~13,400 ×g)，离心 1 min，弃掉收集管中的废液。
- 将离心柱放回收集管中，向离心柱中加入 **700 μL Buffer WB**，12,000 rpm (~13,400 ×g)，离心 1 min，弃掉收集管中的废液。
- 重复步骤 14 一次。
- 将离心柱放回收集管中，12,000 rpm (~13,400 ×g) 空管离心 2 min，去掉离心柱中残余的 Buffer WB。
- 将离心柱转移至新的 2 mL 离心管中，向膜中央悬空滴加 **100 μL 已于 65°C 预热的 Buffer EB** (切勿将洗脱液添加到压圈上，否则会损失较大体积的洗脱液)，室温放置 5 min，12,000 rpm (~13,400 ×g) 离心 1 min。再次向膜中央悬空滴加 **100 μL 已预热的 Buffer EB**，12,000 rpm (~13,400 ×g) 离心 1 min。将两次收集的洗脱液合并。
注意：如果希望提高 DNA 的浓度，可将第 1 次离心得到的溶液重新加回离心柱中，12,000 rpm

(~13,400×g) 离心 1 min。另外，样本量小于 100 mg 时，建议洗脱体积为 60-100 μL。

