

M5 Stool Genomic Plus DNA Kit 超强粪便基因组提取试剂盒使用说明书

产品名称	单位	货号
M5 Stool Genomic Plus DNA Kit	50T	MF114-plus-01

【储存条件】

常温运输，室温（15~30℃）保存。
杂质清除剂 AB, 蛋白酶 K, -20℃ 保存。

【产品简介】

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。

【产品组份】

	50T	保存温度	
缓冲液 ASL	70 ml	RT	（低温时可能出现沉淀，70℃水浴重新溶解，恢复澄清冷却到室温即可使用）
杂质清除剂 AB	5 ml	-20℃	（短时间用可以放在常温，长期保存放-20℃）
结合液 CB	11 ml	RT	（低温时可能出现沉淀，70℃水浴重新溶解，恢复澄清冷却到室温即可使用）
抑制物去除液 IR	25 ml	RT	
漂洗液 WB	15 ml	RT	（第一次使用前按说明加 45ml 无水乙醇）
洗脱缓冲液 EB	15 ml	RT	
蛋白酶 K（20mg/ml）	1ml	-20℃	
吸附柱 AC	50 个	RT	
收集管（2ml）	50 个	RT	

【实验准备】

1. 所有离心步骤都在常温完成。
2. 开始实验前将需要的水浴预先预热到 70℃ 备用。
3. 结合液 CB 和抑制物去除液 IR 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。如果沾染皮肤、眼睛，马上用大量清水或者生理盐水冲洗。
4. 洗脱液 EB 不含 EDTA，不影响下游酶切、连接等反应。也可以使用水洗脱（pH>7.5）。用水洗脱的 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, pH8.0），但是 EDTA 可能影响下游酶切反应，使用时可以适当稀释。

【操作步骤】

第一次使用前，请先在 15ml 漂洗液 WB 中加入 45ml 无水乙醇，充分混匀，加入后请及时在方框中标记，以免多次加入！

1. 取 200-220 mg 粪便样本，置于 2ml 离心管（自备）中。

注意：如果是冰冻样本，加入缓冲液 ASL 前不能解冻，以免 DNA 降解。

2. 加入 1.4 ml 缓冲液 ASL，涡旋振荡 1-2 分钟，使样本均匀分散于溶液中。

注意：完全涡旋混匀，否则严重降低产量。

3. 将重悬物 70°C 温育 5 分钟。

注意：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°C。

4. 涡旋振荡 15 秒，室温放置 1 分钟，最高转速离心 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，最高转速离心 3 分钟去除杂质。

6. 转移所有上清到 1.5ml 离心管中，最高转速离心 3 分钟。

7. 转移 210 μ l 上清到一个 1.5ml 离心管中，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°C 温育 10 分钟。

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（请先检查是否已经加入无水乙醇！），12,000rpm 离心 30 秒，弃掉废液。

12. 加入 500 μ l 漂洗液 WB，12,000rpm 离心 30 秒，弃掉废液。

13. 将吸附柱 AC 放入空的收集管中，13,000rpm 离心 2 分钟，尽量去除漂洗液，以免漂洗液中残留的乙醇抑制下游反应。

14. 取出吸附柱 AC，放入一个干净的离心管中，在吸附膜中间部位加入 100-150 μ l 洗脱缓冲液 EB（可以在 65-70°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。

注意：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，体积小降低 DNA 洗脱效率进而降低得率。

15. DNA 可以放置 2-8°C，如果需要长期保存，放置 -20°C。

【备注】

本产品仅供科研使用。在确认产品质量出现问题时，本公司承诺为客户免费更换等量的质量合格产品。