

D4015 Stool DNA Kit

简易中文步骤

√实验前请按说明书正确稀释 VHB Buffer、DNA Wash Buffer。

➤ 使用【无水乙醇】对 VHB Buffer 进行稀释，稀释后室温保存

货号	加入量
D4015-00	2.8mL
D4015-01	19mL
D4015-02	84mL

➤ 使用【无水乙醇】对 DNA Wash Buffer 进行稀释，稀释后室温保存

货号	加入量
D4015-00	8mL
D4015-01	80mL
D4015-02	80mL (每瓶)

Stool DNA Protocol (for pathogen detection) 病原体/总菌群提取方案

1. 取少于 200mg 粪便样品到 2 mL 离心管内，加入 200mg Glass Beads X，把管子放在冰上；

Note: 如果样品是溶液，则将 200 μ l 溶液加入到离心管中；如果样品没解冻，需在解冻之前把样品刮入到离心管中，在样品解冻之前加入 SLX-Mlus Buffer；

2. 加入 540 μ l SLX-Mlus Buffer，最大转速涡旋 10min 彻底匀浆粪便样品；

3. 加入 60 μ l DS Buffer 和 20 μ l Proteinase K，涡旋混匀；

4. 70°C 孵育 10min，不时颠倒样本帮助裂解（如为冻存样本，时间延长至 13min）。

选做：如需提取样本中阳性菌基因组 DNA，请作第二次孵育 95°C 5min；

5. 加入 200 μ l SP2 Buffer 高速涡旋混匀 30s；

6. 冰上放置 5min 帮助沉淀形成；

7. $\geq 13,000xg$ 室温离心 5min；

8. 转移 400 μ l 上清液至新 1.5mL 离心管，切勿转移到沉淀物；

9. 加入 200 μ l cHTR Reagent，涡旋 10s 混匀；

Note: cHTR Reagent 使用前请充分重悬分散。提示：稍微修建 1mL 枪头可帮助吸取该溶液；

10. 室温放置 2min，最大速度离心 2min；

11. 转移 250 μ l 上清至 1.5mL 新离心管中；

选做：如需去除 RNA，添加 10 μ l RNase A 涡旋混匀，37°C 消化 3min；

12. 加 250 μ l BL Buffer 与 250 μ l 无水乙醇, 涡旋 10s 混匀;
13. 把 HiBind DNA Mini Column 套在 2mL 收集管上, 转移所有混合液至 HiBind DNA Mini Column 上, 最大速度离心 1min, 弃滤液;
14. 把 HiBind DNA Mini Column 套回 2mL 收集管上, 加 500 μ l VHB Buffer 至结合柱上, 最大速度离心 1min, 弃滤液;
Note: VHB Buffer 在使用前请按说明书正确添加无水乙醇稀释。
15. 把 HiBind DNA Mini Column 套回 2mL 收集管上, 加 700 μ l DNA Wash Buffer 至结合柱上, 最大速度离心 1min, 弃滤液;
Note: DNA Wash Buffer 在使用前请按说明书正确添加无水乙醇稀释。
16. 重复步骤 15;
17. 把 HiBind DNA Mini Column 套回 2mL 收集管上, 空柱子最大速度离心 2min, 干燥柱子;
Note: 在洗脱前对柱子的干燥很重要, 否则残留的乙醇会影响下游实验。
18. 把 HiBind DNA Mini Column 套在一个新的 1.5mL 离心管, 添加 100-200 μ l 预热至 65 $^{\circ}$ C 的 Elution Buffer。室温放置 2min, 最大速度离心 1min 洗脱 DNA。
19. 弃除柱子, 保存 DNA 到 -20 $^{\circ}$ C 冰箱中。

Stool DNA Protocol (for human DNA detection) 肠道脱落细胞方案

1. 取 200mg 粪便样品到 15 mL 离心管内, 把管子放在冰上。加入 1.6mL SLX-Mlus Buffer。最大转速涡旋 1min 直至彻底匀浆粪便样品;
Note: 如果样品是溶液, 则将 200 μ l 溶液加入到离心管中; 如果样品没解冻, 需在解冻之前把样品刮入到离心管中, 在样品解冻之前加入 SLX-Mlus Buffer;
2. 加 180 μ l DS Buffer, 颠倒 5 次混匀;
3. $\geq 4,000xg$ 离心 3min;
4. 转移 1.5mL 上清到 15mL 离心管;
5. 加入 600 μ l SP2 Buffer, 涡旋 10s, 冰浴 5min;
6. 最大速度离心 3min;
7. 转移 600 μ l 上清到新的 2mL 离心管, 加 200 μ l cHTR Reagent, 涡旋 10s 混匀;
Note: 使用前, 摇晃瓶子使 cHTR 充分重悬。
8. 室温孵育 2min;
9. 最大速度 ($\geq 13,000xg$) 离心 2min;
10. 转移 600 μ l 上清到新的 2mL 离心管中, 加入 20 μ l Proteinase K, 涡旋混匀;
11. 加 600 μ l BL Buffer, 涡旋 10s 混匀;
12. 70 $^{\circ}$ C 孵育 10min;

13. 加 600 μ l 无水乙醇, 涡旋 10s 混匀;
14. 把 HiBind DNA Mini Column 套在 2mL 收集管上, 转移 600 μ l 混合液至 HiBind DNA Mini Column 上, 最大速度离心 1min, 弃滤液;
15. 重复步骤 14 直至把所有混合液完全过柱;
16. 把 HiBind DNA Mini Column 套回到 2mL 收集管上, 加 500 μ l VHB Buffer 至结合柱上, 最大速度离心 1min, 弃滤液;
Note: VHB Buffer 在使用前请按说明书正确添加无水乙醇稀释。
17. 把 HiBind DNA Mini Column 套回到 2mL 收集管上, 加 700 μ l DNA Wash Buffer 至结合柱上, 最大速度离心 30s, 弃滤液;
Note: DNA Wash Buffer 在使用前请按说明书正确添加无水乙醇稀释。
18. 重复步骤 17;
19. 把 HiBind DNA Mini Column 套回到 2mL 收集管上, 空柱子最大速度离心 2min, 干燥柱子;
Note: 在洗脱前对柱子的干燥很重要, 否则残留的乙醇会影响下游实验。
20. 把结合柱套在一个新的 1.5mL 离心管, 添加 100-200 μ l 预热至 65 $^{\circ}$ C 的 Elution Buffer。室温放置 2min, 最大速度离心 1min 洗脱 DNA。
21. 弃除柱子, 保存 DNA 到 -20 $^{\circ}$ C 冰箱中。

Stool DNA Protocol (Large Volume)

1. 取 2g 粪便样品到 15 mL 或 50mL 离心管内, 把管子放在冰上。加入 10 倍体积的 SLX-Mlus Buffer。最大转速涡旋 1min 直至彻底匀浆粪便样品;
2. 加 1/10 倍体积的 DS Buffer 和 20 μ L Proteinase K, 颠倒混匀 10 次;
3. 70 $^{\circ}$ C 孵育 10min
4. 4,000xg 离心 15min;
5. 转移上清至新的 15mL 或 50mL 离心管中;
Note: 为使上清转移更加方便, 可剪切移液枪枪头尖端。
6. 加入 1/3 体积的 SP2 Buffer, 涡旋 10s, 冰浴 5min;
7. 4,000xg 离心 10min;
8. 转移上清到新的 15mL 或 50mL 离心管;
9. 加入等体积的异丙醇, 上下颠倒 10 次, 混合均匀;
10. 4,000xg 离心 10min, 弃上清, 将柱子倒扣在吸水纸上待液体流出。
11. 加入 250 μ L Elution Buffer, 涡旋混匀 20s;
12. 在 70 $^{\circ}$ C 孵育 10-20min, 孵育期间涡旋两次。
选做: 如需去除 RNA, 添加 10 μ l RNase A 涡旋混匀。

13. 加 200 μ L cHTR Reagent, 涡旋 10s 混匀;
Note: 使用前, 摇晃瓶子使 cHTR 充分重悬均匀。
14. 室温孵育 2min;
15. 最大速度离心 2min;
16. 转移 250 μ L 上清液至新的 1.5mL 离心管中;
17. 加入 10 μ L Proteinase K Solution, 涡旋混匀;
18. 加入 250 μ L BL Buffer, 涡旋 10s 充分混匀;
19. 70 $^{\circ}$ C 孵育 5min, 在孵育期间涡旋两次;
20. 加入 250 μ L 无水乙醇, 涡旋 10s 混合均匀;
21. 把 HiBind DNA Mini Column 套在 2mL 收集管上, 转移混合液至 HiBind DNA Mini Column 上, 最大速度 ($\geq 13,000xg$) 离心 1min, 弃滤液;
22. 把 HiBind DNA Mini Column 套回到 2mL 收集管上, 加 500 μ l VHB Buffer 至结合柱上, 最大速度离心 1min, 弃滤液;
Note: VHB Buffer 在使用前请按说明书正确添加无水乙醇稀释。
23. 把 HiBind DNA Mini Column 套回到 2mL 收集管上, 加 700 μ l DNA Wash Buffer 至结合柱上, 最大速度离心 30s, 弃滤液;
Note: DNA Wash Buffer 在使用前请按说明书正确添加无水乙醇稀释。
24. 重复步骤 23;
25. 把 HiBind DNA Mini Column 套回到 2mL 收集管上, 空柱子最大速度离心 2min, 干燥柱子;
Note: 在洗脱前对柱子的干燥很重要, 否则残留的乙醇会影响下游实验。
26. 把结合柱套在一个新的 1.5mL 离心管, 添加 200 μ l 预热至 65 $^{\circ}$ C 的 Elution Buffer;
27. 室温放置 2min, 最大速度离心 1min 洗脱 DNA;
28. 弃除柱子, 保存 DNA 到 -20 $^{\circ}$ C 冰箱中。

中文翻译仅供辅助阅读, 详情请以英文说明书为准