

目 录

简 介----- 2

原 理----- 2

试剂盒组成----- 3

保质期----- 3

准备工作----- 4

方案 1:从粪便样品提取 DNA (高产量)----- 4

方案 2:从粪便或环境样品提取 DNA (高纯度)----- 6

常见问题回答----- 8

版本: 2018-01

简介

MagPure Stool DNA KF Kit B 是专门为粪便样品 DNA 提取而设计。试剂盒适合于从小于 200mg 粪便样品中提取高纯度的 DNA。该试剂盒可在自动化核酸提取仪 KingFisher ML、KingFisher Flex、KingFisher Duo 上使用。该方法纯化的 DNA 包括细菌、真菌等微生物基因组 DNA。得到的 DNA 可直接用于 PCR、病毒 DNA 检测、细菌 DNA 检测等实验。

原理

MagPure 纯化系统采用高结合力的超顺磁性的磁性粒子为基质，在高浓度离子化剂(如盐酸胍或异硫氰酸胍)条件下，纳米磁性粒子可通过氢键和静电吸附核酸，而蛋白质或其它杂质不被吸附而去除。吸附了核酸的纳米粒子经洗涤去除蛋白质和盐，最后可以用低盐缓冲液(如 Buffer TE)或水，洗脱出粒子上的核酸。得到的核酸纯度高，可直接用于各种下游实验。MagPure 系统采用的溶液体系和纯化方式是专门为自动化核酸提取而设计，已在 KingFisher 自动化核酸纯化仪上广泛运用。也适用于其它提取仪或移液工作站。

MagPure Stool DNA KF Kit B 基于高结合力的纳米磁性粒子的纯化方式。样品经裂解液裂解，离心得到上清液。各种抑制因子经 Buffer PCI 处理后离心去除，得到的上清液。加入结合液和磁性粒子吸附 DNA，而蛋白质则不被吸附而去除。吸附了 DNA 的粒子经洗涤液洗涤去除残留的蛋白质和其它杂质，再经高浓度的乙醇液洗涤去除盐分，最后 DNA 被低盐缓冲液(10Mm Tris, pH8.5)洗脱。洗脱的 DNA 可直接用于 PCR、病毒检测等实验。

保质期

MagPure Stool DNA KF Kit B 除 MagPure Particle 和 Buffer PCI 外，可在室温下(15-25℃)干燥保存 18 个月。长期保存时需置于 2-8℃。低温下，Buffer ATL 可能会有沉淀形成，需 55℃ 水浴让沉淀完全溶解后再使用。MagPure Particle 和 Buffer PCI 保存于 2-8℃。

组 成

MagPure Stool DNA KF Kit B

产品编号	MD5115-01B	MD5115-02B	MD5115-03B
纯化次数	50 次	200 次	500 次
MagPure Particle	1.7 ml	7.0 ml	12 ml
Proteinase K	24 mg	90 mg	220 mg
Protease Dissolve Buffer	1.8 ml	15 ml	20 ml
RNase A	5 mg	20 mg	45 mg
Buffer ATL	60 ml	250 ml	550 ml
Buffer PVP-10	1.2 g	5.0 g	11 g
Buffer PCI	50 ml	150 ml	350 ml
Buffer MLE *	24 ml	90 ml	240 ml
Buffer GDP	60 ml	250 ml	550 ml
Buffer AW1 *	22 ml	110 ml	220 ml
Buffer AE	20 ml	60 ml	60 ml
说明书	1	1	1

需要准备材料和工具

- 70~75%乙醇和无水乙醇
- Buffer AW1 *使用前，须按瓶子标签所示，加入无水乙醇进行稀释。
- Buffer MLE *使用前，须按瓶子标签所示，加入异丙醇进行稀释。
- MagPure Particles 初次使用时，必须剧烈摇晃 1-2 分钟让磁珠充分分散。
- 溶解 Proteinase K (20mg/ml): 加入适量的 Protease Dissolve Buffer 至 Proteinase K 干粉中至终浓度为 20mg/ml，轻轻颠倒让蛋白酶 K 充分溶解。分装保存-20℃。
- 溶解 RNase A (15mg/ml): 加入适量的 Protease Dissolve Buffer 溶解 RNase A 至终浓度为 15mg/ml，颠倒混匀让 RNase A 充分溶解。RNase A 干粉可在室温下，但溶解的 RNase A 须保存于-20~8℃。

方案 1: 从粪便样品提取总 DNA(高产量)

该方案适合于从小于 100~150mg 粪便中提取 DNA，适合于 KingFisher 系列或其它类似功能的核酸提取仪。

- 1. 在 2.0ml 离心管中，加入 500mg 混合玻璃珠(0.1~0.6mm)和 2 粒钢珠。
- 2. 转移加入 100~150mg 粪便样品至装有研磨珠的离心管中。若样品为液体，吸取 0.15~0.2ml 样品。吸取时，把枪头的头部剪去以方便转移。
- 3. **加入 0.6ml Buffer ATL/PVP-10 和 0.6ml Buffer PCI 至样品中**，转移至珠磨仪高速研磨样品。珠磨仪推荐为 FastPrep-24, Tissue Lyser 等。
使用前，把 PVP-10 粉末倒至 Buffer ATL 瓶子中，颠倒混匀，完全溶解后使用。处理土壤样品、富含色素的样品时，按 1ml Buffer ATL 加入 3ul 冰醋酸，混匀后再进行操作，冰醋酸能利于减少色素。
- 4. 65℃ 水浴 20 分钟进一步裂解细菌。
- 5. ≥14,000 × g 离心 10 分钟。
若上清液中颜色很深，建议把 Wash 1 中 700ul Buffer AW1 换成 500ul GDP，提取色素去除效果。
- 6. 根据仪器的类型选择合适的操作流程。

A1. KingFisher Flex 提取仪

- 1. 并按下表把各种试剂转移至相应的 96 DW Plate 中。

名称	板类型	试剂
Elution	浅孔板	100µl Buffer AE
Wash 3	深孔板	700µl 70~75% ethanol
Wash 2	深孔板	700µl 70~75% ethanol
Wash 1	深孔板	700µl Buffer AW1
		30µl MagPure Particles
		Comb
Sample	深孔板	600µl Buffer MLE
		400µl 上清液
		20µl Proteinase K
		5µl RNase A

- 2. 启动 Kingfisher Bindit3.3。执行程序 MagPure_Stool_DNA_KF。
- 3. 按仪器指示，把相应的 96 孔板转移至 KingFisher Flex 中。
- 4. 约 40 分钟后，程序完毕。
- 5. 取出 Elution 板，用封口膜密封样品。把样品保存于-20℃。

A2. KingFisher Duo 提取仪

- 1. 按下表把其它试剂转移至相应的孔中。

名称	试剂
洗脱条	Buffer AE: 100µl
孔 G, H	空
孔 E: Wash 3	700µl 70~75% ethanol
孔 D: Wash 2	700µl 70~75% ethanol
孔 C: Wash 1	700µl Buffer AWW1
孔 B:	30µl MagPure Particles
	磁力套
孔 A: Sample	600µl Buffer MLE
	400µl 粪便裂解液
	20µl Proteinase K
	5µl RNase A

- 2. 启动 Kingfisher Bindit3.3。
- 3. 执行程序 MagPure_Stool_DNA_Duo。
- 4. 把试剂条和磁力套放在 KingFisher Duo 中。
- 5. 约 40 分钟后，程序完毕。
- 6. 取出洗脱条，转移 DNA 样品至新的离心管中，并保存于-20℃。

方案 2: 从粪便样品提取总 DNA(高纯度)

该方案适合于从小于 100~150mg 粪便或 300-500mg 土壤样品中提取 DNA，适合于 KingFisher 系列或其它类似功能的核酸提取仪。

- 1. 在 2.0ml 离心管中，加入 500mg 混合玻璃珠(0.1~0.6mm)和 2 粒钢珠。转移加入 100~150mg 粪便样品或 300-500mg 土壤样品至装有研磨珠的离心管中。若样品为液体，吸取 0.15~0.2ml 样品。吸取时，把枪头的头部剪去以方便转移。
- 2. 加入 0.6ml Buffer ATL 和 0.6ml Buffer PCI 至样品中，转移至珠磨仪高速研磨样品。珠磨仪推荐为 FastPrep-24, Tissue Lyser 等。
处理土壤样品、富含色素的样品时，按 1ml Buffer ATL 加入 3ul 冰醋酸，混匀后再进行操作，冰醋酸能利于减少色素。
- 3. 65℃ 水浴 20 分钟进一步裂解细菌。
- 4. $\geq 14,000 \times g$ 离心 10 分钟。
- 5. 根据仪器的类型选择合适的操作流程。

A1. KingFisher Flex 提取仪

- 6. 并按下表把各种试剂转移至相应的 96 DW Plate 中。

名称	板类型	试剂
Elution	浅孔板	100µl Buffer AE
Wash 4	深孔板	700µl 75% ethanol
Wash 3	深孔板	700µl 75% ethanol
Wash 2	深孔板	700µl Buffer AW1
Wash 1	深孔板	400µl Buffer GDP
		30µl MagPure Particles
		Comb
Sample	深孔板	600µl Buffer GDP
		400µl 上清液

- 7. 启动 Kingfisher Bindit3.3。执行程序 MagPure_Stool_DNA_KF_2。
- 8. 按仪器指示，把相应的 96 孔板转移至 KingFisher Flex 中。

- 9. 约 40 分钟后，程序完毕。
- 10. 取出 Elution 板，用封口膜密封样品。把样品保存于-20℃。

A2. KingFisher Duo 提取仪

- 7. 按下表把其它试剂转移至相应的孔中。

名称	试剂
孔 H	Buffer AE: 100µl
孔 G	
孔 F: Wash 3	700µl 70~75% ethanol
孔 E: Wash 3	700µl 70~75% ethanol
孔 D: Wash 2	500µl Buffer AWW1
孔 C: Wash 1	400µl Buffer GDP 30µl MagPure Particles
孔 B:	磁力套
	600µl Buffer GDP
孔 A: Sample	400µl 粪便裂解液 20µl Proteinase K

- 8. 启动 Kingfisher Bindit3.3。
- 9. 执行程序 MagPure_Stool_DNA_Duo_2。
- 10. 把试剂条和磁力套放在 KingFisher Duo 中。
- 11. 约 40 分钟后，程序完毕。
- 12. 取出洗脱条，转移 DNA 样品至新的离心管中，并保存于-20℃。

常见问题回答

该列表可能有利于解决提取过程所碰到的问题。Magen 的技术人员也可以随时为您提供服务，若您对试剂盒存在问题或建议，或您在分子生物学碰到问题，都请您联系我们。我们将竭尽所能为您排忧解难。

现象及原因	解决方法
DNA 有颜色	
样品使用量太多	粪便用量不要超过 200mg。初次使用时，建议粪便样品用量为 100mg，根据实验结果再调整样品用量。
Proteinase K 活性下降	使用新制备的 Proteinase K。Proteinase K 需要分装保存，用完后，立即保存于-20℃。
DNA 产量低	
样品贮藏条件不正确	粪便样品富含核酸酶，粪便样品必须保存于-20℃。加入 Buffer ATL 之前，不要让样品解冻。
样品有裂解液没有充分打散	粪便样品在 Buffer ATL 中必须高速涡旋让样品充分分散。
Proteinase K 活性下降	使用新制备的 Proteinase K。Proteinase K 需要分装保存，用完后，立即保存于-20℃。
Buffer AW1 中乙醇没有加入或加入量不够	按说明书或瓶子标签所示，加入正确的乙醇。
MagPure Particles 没有充分打散	初步使用 MagPure Particles 时，必须充分剧烈振荡 1-2 分钟以打散 MagPure Particles。
洗脱体积不够	增加洗脱体积以提高洗脱效率。