

Version: AA 4.0 (2024.02.22修订)

SPARKeasy Feces DNA Kit

粪便基因组DNA快速提取试剂盒

(离心柱型)

目录号: AA0701

01/产品组分

序号	组分	50次 AA0701-A	50次 AA0701-B
1	平衡液	5 mL	5 mL
2	缓冲液 ASL	70 mL	70 mL
3	杂质清除剂 AB	5 mL	5 mL
4	结合液 CB	11 mL	11 mL
5	抑制物去除液 IR	25 mL	25 mL
6	漂洗液 WB	15 mL 第一次使用前加入 60 mL 无水乙醇	
7	洗脱缓冲液 EB	15 mL	15 mL
8	蛋白酶 K 溶液 20 mg/mL	-	1 mL
9	吸附柱 AC	50 个	50 个
10	收集管 (2 mL)	50 个	50 个

02/保存条件

蛋白酶 K 溶液于-20°C保存; 其它组分室温 (15-25°C) 保存。

03/产品概述

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, 并且操作简单方便, 可在 30 min 内完成单个或多个样品的提取。

动物粪便样品经特殊缓冲液 ASL 重悬后, 70 °C 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 在高离子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，进一步将蛋白、多糖、多酚以及细胞代谢物等杂质去除，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。

04/自备材料

异丙醇、无水乙醇

05/注意事项

请务必在使用本试剂盒之前阅读此注意事项

- ◇ 所有离心操作步骤，均在室温（15-25℃）下进行。
- ◇ 结合液 CB、缓冲液 ASL 或者抑制物去除液 IR 低温时可能出现析出和沉淀，可以在 37℃ 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。
- ◇ 结合液 CB 和抑制物去除液 IR 中含有刺激性化合物，操作时要戴乳胶手套，避免沾染皮肤，眼睛和衣服。若沾染皮肤、眼睛时，要用大量清水或者生理盐水冲洗。
- ◇ 避免试剂长时间暴露于空气中产生挥发、氧化、pH 值变化，各溶液使用后应及时盖紧瓶盖。
- ◇ PCR 可能被过量的 DNA（一般大于 1 μg）抑制，使用最小用量的洗脱 DNA（适当稀释）反而可以得到更好的扩增。一般加入的洗脱 DNA 体积不要超过总 PCR 反应体积的 10%。我们建议在 PCR 反应体系中加入终浓度 0.1 μg/μL 的 BSA（牛血清白蛋白）有助于得到最佳扩增效果。
- ◇ 第一次使用前请先在漂洗液 WB 中加入指定量无水乙醇，充分混匀，加入后请及时在方框打钩标记已加入乙醇，以免多次加入！
- ◇ 关于平衡液的使用：取一个新的硅胶膜吸附柱装在收集管中，吸取 100 μL 的平衡液至柱中。12,000 rpm（13,400×g）离心 1 min，倒掉收集管中废液，将吸附柱重新放回收集管。此时平衡液预处理柱完毕。平衡液在保存过程中可能有沉淀生成，请加热至 37℃ 使沉淀完全消失。

06/使用方案

1. 收集约 200-220 mg 粪便到一个 2 mL 离心管，置冰上。
 - ▲ 如果是冰冻的标本，加入缓冲液 ASL 前不能解冻，否则 DNA 容易降解。
2. 加 1.4 mL 缓冲液 ASL，连续涡旋振荡 1 min 或者直到完全混匀均一。
 - ▲ 注意完全涡旋混匀，否则会严重降低产量。
3. 将重悬物 70℃ 温育 5 min。
 - ▲ 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℃。

4. 涡旋振荡15 s，室温放置1 min。12000 rpm (13,400×g) 离心1 min沉淀粪便颗粒。
5. 转移900 μL上清到一个1.5 mL离心管，加入100 μL杂质清除剂AB，立刻涡旋振荡1 min或者直到完全混匀均一，室温放置1 min。
12000 rpm (13,400×g) 离心3 min去除杂质。
6. 转移所有上清到一个1.5 mL离心管，12000 rpm (13,400×g) 离心3 min。
7. 转移210 μL上清到一个1.5 mL离心管，加入20 μL蛋白酶K (20 mg/mL) 溶液，充分混匀，加入200 μL结合液CB，涡旋振荡15 s，充分混匀。70°C温育10 min。
▲如果产量偏低，可以转移更多的上清，并且相应的按比例提高蛋白酶K和结合液的和后面的异丙醇使用量。
8. 冷却后加入100 μL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用平衡液预处理过的吸附柱AC中，12,000 rpm (13,400×g) 离心30 s，倒掉收集管中的废液。
▲吸附柱一次最多只可以容纳大约700 μL混合物，因此需要分次把混合物上到吸附柱内，重复步骤9。
10. 加入500 μL抑制物去除液IR，12,000 rpm (13,400×g) 离心30 s，弃废液。
11. 加入600 μL漂洗液WB (请先检查是否已加入无水乙醇!)，12,000 rpm (13,400×g) 离心30 s，弃掉废液，重复漂洗一次。
12. 将吸附柱AC放回空收集管中，12,000 rpm (13,400×g) 离心2 min，尽量除去漂洗液，以免漂洗液中残留乙醇抑制下游反应。
13. 取出吸附柱AC，放入一个干净的离心管中，在吸附膜的中间部位加50-100 μL洗脱缓冲液EB (事先在65-70°C水浴中预热)，室温放置2 min，12,000 rpm (13,400×g) 离心1 min。将得到的溶液重新加入离心吸附柱中，室温放置2 min，12,000 rpm (13,400×g) 离心1 min。
▲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 μL，体积过小降低DNA洗脱效率，减少DNA产量。
14. DNA可以存放在2-8°C，如果要长时间存放，可以放置在-20°C。

07/流程简图



裂解：收集约200-220 mg粪便至2 mL离心管，置冰上

1.4 mL **缓冲液ASL**，涡旋振荡1 min

70°C温育5 min，涡旋15 s，静置1 min，13,400×g离心1 min
吸900 μL上清



去抑制物：100 μL **杂质清除剂AB**，涡旋1 min，静置1 min

13,400×g离心3 min吸上清至新的1.5mL离心管

13,400×g离心3 min，转移210 μL上清至1.5mL离心管



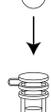
去蛋白：20 μL **蛋白酶K (20 mg/mL)** 立即充分混匀

200 μL **结合液CB**，立刻涡旋振荡混匀，70 °C 10 min



结合：100 μL异丙醇，立刻涡旋振荡混匀

将混合物加入预处理的**吸附柱AC**，13,400×g离心30 s



去抑制物：500 μL **抑制物去除液IR**，13,400×g离心30 s

去盐离子：600 μL **漂洗液WB**(请先检查是否已加入无水乙醇！)

13,400×g离心30 s，两次

去残留乙醇：13,400×g空甩2 min



洗脱：50-100 μL **洗脱液EB** (65-70°C预热)

室温静置2 min，13,400×g离心1 min，可重复洗脱一次

长期储存-20°C

08/相关产品

AA1906 蛋白酶K (10 mg/mL)

AC0701 SPARKeasy 粪便RNA提取试剂盒

AF0802 2×SparkHiFi Max Master Mix (with dye)

AF0803 2×SparkHiFi Max Master Mix (without dye)

本产品仅用于科学研究！

Tel: 0531-82387577

Web: <http://www.sparkjade.com>

Support: support@sparkjade.com

