

**PowerFecal™ DNA Isolation kit****强力粪便 DNA 提取试剂盒**

货号	提取次数
12830-50	50 次

简介

PowerFecal™ DNA Isolation kit 专门设计用于简便快速粪便、肠内容物、生物固体样品微生物和宿主总 DNA。基于 PowerSoil™ DNA Isolation Kit 开发，使用了无论对土壤还是粪便样品同样奏效的专利抑制因子去除技术 (Inhibitor Removal Technology®)。IRT 技术能高效去除常见于粪便样品的多糖、亚铁血红素和胆汁盐等抑制因子。纯净的最终 DNA 可直接用于所有下游实验。

操作预览

粪便或生物固体建议加样 0.25g。样品装入到含有石榴石研磨珠的独立 2ml Bead Beating Tube 中。在研磨珠的机械碰撞和化学试剂对细胞膜的破解作用促使下宿主、微生物细胞裂解，高效的提取效果足以应付最难搞的微生物类型。专利的抑制因子去除技术 (Inhibitor Removal Technology®) 接着去掉粪便样品中常见的 PCR 抑制物。总基因组 DNA 吸附到硅胶滤膜上。经过冲洗和洗脱，纯净的最终 DNA 可直接用于 PCR、qPCR、第二代测序等进一步应用。

相关产品	货号	提取次数
PowerMax® Soil DNA Isolation Kit	12988-10	10 preps
PowerSoil®-htp 96 Well Soil DNA Isolation Kit	12955-4	4 × 96 preps
	12988-12	12 × 96 preps
PowerVac™ Manifold	11991	1 manifold
PowerVac™ Mini System	11992	1 unit + 20 adapters
PowerVac™ Mini Spin Filter Adapters	11992-10	10 adapters
	11992-20	20 adapters

设备要求

微型离心机 (13000g)

移液器 (60 μl – 750 μl)

Vortex-Genie®2 涡旋仪 (MO BIO 货号#13111-V-220)

涡旋仪适配器 (MO BIO 货号#13000-V1)

保存

组分室温 (15-30℃) 保存。



PowerFecal™ DNA Isolation Kit

Prepare Sample



- Add sample to Dry Bead Tube
- Add Bead Solution
- Add Solution C1
- Heat Tubes at 65°C
- Attach to Vortex Adapter
- Vortex



Centrifuge

Cell Lysis



- Add Solution C2
- Incubate at 4°C



Centrifuge

Inhibitor Removal Technology®



- Add Solution C3
- Incubate at 4°C



Centrifuge

Bind DNA



- Add Solution C4
- Load into Spin Filter



Centrifuge

Wash



- Wash with Solution C5



Centrifuge

Elute



- Elute with Solution C6



试剂盒组分

货号: 12830-50	
组分	量
Dry Bead Tubes	50
Bead Solution	42ml
Solution C1	3.3ml
Solution C2	14ml
Solution C3	11ml
Solution C4	72ml
Solution C5	30ml
Solution C6	6ml
Spin Filters(units in 2ml Tubes)	50
2 ml Collection Tubes	200

△实验前请先逐一检查试剂!

保存

组分室温 (15-30°C) 保存。

操作步骤

1、加入 0.25g 粪便或生物固体到 **Dry Bead Tube** 中。

注意: 水分、多糖和蛋白含量较高的粪便样品 (如胎便、某些鸟类粪便) 减少加样量 (0.1g) 能提高 DNA 得率和纯度。

2、加入 **750 μl Bead Solution** 到 **Dry Bead Tube** 中。轻轻涡旋混匀。

这一步发生了什么: 把样品加入到 **Bead Tube** 后, 下一步就是样品均质化和细胞裂解。石榴石研磨珠和裂解缓冲液可溶解和把样品分散开。

3、使用前先检查 **C1 溶液**。若有沉淀, 60°C 水浴直至全部溶解。

这一步发生了什么: **C1 溶液** 含有 **SDS**。温度较低时会在瓶底形成白色沉淀。60°C 水浴可重新溶解 **SDS**, 并且对 **SDS** 和其它组分性能无损。可趁热使用。

4、加入 **60 μl C1 溶液**, 上下颠倒数次或轻轻涡旋混匀。

这一步发生了什么: **C1 溶液** 含有 **SF** 和其它裂解试剂可辅助细胞裂解。**SDS** 是种去垢剂, 可降解细胞膜上的脂肪酸和油脂。

5、65°C 水浴加热 10min。

这一步发生了什么: 粪便样品杂合了许多多糖、脂类、盐和细胞等。加热可加快裂解缓冲液与这些物质的反



应速度，辅助裂解细胞。

- 6、把 **Bead Tubes** 水平放置到涡旋仪适配器上（MOBIO 货号：13000-V1）。最大转速连续涡旋振荡 10min。

这一步发生了什么：研磨珠与微生物细胞在裂解试剂包围下震荡，可使细胞破裂。MOBIO 的涡旋仪适配器是个简单而有效的附件，在涡旋振荡过程中能把 Tube 管牢牢卡在涡旋仪上。你也可以用胶带把 Tube 管固定在适配器上，但有可能在振荡过程中松脱，影响样品间条件一致性，降低得率。

- 7、13000g 离心 1min。

- 8、把上清转移到一个干净的 **2ml Collection Tube**（试剂盒提供）中。约可获得 400-500 μ l 上清。

这一步发生了什么：这一步约可获得 400-500 μ l 上清液。预期的体积与样品起始量有关，不影响提取效率。

- 9、加入 **250 μ l C2 溶液**，轻轻涡旋混匀。4 $^{\circ}$ C 孵育 5min。

这一步发生了什么：C2 溶液为专利的 Inhibitor Removal Technology[®]（IRT）的一部分。它含有可沉淀多糖、细胞碎片和蛋白质等非 DNA 的有机和无机物质的试剂。这些有机和无机物质会影响 DNA 纯度并抑制下游实验，必须去除。

- 10、13000g 离心 1min。

- 11、避开沉淀，最多只转移 600 μ l 上清到一个干净的 **2ml Collection Tube**（试剂盒提供）中。

这一步发生了什么：沉淀为多糖、细胞碎片、蛋白等非 DNA 有机和无机成分。为获得最佳 DNA 得率和质量，转移上清时避开沉淀。

- 12、加入 **200 μ l C3 溶液**，轻轻涡旋。4 $^{\circ}$ C 孵育 5min。

- 13、13000g 离心 1min。

- 14、避开沉淀，转移上清到一个干净的 **2ml Collection Tube**（试剂盒提供）中。转移的上清液不能超过 750 μ l。

这一步发生了什么：沉淀为多糖、细胞碎片、蛋白等非 DNA 有机和无机成分。为获得最佳 DNA 得率和质量，转移上清时避开沉淀。转移的上清不能超过 750 μ l，否则会影响后续 DNA 的吸附绑定。

- 15、C4 溶液使用前先摇匀。加入 **1200 μ l C4 溶液**到上清中，涡旋 5s 混匀。

这一步发生了什么：C4 溶液为高浓度盐溶液。可让 DNA 牢牢地选择性吸附到硅胶滤膜上，非 DNA 的有机和无机物质不被吸附，但仍会少量残留在滤膜上。

- 16、加载 650 μ l 上清到一个 **Spin Filter** 中，13000g 离心 1min。弃去滤液，重复加载上清。

注意：一共需要加载 3 次上清。

高通量选项：一次要处理大量样品时，步骤 16 会变得非常耗时。因此 MOBIO 开发出了真空泵抽吸法。需要额外购买真空泵适配器（MOBIO 货号：11992）。平底 Spin filter 在真空泵适配器帮助下能快速完成滤过动作。

这一步发生了什么：DNA 在高浓度盐环境下选择性地吸附到离心柱硅胶滤膜上。杂质通过滤膜，剩下 DNA 留在滤膜上。

- 17、加入 500 μ l C5 溶液，13000g 离心 1min。



这一步发生了什么：**C5** 是含有酒精的冲洗缓冲液，可进一步冲洗离心柱硅胶滤膜上的 DNA。冲洗缓冲液还能去除硅胶滤膜上残留的少量含和其它杂质。

18、弃去滤液。

这一步发生了什么：滤液不含 DNA。

19、13000g 再次离心 1min。

这一步发生了什么：再次离心去除残留的 **C5** 溶液（含有酒精的冲洗缓冲液）。含有酒精的 **C5** 溶液必须全部去除掉，以免影响后续 PCR、消化、凝胶电泳等 DNA 应用。

20、小心把 Spin Filter 转移到一个干净的 **2ml Collection Tube**（试剂盒提供）中。避免沾到任何 **C5 溶液**。

21、加入 **100 μl C6 溶液**到离心柱白色滤膜中心。你也可以用灭菌 DNA-Free PCR 级纯水或 TE 缓冲液从硅胶离心柱上洗脱 DNA。

注意：用 **100 μl C6 溶液**可获得最佳的 DNA 得率。为了浓缩 DNA，**C6 溶液**使用量最少可以只加 **50 μl**。**C6 溶液**用量少于 **50 μl**会严重影响洗脱效率。

这一步发生了什么：把 **C6 溶液**（灭菌洗脱缓冲液）加到离心柱白色滤膜中心，并润湿整个滤膜才能获得最佳洗脱效果。**C6 溶液**（洗脱缓冲液）通过滤膜，DNA 在高浓度盐环境下选择性吸附到滤膜上，在 **C6 溶液**（**10mM Tris**）低盐环境下洗脱下来。

22、13000g 离心 1min，弃去 Spin Filter。

此时 Tube 管中的 DNA 可直接用于下游实验，无需进一步处理。

DNA 建议 $-20^{\circ}\text{C}\sim-80^{\circ}\text{C}$ 冷冻保存。**C6 溶液**不含 EDTA。要浓缩 DNA，可参考下文疑难点。

感谢选用 PowerFecal™ DNA Isolation Kit!

疑点难点

样品处理量

本试剂盒设计每次提取 **0.25g** 粪便样品。我们不推荐加样超过 **0.25g**。含有大量蛋白质、脂类和多糖的某些粪便样品，较少的加样量（**0.1g**）可提高 DNA 得率和纯度。

含水量较大的粪便样品

若粪便样品含有较多水分，可把样品加入到 **Bead tube** 以后，**10000g** 离心 **30s**。抽掉所有游离水分。接着步骤 2 继续。



若 DNA 扩增失败

- 通过凝胶电泳和分光光度法同时检测 DNA 得率。过浓的 DNA 模板会抑制 PCR 扩增。
- 使用 PowerFecal™ DNA Isolation Kit 提取的 DNA 通常不需要稀释模板 DNA，但也可一试。
- 若经过上述方法，DNA 仍扩增失败，请检查 PCR 反应体系（修改反应条件和重新选择引物）。

可选裂解方法

- **为减少 DNA 断裂：** 加入 C1 溶液后，涡旋 3-4s，然后 70°C 水浴 5min。涡旋 3-4s，再加热 5min。涡旋 3-4s。此可选处理方法能减少 DNA 断裂，但也会降低得率。

浓缩 DNA

最终 DNA 体积为 100 μ l。要浓缩 DNA 可加入 10 μ l 5M NaCl，上下颠倒 3-5 次混匀。然后加入 200 μ l 100% 冷乙醇，上下颠倒 3-5 次混匀。室温 10000g 离心 5s。弃去所有上清。用真空离心蒸发器、干燥器或冷干机除去残余乙醇。用去离子水或灭菌 10mM Tris 重悬 DNA。

DNA 保存

洗脱到 C6 溶液（10mM Tris）的 DNA 必须保存在 -20°C ~ -80°C 防止降解。为了延长保存时间，建议把 DNA 等分后 -80°C 保存。你也可以用 TE 缓冲液洗脱 DNA，而 EDTA 会抑制下游 PCR 等酶反应，不建议采用。

更多实用技巧请参阅 <http://www.anbiosci.com/MBweibo/blog.htm>