

QIAamp® Fast DNA Stool Mini 操作步骤

试剂盒组分：

QIAamp® Fast DNA Stool Mini Kit	(50)
Catalog no.	51604
Number of preps	50
QIAamp Mini spin columns	50
Collection Tubes (2 ml)	200
InhibitEX® Buffer	140 ml
Buffer AL*	33 ml
Buffer AW1* (concentrate)	19 ml
Buffer AW2† (concentrate)	13 ml
Buffer ATE	12 ml
Proteinase K	1.4 ml

试剂盒保存及运输：

QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit 是以常温运输的，并且在干燥的室温(15–25°C)条件下保存 1 年。QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit 包含即用型的 proteinase K 溶液，这个溶液是以特殊的储存液的形式提供的。Proteinase K 可以在室温下稳定 1 年。如果希望保存时间在 1 年以上，或者室温经常超过 25°C，建议将 proteinase K 储存在 2–8°C。

用户需要自备的仪器及试剂：

操作化学用品，请穿戴实验服、一次性手套及防护眼镜。更多安全信息请咨询生产厂家的安全操作数据。

- 无水乙醇(96–100%)*

- 1.5 ml 和 2 ml 离心管 (例如 : Eppendorf Safe-Lock, cat. no.

0030120.094 或者 Sarstedt Safe-Seal, cat. no. 72.695)†

- 枪头 (建议使用带气阀的枪头以防止交叉污染)
- 离心机 (带有可装载 2 ml 离心管的转子)
- 可以插入 2ml 离心管的热混合器或者可以孵育 70°C 的水浴锅。
- 刮刀 (例如 : Sarstedt cat. no. 81.970)†
- 涡旋仪
- 冰

注意事项 :

试剂准备 :

- InhibitEX Buffer (室温 15–25°C 储存)

彻底混匀 InhibitEX Buffer。如果有沉淀形成 , 37–70°C 孵育直到沉淀完全溶解。

InhibitEX Buffer 在储存过程中会产生颜色改变(橘色) , 但并不影响其功能。

- Buffer AL* (室温 15–25°C 储存)

彻底混匀 Buffer AL , 如果有沉淀形成 , 70°C 孵育直到沉淀完全溶解。

Buffer AL 可以在室温下稳定储存 1 年。

注意 : 不要直接将 proteinase K 加入到 Buffer AL 中。

- Buffer AW1* (室温 15–25°C 储存)

Buffer AW1 是以浓缩液的形式提供的 , 第一次使用之前 , 按照瓶子上的标注加入 25 ml 无水乙醇(96–100%) 。

Buffer AW1 可以在室温下稳定储存 1 年。

Buffer AW1 使用之前请务必混匀。

- Buffer AW2† (室温 15–25°C 储存)

Buffer 是以浓缩液的形式提供的，第一次使用之前，按照瓶子上的标注加入 30ml 无水乙醇(96–100%)。

Buffer AW2 可以在室温下稳定储存 1 年。

Buffer AW2 使用之前请务必混匀。

QIAamp Mini spin columns 的操作：

鉴于核酸扩增技术的敏感性，有必要在操作 QIAamp Mini spin columns 时采取以下预防措施以避免样品间的交叉污染：

- 小心将样品/溶液加入到 QIAamp Mini spin column 中，不要沾湿边缘。
- 液体转移过程中需要更换枪头，建议使用带气阀的枪头以避免样品交叉污染。
- 避免枪头接触到 QIAamp 的膜。
- 为避免交叉污染，建议在每一次涡旋步骤结束后都短离心一下，将离心管内壁及管盖的液体都收集在管底。
- 整个操作过程请穿戴好一次性手套，一旦手套有接触到样品，请立即更换手套。
- 将 QIAamp Mini spin column 放入离心机前请务必盖好管盖，按照操作说明书的说明进行离心。
- 将 QIAamp Mini spin column 和收集管从离心机中取出。QIAamp Mini spin column 置于一个新的收集管中。弃流出液和旧的收集管。请注意，流出液可能会含有有毒物质，应该妥善处理。
- 一次只打开一个 QIAamp Mini spin column，小心操作，避免产生气雾。

- 为了有效地同时处理多个样品，可以将多个收集管置于试管架上，离心后 QIAamp Mini spin columns 就可以同时转移了。弃含有流出液的收集管，将装有 QIAamp Mini spin columns 的新的收集管直接放入离心机。

离心：

QIAamp Mini spin columns 适合标准的 1.5 和 2 ml 离心管。可以单独订购 2 ml 的收集管进行应用。

所有的离心步骤都应在室温(15–25°C)下，20,000 x g (约 14,000 rpm)下进行。如果您的离心机不能达到这个转速，可以适当延长离心时间。例如：20,000 x g 离心 5min 可以用 10,000 x g 离心 10min 代替。

操作步骤：粪便中分离 DNA 用于人类 DNA 研究

此操作步骤中的裂解条件已经优化用于增加人类/非人类 DNA 的比例。此操作步骤中的非人类 DNA 不能被去除。

注意事项：

所有的离心步骤都应在室温(15–25°C)下，20,000 x g (约 14,000 rpm)下进行。如果离心机不能达到这个转速，可以适当延长离心时间。例如：20,000 x g 离心 5min 可以用 10,000 x g 离心 10min 代替。

实验前准备：

- 用于第 7 步的可以插入 2ml 离心管的热混合器或者可以孵育 70°C 的水浴锅。
- 37–70°C 孵育溶解 Buffer AL 和 InhibitEX Buffer 中的沉淀。
- 将无水乙醇加入到 Buffer AW1 和 Buffer AW2 浓缩液中。
- 使用之前将所有的 Buffer 混匀。

操作步骤：

1、2 ml 离心管（自备）中称量 180–220 mg 粪便，置于冰上。

此操作步骤是用于 180–220 mg 粪便进行优化的，但同样适用于更少量的样品。

如果样品量不足 180–220 mg，无需减少 Buffer 的用量。

如果样品量 > 220 mg，请参考第 26 页的“Protocol: Isolation of DNA from Larger Volumes of Stool”（英文标准）。

如果是液体样品，离心管中加入 200 μ l 样品，吸取黏液样品时，可以适当减短枪头以便于操作。

如果是冷冻样品，可以用剪刀或者刮刀将样品刮入 2 ml 离心管，置于冰上。

注意：使用冷冻样品时，保持样品冷冻直至第二步加入 InhibitEX Buffer 裂解样本，否则样品中的 DNA 就会被降解。加入 InhibitEX Buffer 后，剩下所有的步骤都可以在室温 (15–25°C) 下操作了。

2、每一份粪便样品中加入 1 ml InhibitEX Buffer，持续涡旋混匀 1 min，或直至粪便样品完全均质化。

注意：样品彻底涡旋混匀非常重要，可以保证最后洗脱得到最大浓度的 DNA。

3、全速离心样品 1 min 沉淀粪便颗粒。

重点注意事项：不要转移任何固体物质。如果在上清中仍有可见颗粒，再次离心样品。

4、将 25 μ l proteinase K 加入到新的 2 ml 离心管(自备)中。

5、将 600 μ l 第 3 步得到的上清液加入到含有 proteinase K 的 2 ml 离心管中。

6、加入 600 μ l Buffer AL，涡旋 15 s。

注意：不要直接将 proteinase K 加入到 Buffer AL 中。样品和 Buffer AL 能彻底涡旋混匀形成均质液是非常必要的。

7、70°C 孵育 10 min。

短离心去除管壁和管盖上的液体（可选）。

8、裂解液中加入 600 µl 无水乙醇 (96–100%)，涡旋混匀。

短离心去除管壁和管盖上的液体（可选）。

9、小心将 600 µl 第 8 步得到的裂解液加入到 QIAamp spin column 上。

盖上管盖，全速离心 1 min。将 QIAamp spin column 置于一个新的 2 ml 收集管中，弃含有流出液的旧离心管。

10、重复第 9 步直至所有的裂解液都通过柱子。

离心过程中盖好所有柱子的盖子，避免气雾的形成。如果裂解液在离心后并未完全通过柱子，再次离心直至 QIAamp spin column 完全排空。

11、小心打开 QIAamp spin column，加入 500 µl Buffer AW1。

全速离心 1 min。将 QIAamp spin column 置于一个新的 2 ml 收集管中，弃含有流出液的旧离心管。

12. 小心打开 QIAamp spin column，加入 500 µl Buffer AW2。

全速离心 3min。弃含有流出液的旧离心管。

注意：洗脱液中残留的 Buffer AW2 会在下游的应用中造成干扰。有些离心转子在减速过程中会振动，造成含有 Buffer AW2 的流出液接触到 QIAamp spin column。将 QIAamp spin column 和收集管从转子上取下来也可能使流出液接触到 QIAamp spin column。

13、将 QIAamp spin column 置于一个新的 2 ml 收集管(自备)中，弃含有流出液的收集管。

全速离心 3min.

此步骤可以帮助去除可能残留的 Buffer AW2.

14、将 QIAamp spin column 置于一个新的标记过的 1.5 ml 离心管 (自备) 中，直接向 QIAamp 膜中加入 200 μ l Buffer ATE。室温孵育 1 min ，全速离心 1 min 洗脱 DNA。

如果通过 UV 吸光度值来对 DNA 进行定量，使用 Buffer ATE 调零避免错误结果。关于如何测定 DNA 产量、长度的更多信息，请参考第 33 页的附录。如果需要长期储存 DNA，我们建议将洗脱液保存在-20℃。

操作步骤：粪便中分离 DNA 用于病原体检测

此操作步骤中的裂解条件已经优化用于增加非人类/人类 DNA 的比例。此操作步骤中的人类 DNA 不能被去除。

注意事项：

如果检测难裂解的细胞，如 G+细菌，第 3 步的裂解温度可以增加至 95℃

所有的离心步骤都应在室温(15–25℃)下，20,000 x g (约 14,000 rpm)下进行。如果离心机不能达到这个转速，可以适当延长离心时间。例如：20,000 x g 离心 5min 可以用 10,000 x g 离心 10min 代替。

实验前准备：

- 用于第 3 步和第 8 步的可以插入 2ml 离心管的热混合器或者可以孵育 70℃ 的水浴锅。

- 37–70°C 孵育溶解 Buffer AL 和 InhibitEX Buffer 中的沉淀。
- 将无水乙醇加入到 Buffer AW1 和 Buffer AW2 浓缩液中。
- 使用之前将所有的 Buffer 混匀。

操作步骤：

1、2 ml 离心管（自备）中称量 180–220 mg 粪便，置于冰上。

此操作步骤是用于 180–220 mg 粪便进行优化的，但同样适用于更少量的样品。

如果样品量不足 180–220 mg，无需减少 Buffer 的用量。

如果样品量>220 mg，请参考第 26 页的“Protocol: Isolation of DNA from Larger Volumes of Stool”（英文标准）。

如果是液体样品，离心管中加入 200 µl 样品，吸取黏液样品时，可以适当减短枪头以便于操作。

如果是冷冻样品，可以用剪刀或者刮刀将样品刮入 2 ml 离心管，置于冰上。

注意：使用冷冻样品时，保持样品冷冻直至第二步加入 InhibitEX Buffer 裂解样本，否则样品中的 DNA 就会被降解。加入 InhibitEX Buffer 后，剩下所有的步骤都可以在室温 (15–25°C) 下操作了。

2、每一份粪便样品中加入 1 ml InhibitEX Buffer，持续涡旋混匀 1 min，或直至粪便样品完全均质化。

注意：样品彻底涡旋混匀非常重要，可以保证最后洗脱得到最大浓度的 DNA。

3、上清液 70°C 加热 5min，涡旋 15 s。

此加热步骤可以帮助裂解细菌和其他寄生微生物。如果细胞很难裂解（如 G+细菌），可以将加热温度提高至 95°C。

4、全速离心样品 1 min 沉淀粪便颗粒。

重点注意事项：不要转移任何固体物质。如果在上清中仍有可见颗粒，再次离心样品。

5、将 15 μ l proteinase K 加入到新的 2 ml 离心管(自备)中。

6、将 200 μ l 第 4 步得到的上清液加入到含有 proteinase K 的 2 ml 离心管中。

7、加入 200 μ l Buffer AL，涡旋 15 s。

注意：不要直接将 proteinase K 加入到 Buffer AL 中。样品和 Buffer AL 能彻底涡旋混匀形成均质液是非常必要的。

8、70°C 孵育 10 min.

短离心去除管壁和管盖上的液体（可选）。

9. 裂解液中加入 200 μ l 无水乙醇 (96–100%)，涡旋混匀。

短离心去除管壁和管盖上的液体（可选）。

10. 小心将 600 μ l 第 9 步得到的裂解液加入到 QIAamp spin column 上。

盖上管盖，全速离心 1 min。将 QIAamp spin column 置于一个新的 2 ml 收集管中，弃含有流出液的旧离心管。

离心过程中盖好所有柱子的盖子，避免气雾的形成。如果裂解液在离心后并未完全通过柱子，再次离心直至 QIAamp spin column 完全排空。

11、小心打开 QIAamp spin column，加入 500 μ l Buffer AW1.

盖上管盖，全速离心 1 min。将 QIAamp spin column 置于一个新的 2 ml 收集管中，弃含有流出液的旧离心管。

12. 小心打开 QIAamp spin column，加入 500 μ l Buffer AW2.

全速离心 3min。弃含有流出液的旧离心管。

注意：洗脱液中残留的 Buffer AW2 会在下游的应用中造成干扰。有些离心转子在减速过程中会振动，造成含有 Buffer AW2 的流出液接触到 QIAamp spin column。将 QIAamp spin column 和收集管从转子上取下来也可能会使流出液接触到 QIAamp spin column。

13、将 QIAamp spin column 置于一个新的 2 ml 收集管(自备)中，弃含有流出液的收集管。

全速离心 3min.

此步骤可以帮助去除可能残留的 Buffer AW2.

14、将 QIAamp spin column 置于一个新的标记过的 1.5 ml 离心管（自备）中，直接向 QIAamp 膜中加入 200 µl Buffer ATE。室温孵育 1 min，全速离心 1 min 洗脱 DNA。

如果通过 UV 吸光度值来对 DNA 进行定量，使用 Buffer ATE 调零避免错误结果。关于如何测定 DNA 产量、长度的更多信息，请参考第 33 页的附录。如果需要长期储存 DNA，我们建议将洗脱液保存在-20°C。