

D4015 Stool DNA Kit

粪便 DNA 提取 遇产量低或无法提取排查方法

1. 粪便 DNA 产量主要来源样品内微生物、食物残渣含量，冰冻贮存过程中 DNA 会发生不同程度的降解导致 DNA 含量降低或条带成较严重的涂抹状（即降解）。建议尽量使用新鲜样品或贮存时间较短样品进行 DNA 提取。
2. 如果粪便样品中的水分含量比较多，建议先将水分离心去除后再进行提取。
3. 实验前检查 DS Buffer 与 BL Buffer 是否有沉淀物析出，久置或低温都会让 DS Buffer 与 BL Buffer 析出沉淀，如有沉淀析出，需按照说明书提示：在 65°C 水浴至沉淀完全溶解；
4. 实验前，VHB Buffer 必须按照说明书加入【无水乙醇】稀释备用。请开盖闻气味确认是否已加入乙醇稀释。稀释错误或未稀释会导致 DNA 无法挂柱结合，致提取失败。
5. 实验前，DNA Wash Buffer 必须按照说明书加入【无水乙醇】稀释备用。请开盖闻气味确认是否已加入乙醇稀释。稀释错误或未稀释会导致 DNA 无法挂柱结合，致提取失败；
6. 粪便样品主要是加入玻璃珠后进行涡旋裂解，涡旋后应是个均匀的状态，如果涡旋后明显是不均匀的或有成块的情况，可适当延长涡旋时间至其完全混匀。对于较大或较硬的样品，可在加入玻璃珠之前先将其碾压细碎。
7. 将混合液转移到 HiBind DNA Mini Column 前，必须加入与转移出的上清等体积的无水乙醇涡旋混匀，正确调节 DNA 与柱子的结合条件。如没有加入或加入比例错误的无水乙醇，DNA 可能被全部冲掉，致提取失败；
8. 注意不要省略空柱子离心步骤，该步骤能除去柱子中残留的乙醇，否则可能会影响下游实验；
9. 如产物浓度偏低：
 - (1) 建议将加入 DS Buffer 涡旋后的 70°C 孵育 10min 时间延长；
 - (2) 建议减少最后一步加入 Elution Buffer 的体积至 80-100 μ l；将 Elution Buffer 预热至 65°C 对提高产量有帮助；另外，在 DNA 提取时，【务必】进行二次洗脱，方可确保绝大部分 DNA 被完全洗脱。洗脱方法：将第一次洗脱的 Elution Buffer 重新吸回 HiBind DNA Mini Column，室温等待 2-3min，再次离心。
10. 如产物表现为电泳无条带或条带暗淡，通常可通过增加电泳上样量来解决；
11. 如产物表现为 PCR 无结果，建议梯度稀释模板 2/5/10/50 倍再次进行 PCR，通常放大稀释倍数可以帮助 PCR 成功扩增；
12. 粪便属于复杂样本，提取的 DNA 条带通常会出现不同程度的涂抹拖带，属正常现象

象。若电泳条带涂抹拖带比较严重：

(1) 在产物中加入 RNase 至终浓度 $< 20\text{ng}/\mu\text{l}$ 再跑电泳看看，如有改善，建议下次提取过程中按照说明书，增加 RNase 处理的步骤；

(2) 如加入 RNase 处理后仍得不到改善，建议将加入玻璃珠和 $540\mu\text{l}$ SLX-Mlus Buffer 的涡旋时间缩短至 2-3min。

13. 若电泳条带呈现弥散，建议将加入 DS Buffer 涡旋后的孵育条件： 70°C 孵育 10min 改为 60°C 孵育 10min 或 70°C 孵育 5min；

如按照上述步骤仍无法排查问题，请提供单位名称及试剂盒条形码（即盒外标签 Lot 开头数字字母组合）核验正品货源，添加技术支持 QQ: 800848200 获取更多信息。