

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:从固体深加工食品中提取总 DNA-----	5
方案 2:从半固体深加工食品中提取总 DNA-----	7
常见问题回答-----	8

版本: 2013-06

简介

HiPure Food DNA Kit 为深加工食品 DNA 抽提提供一种安全快速的方法。本试剂盒基于硅胶柱纯化技术，提取过程中无需使用有毒的酚氯仿抽提，也无需进行耗时的醇类沉淀，整个提取过程只需 30 分钟(除消化时间外)。适合于从小于食品样品提取高纯度的微生物总 DNA。该方法得到的 DNA 可直接用于 PCR, SSR, AFLP, RAPD, 以及 Southern blot 等实验。

原理

Magen 硅胶柱是采用高结合力的玻璃纤维滤膜为基质。滤膜在高浓度离子化剂(如盐酸胍或异硫氰酸胍)条件下，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。吸附了核酸的滤膜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，洗脱出滤膜上吸附的核酸。得到的核酸纯度高，可直接用于各种下游实验。

HiPure Food DNA Kit 基于硅胶柱纯化方式。食品样品经匀浆在含 SDS 裂解液中裂解，DNA 释放到裂解液中。经高盐溶液沉淀去除多糖等杂质后，加入乙醇，转移至柱子中过滤，DNA 被吸附到柱子的膜上，而蛋白质则不被吸附而去除。柱子经 Buffer GW2 洗涤去除盐分，最后 DNA 经 Buffer AE 洗脱。得到的 DNA 可直接用于 PCR, SSR, AFLP, RAPD, 以及 Southern blot 等实验。

组 成

HiPure Food DNA Kit

产品编号	D3169-01	D3169-02	D3169-03
纯化次数	10 次	50 次	250 次
HiPure DNA Mini Columns I	10	50	250
2ml Collection Tubes	10	50	250
Proteinase K	6 mg	24 mg	110 mg
Protease Dissolve Buffer	1.8 ml	1.8 ml	10 ml
Buffer MTL	10 ml	50 ml	250 ml
Buffer PS	3 ml	20 ml	80 ml
Buffer GXP	10 ml	60 ml	200 ml
Buffer GW2*	6 ml	20 ml	2 x 50 ml
Buffer AE	3 ml	20 ml	60 ml
说明书	1	1	1

保 质 期

HiPure Food DNA Kits 除 Proteinase K 外，可在室温下(15-25℃)干燥保存 18 个月。Proteinase K 干粉室温运输，收到产品保存于 2-8℃。Buffer MTL 和 Buffer GXP 在低温贮藏中可能会有沉淀析出，60℃水浴 30 分钟使之溶解。

需要准备材料和工具

- 无水乙醇(96-100%)
- 小型离心管(<12,000 x g)
- 65℃的水浴锅
- (可选) Buffer TE
- 溶解 Proteinase K (20mg/ml): 加入 Protease Dissolve Buffer 溶解 Proteinase K 至终浓度为 20mg/ml。Proteinase K 干粉在 2-8℃ 保存一年, 但溶解的 Proteinase K 须分装保存于-20℃。
- 用无水乙醇稀释 Buffer GW2, 并于室温保存。

D3169-01	加入 24ml 无水乙醇
D3169-02	加入 80ml 无水乙醇
D3169-03	每瓶中加入 200ml 无水乙醇

方案 1. 从深加工固体食品样品提取 DNA

该方案适合于从小于 100-200mg 的固体食品样品中提取总 DNA。

1. 用研钵将食品样品研磨成粉末。**转移 100-200mg 食品样品至 2ml 离心管中。**
由于淀粉有很强的吸水性,对于富含淀粉类的深加工食品样品,样品用量最好不要超过 100mg 或按比例加大 Buffer MTL 和 Buffer IPS 的用量,以确保足够的上清液。
2. 加入 **900ul Buffer MTL 和 20μl Proteinase K(20mg/ml)**至样品中。
涡旋 30-60 秒重悬样品。65°C 水浴 1~3 小时,其中颠倒混匀几次。
3. 加入 **300ul Buffer PS 至裂解液中**,剧烈涡旋混匀 30 秒。
4. 冰上放置 5 分钟。13,000 x g 离心 5 分钟。
5. 小心转移 200~600μl 上清液至新的离心管中。加入 **600μl Buffer GXP 至上清液中**,涡旋混匀 30 秒。
上清液的体积取决于样品类型和样品用量。若上清液体积小于 200μl,请酌情减少样品用量或加大 Buffer MTL 和 Buffer PS 的用量。
6. 把 HiPure DNA Mini Column I 装在 2ml 收集管中。**转移一半混合液至柱子中**。8,000 x g 离心 30~60 秒。
7. 倒弃滤液把柱子装回收集管。转移剩余的混合液至柱子。8,000 x g 离心 30~60 秒。
8. 倒弃滤液把柱子装回收集管。**加入 600μl Buffer GW2(已用无水乙醇稀释)**, 8,000 x g 离心 30~60 秒。
Buffer GW2 在使用之前,必须用无水乙醇进行稀释。按瓶子标签进行稀释。
9. 倒弃滤液把柱子装回收集管。**加入 600μl Buffer GW2(已用无水乙醇稀释)**, 8,000 x g 离心 30~60 秒。
10. 倒弃滤液把柱子装回收集管。13,000 x g 离心 3 分钟去除柱子中残留的乙醇。
11. 将柱子转移至新的 1.5ml 离心管中。加入 **15~30μl 预热到 65°C Buffer AE 或 Buffer TE 至柱子的膜中央**。室温静置 2 分钟。13,000 x g 离心 1 分钟。

12. (可选)再加入 **15~30 μ l** 预热到 **65 $^{\circ}$ C** **Buffer AE** 或 **Buffer TE** 至柱子的膜中央。室温静置 2 分钟。13,000 \times g 离心 1 分钟。
13. 丢弃 DNA 结合柱，把 DNA 保存于-20 $^{\circ}$ C或-80 $^{\circ}$ C。

方案 2. 从深加工半固体食品样品提取 DNA

该方案适合于从深加工半固体食品样品中提取总 DNA。

1. 转移适量的半固体食品样品至 2ml 离心管中。13,000 x g 离心 5 分钟收集沉淀物，吸弃上清液。(可选，若样品含有许多杂质，用 PBS Buffer 或生理盐水洗涤沉淀数次。)

样品的体积取决于样品中固体物质含量，离心后沉淀体积不能超过 0.3ml。对于离心后无沉淀食品样品，可加入 0.7 倍异丙醇和 0.1 倍 3M NaAc 至样品中，混匀后收集沉淀再继续操作。对于油类样品，可用灭菌水抽提油脂中 DNA，然后按 0.9ml 抽提液，再按方案 2 进行操作。对于富含焦糖类和杂质的食品，沉淀物最好用 Buffer PBS 或生理盐水洗涤次数以去除杂质。

2. 加入 **900ul Buffer MTL** 和 **20 μ l Proteinase K(20mg/ml)**至样品中。涡旋 30-60 秒重悬样品。65°C 水浴 1~3 小时，其中颠倒混匀几次。

3. 加入 **300ul Buffer PS** 至裂解液中，剧烈涡旋混匀 30 秒。

4. 冰上放置 5 分钟。13,000 x g 离心 5 分钟。

5. 小心转移 200~600 μ l 上清液至新的离心管中。加入 **600 μ l Buffer GXP** 至上清液，剧烈涡旋混匀 30 秒。

上清液的体积取决于样品类型和样品用量。若上清液体积小于 200 μ l，请酌情减少样品用量或加入 Buffer MTL 和 Buffer IPS 的用量。

6. 按方案 1 的第 6-13 步进行操作。

常见问题解答

该列表可能有利于解决提取过程所碰到的问题。Magen 技术人员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。我们将竭尽能力为您排忧解难。

现象	原因及解决方法
柱子堵塞	
转移上清液时带有太多沉淀	在下次提取过程中，转移上清液时不要吸到沉淀物。若吸到沉淀物，可把上清液再离心一次。
裂解液非常粘稠	某些植物样品中含有丰富的粘液和高分子多糖，会让裂解液变得非常粘稠。减少样品用量或加入 Buffer MTL 的用量。
离心速度太低	提高离心速度
加入 Buffer PS 后，混匀不够	在下次制备时，加入 Buffer PS 时要剧烈振荡混匀。
DNA 产量低	
样品发酵时间不充分	食品匀浆后，按标准流程延长孵育时间
样品裂解不充分	加入 Buffer MTL 后，没有让样品充分分散。而涡旋无法让样品充分分散，可用移液枪吸打几次。
洗脱效率不够	洗脱时 Buffer AE 预热至 65℃，并加到膜中央，室温放置 3 分钟。Buffer AE 的洗脱体积不够。
Buffer GW2 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。
柱子没有空甩	柱子必须空甩 2-3 分钟以去除膜上残留的乙醇。