

## 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: 2024-06

## 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 $\mu$ 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 **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，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 200μl，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
<b>柱子堵塞</b>	
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 <b>Buffer MTL</b> 的用量。
离心速度太低	提高离心速度
加入 <b>Buffer PS</b> 后，混匀不够	在下次制备时，加入 <b>Buffer PS</b> 时要剧烈振荡混匀。
<b>DNA 产量低</b>	
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 <b>Buffer MTL</b> 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 <b>Buffer AE</b> 预热至 65℃，并加到膜中央，室温放置 3 分钟。 <b>Buffer AE</b> 的洗脱体积不够。
<b>Buffer GW2</b> 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。