

目 录

简 介	2
原 理	2
试剂盒组成	3
保质期	3
方案 1:食品 DNA 常规抽提(2g)	4
方案 2:植物 DNA 小量抽提(200mg)	6
常见问题回答	8

版本: 2013-01

简介

HiPure Food DNA Kit 为深加工食品样品的 DNA 抽提提供一种快速可靠的方法。试剂盒采用硅胶柱纯化技术和经典的 CTAB/氯仿抽提技术，适合于从各种食品样品中快速提取高纯度的植物 DNA。得到的 DNA 可直接用于 PCR, SSR, AFLP, RAPD 以及 Southern Blot 等实验。HiPure Food DNA Kit 提供两个流程，请根据下游应用和样品特点选择合适的流程。

原理

HiPure 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，可通过氢键和静电等物理作用吸附核酸，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。样品在含 CTAB 裂解液中匀浆裂解，DNA 释放到裂解液中，用氯仿抽提去除多糖、蛋白质等杂质，得到上清液并加入结合液，转移至柱子中过滤，DNA 被吸附上柱子的膜上，而蛋白质等杂质则不被吸附而去除。柱子经 Buffer GW2 洗涤去除盐分，最后 DNA 被 Elution Buffer (10Mm Tris, pH8.5, 0.5Mm EDTA)洗脱。洗脱的 DNA 可直接用于 PCR、Southern blot、RAPD 等实验。

组 成

HiPure Food DNA Kit

产品编号	D3168-01	D3168-02	D3168-03
纯化次数	10 次	50 次	250 次
HiPure DNA Mini Column I	10	50	250
2ml Collection Tubes	10	50	250
Buffer PTL	120 ml	550 ml	6 x 550 ml
Buffer GXP	30 ml	60 ml	250 ml
Buffer GW2*	5 ml	20 ml	2 x 50 ml
Proteinase K	12 mg	50 mg	220 ml
Protease Dissolve Buffer	1 ml	5 ml	20 ml
Elution Buffer	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 PTL 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。

方案 1. 食品 DNA 提取(2g)

该方案适合于从 2g 食品样品中提取总 DNA。

准备材料和工具

- 无水乙醇(96-100%)
- 大型离心机(3,000 × g)
- 小型离心机(≤14,000 × g)
- 60℃水浴锅
- 氯仿
- 按瓶子标签所示，用无水乙醇稀释 Buffer GW2，并于室温保存。
- 按瓶子标签所示，加入适量的 Protease Dissolve Buffer 至 Proteinase K 干粉中至终浓度为 20mg/ml，颠倒混匀让蛋白酶 K 充分溶解，于-20℃保存。

操作流程

1. 用合适的方法匀浆食品样品，转移 2g 匀浆好的食品样品至 50ml 离心管中。
2. **加入 10ml Buffer PTL 和 40μl Proteinase K(20mg/ml)至样品中**，涡旋让样品充分混匀。65℃ 振荡消化 30~60 分钟。
若样品含有较多淀粉类物质，加倍 Buffer PTL 用量以确保样品完全被 Buffer PTL 浸泡。
3. 冰上放置 3~5 分钟。3,000~4,000 × g 离心 5 分钟。
4. 在 2ml 离心管中预先加入 0.8ml 氯仿。
5. **转移 0.75~0.8ml 上清液至装有氯仿的离心管中**。涡旋混匀 15 秒，14,000 × g 离心 15 分钟。
6. 小心转移 700μl 上清液至新的离心管中。**加入 700μl Buffer GXP 至上清液中**，涡旋混匀 15 秒。
7. (可选，若回收小于 100bp 的 DNA 片段)**加入 700μl 无水乙醇至混合液中**，涡旋混匀 15 秒。
若样品富含色素和多糖类物质，加入乙醇可能会引起色素/多糖的沉淀而影响核酸的纯度。

8. 把 HiPure DNA Mini Column I 柱装在 2ml 收集管中。**转移混合液(700 μ l)至柱子中。**8,000 \times g 离心 30~60 秒。
9. (若混合液超过 700 μ l) 倒弃滤液把柱子装回收集管。**把剩余混合液转移至柱子中。**8,000 \times g 离心 30~60 秒。
10. 倒弃滤液把柱子装回收集管。**加入 600 μ l Buffer GW2(已用无水乙醇稀释)至柱子中。**8,000 \times g 离心 30~60 秒。
Buffer GW2 在使用之前须用无水乙醇进行稀释。按瓶子标签指示进行稀释。
11. 倒弃滤液把柱子装回收集管。**加入 600 μ l Buffer GW2(已用无水乙醇稀释)至柱子中。**8,000 \times g 离心 30~60 秒。
12. 倒弃滤液把柱子装回收集管。13,000 \times g 离心 3 分钟去除柱子中残留的乙醇。
13. 将柱子转移至新的 1.5ml 离心管中。**加入 15~50 μ l Elution Buffer 至柱子的膜中央。**室温静置 3 分钟。13,000 \times g 离心 1 分钟。
14. 丢弃 DNA 结合柱，把 DNA 保存于-20 $^{\circ}$ C。

方案 2. 食品 DNA 小量提取(200mg)

该方案适合于从 200mg 食品样品中提取总 DNA。

准备材料和工具

- 无水乙醇(96-100%)
- 小型离心管($\leq 14,000 \times g$)
- 60°C 水浴锅
- 氯仿
- 按瓶子标签所示，用无水乙醇稀释 Buffer GW2，并于室温保存。
- 按瓶子标签所示，加入适量的 Protease Dissolve Buffer 至 Proteinase K 干粉中至终浓度为 20mg/ml，颠倒混匀让蛋白酶 K 充分溶解，于-20°C 保存。

操作流程

1. 用合适的方法匀浆食品样品，转移 200mg 匀浆好的样品至 2ml 离心管中。
2. **加入 1ml Buffer PTL 和 10 μ l Proteinase K(20mg/ml)至样品中**，涡旋让样品充分混匀。65°C 振荡消化 30~60 分钟。
若样品含有较多淀粉类物质，加倍 Buffer PTL 用量以确保样品完全被 Buffer PTL 浸泡。
3. 冰浴 3~5 分钟让样品恢复至室温，14,000 $\times g$ 离心 5 分钟。
4. 在 2ml 离心管中预先加入 0.6ml 氯仿。
5. **小心转移上清液 (0.6~0.7ml) 至装有氯仿的离心管中**。涡旋混匀 15 秒。
若上清液体积小于 500 μ l，可多处理几管样品，在这一步将上清液含并在一起，混匀后再转移 0.5~0.7ml 至氯仿中。
6. 14,000 $\times g$ 离心 10 分钟。
7. 小心转移 500 μ l 上清液至新的离心管中。**加入 500 μ l Buffer GXP 至上清液中**，涡旋混匀 15 秒。
8. (可选，若回收小于 100bp 的 DNA 片段)**加入 500 μ l 无水乙醇至混合液中**，涡旋混匀 15 秒。
若样品富含色素和多糖类物质，加入乙醇可能会引起色素/多糖的沉淀而影响核酸的纯度。

9. 把 HiPure DNA Mini Column I 柱装在 2ml 收集管中。**转移混合液(700 μ l)至柱子中。**8,000 \times g 离心 30~60 秒。
10. (若混合液超过 700 μ l) 倒弃滤液把柱子装回收集管。**把剩余混合液转移至柱子中。**8,000 \times g 离心 30~60 秒。
11. 倒弃滤液把柱子装回收集管。**加入 600 μ l Buffer GW2(已用无水乙醇稀释)至柱子中。**8,000 \times g 离心 30~60 秒。
Buffer GW2 在使用之前须用无水乙醇进行稀释。按瓶子标签指示进行稀释。
12. 倒弃滤液把柱子装回收集管。**加入 600 μ l Buffer GW2(已用无水乙醇稀释)至柱子中。**8,000 \times g 离心 30~60 秒。
13. 倒弃滤液把柱子装回收集管。13,000 \times g 离心 3 分钟去除柱子中残留的乙醇。
14. 将柱子转移至新的 1.5ml 离心管中。**加入 15~50 μ l Elution Buffer 至柱子的膜中央。**室温静置 3 分钟。13,000 \times g 离心 1 分钟。
15. 丢弃 DNA 结合柱，把 DNA 保存于-20 $^{\circ}$ C。

常见问题解答

该列表可能有利于解决您在提取过程中所碰到的问题。另外，Magen 技术人员也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。我们将竭尽全力为您排忧解难。

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	某些食品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 PTL 的用量。
离心速度太低	提高离心速度或延长离心时间
加入氯仿后，混匀不够	在下次制备时，加入氯仿时一定要剧烈振荡混匀。
DNA 产量低	
样品匀浆不充分	将样品研磨细小的粉末状，或延长珠磨仪的研磨时间和速度。
样品裂解不充分	加入 Buffer PTL 后，没有让样品充分分散。
加大蛋白酶 K 用量	对肉类原性的食品，加入蛋白酶用量以提高消化效果
不正确的结合条件	计算上清液的体积，加入正确的 Buffer GXP 和乙醇。
洗脱效率不够	洗脱时 Elution Buffer 预热至 65℃，并加到膜中央，室温放置 3 分钟。
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。