

M5 HiPer Food Genomic DNA Kit 食品基因组 DNA 提取试剂盒

使用说明书

Product	Unit	Cat.#
M5 HiPer Food Genomic DNA Kit 食品基因组 DNA 提取试剂盒	50T	MF1126-01

【适用范围】 适用于提取各种食品来源样品 DNA 等。

【试剂盒组成】：

试剂盒组成	保存	50 次
裂解液 FL	室温	250 ml × 2
Proteinase K	4°C	1.5 ml
结合液 PB	室温	42 ml 第一次使用前按瓶子标签说明加指定量异丙醇
漂洗液 WB	室温	13 ml 第一次使用前按瓶子标签说明加指定量乙醇
洗脱缓冲液 EB	室温	15 ml
吸附柱 AC	室温	50 个
收集管	室温	50 个

本试剂盒在室温储存 12 个月不影响使用效果。

储存事项:

- 裂解液 FL 低温时可能出现析出和沉淀，可以在 55°C 水浴几分钟帮助重新溶解，恢复澄清透明后轻轻混匀后即可使用。
- 避免试剂长时间暴露于空气中产生挥发、氧化、pH 值变化，各溶液使用后应及时盖紧盖子。

【产品介绍】

本制品采用改良 CTAB 法 DNA 抽提原理，结合离心柱可以从各种食品中高效提取 DNA，可以替换进口产品。

本手册包含 1 个标准片段和 1 个小片段方案，每种方案包括 2 种提取规模（根据样本量大规模 2 g，或小规模 200 mg）。小片段方案专为从高度加工食品中提取总 DNA 而设计。这些方案优化了柱纯化的结合条件，建议用于强加工食品，这些食品中的 DNA 经过大量热处理（如烹饪、巴氏杀菌等）、高压、辐照、pH 值变化或干燥，因此片段化程度高（低至 100-200 bp）。小片段方案为小 DNA 片段提供了更严格的柱结合条件，并已成功用于从面粉和玉米片等食品中提取 DNA。对于所有其他类型的食品和原材料，应使用标准方案。标准方案适用于从复杂的食品样品中提取总 DNA，这些样品的加工等级较低，因此 DNA 断裂程度更小（片段相对较大）。我们已经成功地从番茄酱和巧克力等食

物中提取了 DNA。然而，食品样品可能非常复杂，而且特定食品的加工等级并不总是很清楚。因此无法预测哪种方案最适合每种样品。可能需要根据具体样品决定提取方案和规模。

【注意事项】 需要自备氯仿、无水乙醇、异丙醇。

【提取前准备工作】

- ⇒ 使用前请先在漂洗液 WB 瓶中加入无水乙醇，和结合液 PB 瓶中加入异丙醇，加入体积请参照瓶上的标签!
- ⇒ 裂解液 FL 低温时可能出现析出和沉淀，可以在 60° C 水浴几分钟帮助重新溶解，恢复澄清透明后轻轻混匀后即可使用。

均质化（匀浆化）

在实验过程中，适当地破碎样本材料不仅对促进食品裂解和 DNA 的释放非常重要，而且对保证起始材料的均一性、代表整个食品也至关重要。在这种情况下，必须考虑预期的灵敏度和样品量。灵敏度要求越高（检测痕量食品 DNA，如过敏原或转基因生物 [GMOs]），或食品的异质性越强（如香肠中切碎的肉类），均质所需的样品量就越大，这样才能将具有代表性的整体样品转移到程序中。除了样品大小，样品类型也是均质程序的决定因素。这两个方面决定了最适合高效破坏的均质装置。为了选择最佳均质装置，应确定食物是软质、硬质还是极硬质。每种类型的食物都有几种选择（见下文）。

Soft samples (e.g., whole fruits in fruit jams or vegetables)

▲ Small amount of starting sample: Small knife mill, QIAGEN TissueRuptor
®, hand blender

▲ Large amount of starting sample: Large knife mill

Solid/hard samples (e.g., salami or frozen foods)

▲ Small amount of starting sample: Small knife mill, QIAGEN TissueLyser LT, QIAGEN TissueLyser II, mortar and pestle

▲ Large amount of starting sample: Large knife mill

Extremely solid/hard samples (e.g., roots or seeds)

▲ Small amount of starting sample: Small impact mill, QIAGEN TissueLyser LT, QIAGEN TissueLyser II

▲ large amount of starting sample: Large impact mill

【标准片段方案（2 g 规模）操作步骤】

1. 将 2 g 均质食品样品放入 50 ml 离心管中，加入 10 ml 食品裂解缓冲液和 25 μ l 蛋白酶 K 溶液。短暂涡旋以确保样本材料完全分散和润湿。
 - ▲ 对于膨胀较大的样品（如淀粉），应加倍食物裂解缓冲液的用量（20 ml），以确保有足够的缓冲液覆盖样品材料。
2. 在 60°C 下持续摇晃振荡孵育 30 分钟。为了促进抑制物的析出，孵育后将样品在冰上冷却至室温（15–25°C）。
3. 2,500 \times g 离心 5 min。
 - ▲ 上清液的体积在很大程度上取决于所用起始材料的性质和沉淀的 CTAB-抑制物复合物的量。离心后，预计上清液的量为 2 ml（膨胀食品，如均质玉米片）至 7 ml（非膨胀均质食品，如番茄酱）。不要将试管底部的任何沉淀物带入后续步骤。
4. 将 500 μ l 氯仿移入 2 ml 离心管中备用。注意：氯仿是一种危险物质。务必在通风橱中移取氯仿。
5. 小心地将步骤 3 中的 700 μ l 上清液转移到装有氯仿的离心管中。确保不要带入底相的物质，因为底相含有沉淀的食物残渣。
 - ▲ 上清液可能会有很深的颜色。某些食物在离心后也可能形成三相。如果出现这种情况，用移液管穿过上相，只转移 700 μ l 的透明中间相。如果上相形成了半固态膜（例如巧克力），用移液器吸头穿透薄膜，只转移 700 μ l 的透明中间相。

6. 剧烈涡旋震荡 15 sec 后, 14,000 ×g 离心 15 min。
 - ▲ 如果上清液不清澈, 可再次离心 5 min。
7. 将 350 μl 结合液 PB (请先检查是否已加入异丙醇!) 移入一个新的 2 ml 离心管中, 加入 350 μl 步骤 6 中的上层水相, 涡旋充分混合。
8. 将混匀的液体转入吸附柱 AC 中, 17,900 ×g 离心 1 min, 弃掉废液。
9. 加入 600 μl 漂洗液 WB (请先检查是否已加入无水乙醇!), 17,900 ×g 离心 30 sec, 弃掉废液。
10. 重复一遍操作步骤 9。
11. 将吸附柱 AC 放回空收集管中, 17,900 ×g 离心 2 min。尽量除去漂洗液, 以免漂洗液中残留乙醇抑制下游反应。
12. 取出吸附柱 AC, 放入一个干净的离心管中, 在吸附膜的中间部位加 50-100 μl 洗脱缓冲液 EB, 室温放置 3 min, 17,900 ×g 离心 1 min。将得到的溶液重新加入离心吸附柱中, 室温放置 2 分钟, 17,900 ×g 离心 1 min。
 - ▲ 洗脱体积越大, 洗脱效率越高, 如果需要 DNA 浓度较高, 可以适当减少洗脱体积, 但是需注意体积过小降低洗脱效率, 减少 DNA 产量 (最小不应少于 30 μl)。
 - ▲ 如追求最高产量, 洗脱缓冲液事先在 80-100°C 水浴中预热后再加可以提高产量。

【标准片段方案 (200 mg 规模) 操作步骤】

1. 将 200 mg 克均质食品样品放入 2 ml 离心管中 (至少准备 3-4 管), 每管加入 1 ml 食品裂解缓冲液和 2.5 μl 蛋白酶 K 溶液。短暂涡旋以确保样本材料完全分散和润湿。
 - ▲ 为确保 DNA 产率与使用标准片段方案 (2 g 规模) 获得的产率相似, 一定要准备足够的裂解管 (至少 3-4 个裂解管), 这样几个裂解管的上清可以合并使用, 确保合并后体积超过 700 μl。
 - ▲ 对于膨胀较大的样品 (如淀粉), 应加倍食物裂解缓冲液的用量 (2 ml), 以确保有足够的缓冲液覆盖样品材料。
2. 在 60°C 下持续摇晃振荡 (1000 rpm) 孵育 30 分钟。为了促进抑制物的析出, 孵育后将样品在冰上冷却至室温 (15-25°C)。
3. 14,000 ×g 离心 5 min。
 - ▲ 上清液的体积在很大程度上取决于所用起始材料的性质和沉淀的 CTAB-抑制物复合物的量。离心后, 预计上清液的量为 200 μl (膨胀食品, 如均质玉米片) 至 700 μl (非膨胀均质食品, 如番茄酱)。不要将试管底部的任何沉淀物带入后续步骤。
4. 将 500 μl 氯仿移入 2 ml 离心管中备用。注意: 氯仿是一种危险物质。务必在通风橱中移取氯仿。
5. 小心地从步骤 3 中的每个裂解管中吸取最大体积的透明上清液转移到一个合适体积大小的新离心管, 不要扰动管底沉淀。合并上清, 并吹打混匀。
6. 取 700 μl 合并后上清液转移到装有氯仿的离心管中。
 - ▲ 上清液可能会有很深的颜色。某些食物在离心后也可能形成三相。如果出现这种情况, 用移液管穿过上相, 只转移 700 μl 的透明中间相。如果上相形成了半固态膜 (例如巧克力), 用移液器吸头穿透薄膜, 只转移 700 μl 的透明中间相。
7. 剧烈涡旋震荡 15 sec 后, 14,000 ×g 离心 15 min。
 - ▲ 如果上清液不清澈, 可再次离心 5 min。
8. 将 350 μl 结合液 PB (请先检查是否已加入异丙醇!) 移入一个新的 2 ml 离心管中, 加入 350 μl 步骤 6 中的上层水相, 涡旋充分混合。
9. 将混匀的液体转入吸附柱 AC 中, 17,900 ×g 离心 1 min, 弃掉废液。
10. 加入 600 μl 漂洗液 WB (请先检查是否已加入无水乙醇!), 17,900 ×g 离心 30 sec, 弃掉废液。
11. 重复一遍操作步骤 10。

12. 将吸附柱 AC 放回空收集管中，17,900 ×g 离心 2 min。尽量除去漂洗液，以免漂洗液中残留乙醇抑制下游反应。
13. 取出吸附柱 AC，放入一个干净的离心管中，在吸附膜的中间部位加 50–100 μl 洗脱缓冲液 EB，室温放置 3 min，17,900 ×g 离心 1 min。将得到的溶液重新加入离心吸附柱中，室温放置 2 分钟，17,900 ×g 离心 1 min。
 - ▲ 洗脱体积越大，洗脱效率越高，如果需要 DNA 浓度较高，可以适当减少洗脱体积，但是需注意体积过小降低洗脱效率，减少 DNA 产量（最小不应少于 30 μl）。
 - ▲ 如追求最高产量，洗脱缓冲液事先在 80–100°C 水浴中预热后再加可以提高产量。

【小片段方案（2 g 规模）操作步骤】

本方案专为从大量（2 g 规模）生鲜或加工食品样本中提取总 DNA 而设计。它优化了离心柱结合条件，以最大限度地回收短 DNA 片段。建议用于强加工食品，这些食品中的 DNA 经过了大量热处理（如烹饪、巴氏杀菌等）、高压、辐照、pH 值变化或干燥，因此片段化程度高（低至 100–200 bp）。

1. 将 2 g 均质食品样品放入 50 ml 离心管中，加入 10 ml 食品裂解缓冲液和 25 μl 蛋白酶 K 溶液。短暂涡旋以确保样本材料完全分散和润湿。
 - ▲ 对于膨胀较大的样品（如淀粉），应加倍食物裂解缓冲液的用量（20 ml），以确保有足够的缓冲液覆盖样品材料。
2. 在 60°C 下持续摇晃振荡孵育 30 分钟。为了促进抑制物的析出，孵育后将样品在冰上冷却至室温（15–25°C）。
3. 2,500 ×g 离心 5 min。
 - ▲ 上清液的体积在很大程度上取决于所用起始材料的性质和沉淀的 CTAB-抑制物复合物的量。离心后，预计上清液的量为 2 ml（膨胀食品，如均质玉米片）至 7 ml（非膨胀均质食品，如番茄酱）。不要将试管底部的任何沉淀物带入后续步骤。
4. 将 500 μl 氯仿移入 2 ml 离心管中备用。注意：氯仿是一种危险物质。务必在通风橱中移取氯仿。
5. 小心地将步骤 3 中的 700 μl 上清液转移到装有氯仿的离心管中。确保不要带入底相的物质，因为底相含有沉淀的食物残渣。
 - ▲ 上清液可能会有很深的颜色。某些食物在离心后也可能形成三相。如果出现这种情况，用移液管穿过上相，只转移 700 μl 的透明中间相。如果上相形成了半固态膜（例如巧克力），用移液器吸头穿透薄膜，只转移 700 μl 的透明中间相。
6. 剧烈涡旋震荡 15 sec 后，14,000 ×g 离心 15 min。
 - ▲ 如果上清液不清澈，可再次离心 5 min。
7. 将 1 ml 结合液 PB（请先检查是否已加入异丙醇！）移入一个新的 2 ml 离心管中，加入 250 μl 步骤 6 中的上层水相，涡旋充分混合。
8. 将混匀的液体 700 μl 转入吸附柱 AC 中，17,900 ×g 离心 1 min，弃掉废液。将吸附柱放回收集管，继续将剩余的混合物转入吸附柱，17,900 ×g 离心 1 min，弃掉废液。
9. 加入 600 μl 漂洗液 WB（请先检查是否已加入无水乙醇！），17,900 ×g 离心 30 sec，弃掉废液。
10. 重复一遍操作步骤 9。
11. 将吸附柱 AC 放回空收集管中，17,900 ×g 离心 2 min。尽量除去漂洗液，以免漂洗液中残留乙醇抑制下游反应。
12. 取出吸附柱 AC，放入一个干净的离心管中，在吸附膜的中间部位加 50–100 μl 洗脱缓冲液 EB，室温放置 3 min，17,900 ×g 离心 1 min。将得到的溶液重新加入离心吸附柱中，室温放置 2 分钟，17,900 ×g 离心 1 min。
 - ▲ 洗脱体积越大，洗脱效率越高，如果需要 DNA 浓度较高，可以适当减少洗脱体积，但是需注意体积过小降低洗脱效率，减少 DNA 产量（最小不应少于 30 μl）。
 - ▲ 如追求最高产量，洗脱缓冲液事先在 80–100°C 水浴中预热后再加可以提高产量。

【小片段方案（200 mg 规模）操作步骤】

本方案专为从小量（200 mg 规模）生鲜或加工食品样本中提取总 DNA 而设计。它优化了离心柱结合条件，以最大限度地回收短 DNA 片段。建议用于强加工食品，这些食品中的 DNA 经过了大量热处理（如烹饪、巴氏杀菌等）、高压、辐照、pH 值变化或干燥，因此片段化程度高（低至 100-200 bp）。

1. 将 200 mg 克均质食品样品放入 2 ml 离心管中（至少准备 3-4 管），每管加入 1 ml 食品裂解缓冲液和 2.5 μ l 蛋白酶 K 溶液。短暂涡旋以确保样本材料完全分散和润湿。
 - ▲ 为确保 DNA 产率与使用标准片段方案（2 g 规模）获得的产率相似，一定要准备足够的裂解管（至少 3-4 个裂解管），这样几个裂解管的上清可以合并使用，确保合并后体积超过 700 μ l。
 - ▲ 对于膨胀较大的样品（如淀粉），应加倍食物裂解缓冲液的用量（2 ml），以确保有足够的缓冲液覆盖样品材料。
2. 在 60°C 下持续摇晃振荡（1000 rpm）孵育 30 分钟。为了促进抑制物的析出，孵育后将样品在冰上冷却至室温（15-25°C）。
3. 14,000 \times g 离心 5 min。
 - ▲ 上清液的体积在很大程度上取决于所用起始材料的性质和沉淀的 CTAB-抑制物复合物的量。离心后，预计上清液的量为 200 μ l（膨胀食品，如均质玉米片）至 700 μ l（非膨胀均质食品，如番茄酱）。不要将试管底部的任何沉淀物带入后续步骤。
4. 将 500 μ l 氯仿移入 2 ml 离心管中备用。注意：氯仿是一种危险物质。务必在通风橱中移取氯仿。
5. 小心地从步骤 3 中的每个裂解管中吸取最大体积的透明上清液转移到一个合适体积大小的新离心管，不要扰动管底沉淀。合并上清，并吹打混匀。
6. 取 700 μ l 合并后上清液转移到装有氯仿的离心管中。
 - ▲ 上清液可能会有很深的颜色。某些食物在离心后也可能形成三相。如果出现这种情况，用移液管穿过上相，只转移 700 μ l 的透明中间相。如果上相形成了半固态膜（例如巧克力），用移液器吸头穿透薄膜，只转移 700 μ l 的透明中间相。
7. 剧烈涡旋震荡 15 sec 后，14,000 \times g 离心 15 min。
 - ▲ 如果上清液不清澈，可再次离心 5 min。
8. 将 1 ml 结合液 PB（请先检查是否已加入异丙醇!）移入一个新的 2 ml 离心管中，加入 250 μ l 步骤 6 中的上层水相，涡旋充分混合。
9. 将混匀的液体转入吸附柱 AC 中，17,900 \times g 离心 1 min，弃掉废液。
10. 加入 600 μ l 漂洗液 WB（请先检查是否已加入无水乙醇!），17,900 \times g 离心 30 sec，弃掉废液。
11. 重复一遍操作步骤 10。
12. 将吸附柱 AC 放回空收集管中，17,900 \times g 离心 2 min。尽量除去漂洗液，以免漂洗液中残留乙醇抑制下游反应。
13. 取出吸附柱 AC，放入一个干净的离心管中，在吸附膜的中间部位加 50-100 μ l 洗脱缓冲液 EB，室温放置 3 min，17,900 \times g 离心 1 min。将得到的溶液重新加入离心吸附柱中，室温放置 2 分钟，17,900 \times g 离心 1 min。
 - ▲ 洗脱体积越大，洗脱效率越高，如果需要 DNA 浓度较高，可以适当减少洗脱体积，但是需注意体积小降低洗脱效率，减少 DNA 产量（最小不应少于 30 μ l）。
 - ▲ 如追求最高产量，洗脱缓冲液事先在 80-100°C 水浴中预热后再加可以提高产量。