

GF-1 食物 DNA 提取试剂盒说明书

版本 3.1

产品简介:

GF-1 食物DNA提取试剂盒能从 100mg来自于植物、动物或混杂来源的未加工或已加工的食物中快速、有效提取基因组DNA。本试剂盒采用一个经特殊处理的玻璃纤维滤膜固定到柱子中，在高盐下有效地结合DNA。试剂盒应用核酸纯化柱技术，使用最佳缓冲液，以确保只有DNA被分离，在随后的洗涤步骤中除去蛋白质和其他杂质、添加剂、防腐剂。高纯度的基因组DNA在水或低盐缓冲液中被洗脱，用于许多常规的分子生物学实验，如PCR，酶切。此试剂盒适用于转基因试验，并已经过各种样本的试验，如大豆、玉米、加工食品（大豆粉、豆浆、酱油、腊肠、肉类、谷物类、可可粉）。

试剂盒组成成份

| | 5 次 | 25 次 | 100 次 | 200 次 |
|--|--------|--------------|--------------|--------------|
| 产品目录号 | 样品 | CN/GF-FE-025 | CN/GF-FE-100 | CN/GF-FE-200 |
| 组份 | | | | |
| GF-1 亲和柱(GF-1 columns) | 5 | 25 | 100 | 200 |
| 收集管 (Collection tubes) | 5 | 25 | 100 | 200 |
| 缓冲液 FL Food Lysis Buffer (Buffer FL) | 5ml | 25ml | 90ml | 2 x 90ml |
| DNA 结合缓冲液 (缓冲液 FB) Food DNA Binding Buffer (Buffer FB) | 4ml | 20ml | 80ml | 2 x 80ml |
| 洗涤液 1 (浓缩液) * WashBuffer1(concentrate)* | 1.5ml | 7ml | 30ml | 2 x 30ml |
| 洗涤液 2 (浓缩液) * WashBuffer2(concentrate)* | 2.4ml | 9ml | 34ml | 2 x 34ml |
| 洗脱液 (Elution Buffer) | 1.5ml | 2 x 2ml | 20ml | 40ml |
| 蛋白酶 K* (Proteinase K*) | 0.11ml | 0.55ml | 2 x 1.05ml | 4 x 1.05ml |
| 使用说明 (Handbook) | 1 | 1 | 1 | 1 |

注意：标*的请参照配制方案以及其储存条件和稳定性。

GF-1 食物 DNA 提取试剂盒有 25 次、100 次、200 次包装。本试剂盒仅供研究使用。

自备材料

无水乙醇 (>95%)

RNA 酶 A (无 DNA 酶) (20mg/ml)

配制方案

贴有洗涤液 1 和洗涤液 2 标签的浓缩液，在使用前需用无水乙醇 (>95%) 稀释。

样品 (5 次)

在洗涤液 1 中加入 1.5ml 无水乙醇。

在洗涤液 2 中加入 5.6ml 无水乙醇。

CN/GF-FE-025 (25 次)

在洗涤液 1 中加入 7ml 无水乙醇。

在洗涤液 2 中加入 21ml 无水乙醇。

CN/GF-FE-100 (100 次)

在洗涤液 1 中加入 30ml 无水乙醇。

在洗涤液 2 中加入 80ml 无水乙醇。

CN/GF-FE-100 (200 次)

在洗涤液 1 中加入 30ml 无水乙醇。使用完后再以同样的方法稀释第二瓶洗涤液 1。

在洗涤液 2 中加入 80ml 无水乙醇。使用完后再以同样的方法稀释第二瓶洗涤液 2。

洗涤液使用后拧紧瓶盖，室温保存。

储存及稳定性

- 所有溶液 20 °C-30 °C 保存。

- 蛋白酶K -20 °C 保存。

- 试剂盒各组份自生产之日起可稳定保存12个月。缓冲液 FB 在室温过低时易出现结晶，使用前请置于 55 °C-65 °C 环境中至晶体完全溶解。

化学危害

缓冲液 FB 和洗涤液 1 含有胍盐，当接触皮肤或吞服时可能造成危害。使用时一定要戴上手套并做好安全防护措施。不能将含有漂白剂或任何形式的酸性溶液加入到含有胍盐的提取废料中进行消毒。清洁沾染试剂的物品，不需要用漂白剂和酸性溶液清洗，只需浸泡在洗涤剂和水即可除去胍盐。

操作步骤

提示

- 所有操作均在室温下进行，除非另有说明。

- 洗涤液 1 和洗涤液 2 的浓缩液在使用前务必用无水乙醇稀释，请参照配制方案。

- 如果缓冲液 FB 出现沉淀或结晶，请置于 55 °C-65 °C 环境中至晶体完全溶解。

- 预先设定 65 °C 水浴锅。

- 65 °C 预热洗脱液。

1、样品制备和细胞裂解

a. 固体样本

用一般均质器或用研钵和研棒在液氮中将样本磨成细粉。

注：均质样本能更有效裂解。均质化方法的使用取决于样本的类型。针对某些样本，如大豆粉和可可粉，无需采用均质化，但样本一定得完全的悬浮于溶液里已达到有效裂解。

将 100-200mg 磨碎的样本放入一干净的微量离心管，加入 700 μl 缓冲液 FL 和 20 μl 蛋白酶 K，漩涡振荡充分混匀，获得一份均匀溶液。65 °C 温育 30 分钟，在温育过程中偶尔搅拌确保样本完全裂解。

注：使用 100mg 吸湿性样本，如面粉、干性植物等，可能要增加缓冲液 FL 的体积直到样本成半流体状态。

b. 液体样本

取样本 400 μl 到一干净的微量离心管，加入 300 μl 缓冲液 FL 和 20 μl 蛋白酶 K，漩涡振荡，充分混匀，获得一份均匀溶液。65 °C 温育 30 分钟，在温育过程中偶尔搅拌确保样本完全裂解。

RNA 的去除 (可选)

如果要求 DNA 中无 RNA 存在，则加入 20 μl RNA 酶 A (无 DNA 酶，20mg/ml)，混匀并 37 °C 温育 10 分钟。

2、均质化

12,000 x g (12,500rpm) 离心 5 分钟，沉淀细胞碎片和污染物，转移上清 450 μl 至一干净的 2ml 微量离心管中，加入 1.5 倍体积的缓冲液FB (680 μl)，脉冲漩涡振荡充分混匀，直到获得一份均匀的溶液。65℃温育 10 分钟。

注：当转移上清时，避免接触沉淀物和溶液最上面层的污染物，如果上清少于 450 μl，按照比例调整缓冲液FB体积。

3、加入乙醇

加入 350μl 无水乙醇，立即脉冲漩涡振荡，充分混匀，获得一份均匀溶液。5,000 x g (8,000rpm) 离心 1 分钟。

注：立即混匀以防止因局部高浓度乙醇引起的任何不均匀核酸沉淀。

4、装载到亲和柱

将大约 650 μl 样品转移到一个带有干净收集管的亲和柱中，5000 x g (8,000 rpm) 离心 1 分钟，丢弃废液。

重复操作剩余样本。

5、柱子洗涤 1

在亲和柱中加入 500 μl 洗涤液 1，5,000 x g (8,000 rpm) 离心 1 分钟，丢弃废液。

注：使用前确保洗涤液 1 已用无水乙醇稀释（参照配制方案）。

6、柱子洗涤 2

在亲和柱中加入 500 μl 洗涤液 2，5,000 x g (8,000 rpm) 离心 1 分钟，丢弃废液。重复洗涤一次，以最大转速离心 3 分钟。

注：使用前确保洗涤液 2 已用无水乙醇稀释（参照配制方案）。

确保离心 3 分钟后能完全除去乙醇。

7、DNA 洗脱

将亲和柱放入一干净的微量离心管中，取 50-100 μl 预热洗脱液，TE 缓冲液或无菌水直接加入到柱子的膜中央，室温静置 2 分钟，5,000 x g (8,000 rpm) 离心 1 分钟，以洗脱 DNA。DNA 4℃ 或 -20℃ 保存。

注：确保洗脱液被直接加入到膜中央以完全洗脱 DNA。TE 缓冲液中的 EDTA 可能抑制后续的酶反应，但仍可洗脱 DNA。如果用水洗脱 DNA，PH7.0-8.5 时洗脱效果最好。当没有缓冲剂存在的情况下，DNA 可能降解，此时 DNA -20℃ 保存。

注：推荐用于 PCR 分析的扩增片段长度小于 300bp，因为加工食品中的 DNA 会有一定程度上降解。

故障排除

不按照给定的说明进行操作将会出现不符合标准的结果，将影响 DNA 的得率和质量，如果出现此类问题，请参照以下内容处理：

| 问题 | 可能的原因 | 建议 |
|---------|-----------|--|
| DNA 得率低 | 样品没有充分均质化 | 在液氮中将样品磨成细粉末。 |
| | 样品裂解不完全 | 使样本和缓冲液FL、蛋白酶K完全混匀。65℃温育时间可能需要延长至 2 小时。 |
| | | 减少样品体积。 如果使用高吸湿性样品，增加缓冲液FL的体积直到出现半流体状态。 |

| 问题 | 可能的原因 | 建议 |
|-----------------------------|--|---|
| DNA 得率低 | 未加入乙醇 | 使用新样本重新提取。 |
| | 蛋白酶K活性降低 | 确保蛋白酶 K-20℃ 保存。 |
| | 洗涤 1 和洗涤 2 使用顺序颠倒 | 确保洗涤液 1 在洗涤液 2 之前使用。 使用新样本重新提取。 |
| | 洗涤液 1 和洗涤液 2 配制错误 | 请参照“ 配制方案 ”。 使用新样本重新提取。 |
| | 加入洗脱液之前柱子未干 | 加入洗涤液 2 以后，确保柱子在最大速度下甩干 3 分钟。 |
| | 没有正确使用洗脱液 | 65℃-70℃ 预热洗脱液。 加入洗脱液后柱子室温静置 2 分钟。 确保所用洗脱液为低盐缓冲液或 pH 值 7.0-8.5 的水。 |
| 纯度低 (A _{260/280}) | 蛋白酶K活性降低 | 参照问题“DNA 得率低”。 |
| | 样品裂解不完全 | 参照问题“DNA 得率低”。 |
| | 未使用洗涤液 1 洗涤 | 加入洗涤液 2 之前确保已用洗涤液 1 洗涤。 |
| 洗脱的 DNA 在下游应用中性能差 | 洗脱下来的 DNA 含有残留乙醇 | 洗涤液 2 重复洗涤结束后，以最大转速离心柱子 3 分钟。 |
| | 洗脱下来的 DNA 含有少量抑制剂 | 确保使用洗涤液 1 和洗涤液 2 进行洗涤。 |
| | 用 TE 缓冲液洗脱 DNA，TE 缓冲液中的 EDTA 可能抑制后续酶反应 | 用洗脱液或 pH 为 7.0-8.5 的水洗脱 DNA。 |

上海凯斯泰尔生物科技有限公司

地址：上海市浦东新区康新公路 3377 号 2 号楼 604 室

电话：021-68060114

传真：021-68060114

邮箱：info@kestrel-china.com

网址：www.kestrel-china.com

Vivantis Technologies Sdn Bhd

1012 S.Coast Highway Suite 1,Oceanside CA 92054, USA.

Tel: +6 03 8025 1603

Fax: +6 03 8025 1637

Email: info@vivanttechnologies.com

international@vivanttechnologies.com

Web: www.vivanttechnologies.com