

foodproof®

StarPrep® Two 试剂盒

酵母菌与霉菌

产品说明

用于从酵母和霉菌中快速提取DNA并直接用于PCR的产品说明书

产品编号. KIT230177

foodproof[®]
StarPrep[®] Two 试剂盒
酵母菌与霉菌

试剂盒储存温度: 15 °C 至 25 °C
仅限体外使用

产品编号 KIT230177
42 mL

说明书版本:
修订版 A, 2023 年12月

目录

1. 概述	4
 1.1 基本信息	4
1.2 适用性	4
1.3 试剂盒内容	5
2. 操作说明	6
2.1 所需材料	6
2.2 注意事项与准备工作	8
2.3 工作流程	9
2.3.1 酵母菌与霉菌 - 定量分析	9
2.3.1.1 提取程序 A	11
2.3.1.2 提取程序 B	14
2.3.1.3 提取程序 C	17
2.3.1.4 提取程序 D	20
2.3.1.5 提取程序 E	23
2.3.2 酵母菌和霉菌 - 定性检测	27
2.3.2.1 提取程序 F	28
2.4 故障排除	31
2.5 支持	32
3. 补充信息	33
3.1 基本信息	33
3.2 参考编号	34
3.3 变更索引	34

1. 概述

foodproof® StarPrep® Two 试剂盒专为快速制备细菌、酵母及霉菌DNA而设计，可直接用于PCR反应。提取的DNA可直接应用于任何PCR操作。StarPrep Two 裂解缓冲液无需使用危险有机溶剂或离液剂。整个DNA制备过程可在单管内完成，最大限度减少操作步骤并降低危险物质接触风险。简化的操作流程显著节省时间。无需转移含DNA的提取物，最大限度降低交叉污染风险。

1.1 基本信息

反应数量

本试剂盒设计用于96次反应。

储存条件

储存于15至25°C环境中。

foodproof StarPrep Two试剂盒的组分在标签标注的有效期内均保证稳定。

1.2 适用性

裂解缓冲液适用于多种样本材料的制备，包括富集培养物和直接样本。样本体积因检测基质而异。对于高度浑浊的上清液或含抑制剂的样本，减少样本体积（例如 200 μL）可提高DNA提取效率。使用该裂解缓冲液获得的DNA质量适用于任何PCR应用。

1.3 试剂盒内容

foodproof StarPrep Two 试剂盒示意图, 包含所有组件。



试剂瓶中含42 mL裂解缓冲液和
磁力搅拌棒

2. 操作指南

本节提供从多种基质中进行无缝式DNA提取所需的所有相关信息。

2.1 所需材料

所需设备和试剂大多可从Hygiena®获取。更多信息请联系我们。

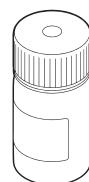


为确保方法的可靠性，强烈建议仅使用以下描述的材料。

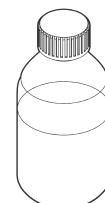
试剂

试剂 D

产品编号 KIT230001/02/03

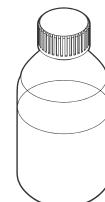


无菌柠檬酸钠 (三钠盐 2-羟基丙烷-1,2,3-三羧酸; CAS号:6132-04-3) 溶液, 2% (w/v)
非Hygiena提供



仅用于定量程序 (2.3.1)

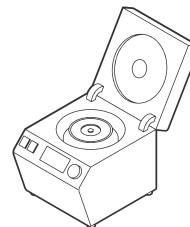
缓冲氯化钠蛋白胨溶液 pH 7.0
非Hygiena提供



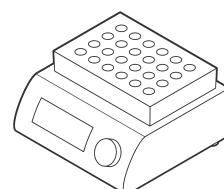
仅用于定性检测程序 (2.3.2)

设备

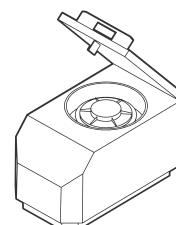
- 标准台式微型离心机, 可产生 $13,000 \times g$ 离心力
例如: Micro Star 21 - VWR



- 适用于2 mL离心管的加热装置
例如: AccuBlock™ - Labnet with heating block



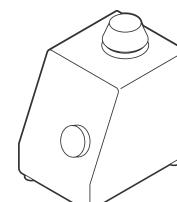
- 适用于2mL反应管的机械细胞破碎装置
GeneReady - 杭州遂真生物科技有限公司 或
BeadBug™ - Benchmark Scientific
其他设备请咨询(参见2.5.支持)。



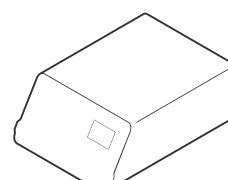
- 磁力搅拌器
例如: Color squid IKAMAG® - IKA®-Werke



- 涡旋混合器
例如: Vortex Genie - Scientific Industries

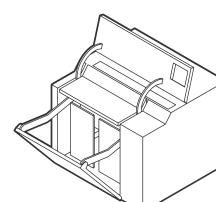


- D-Light
产品编号 MCH230039



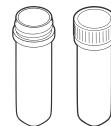
- 实验室均质机/搅拌机
例如: BagMixer 400 W - Interscience

仅用于定量程序 (2.3.1)



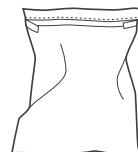
耗材

- 无菌2 mL反应管, 配透明螺纹盖



- B带过滤层的均质袋(孔径: 100 - 400 µm)

仅用于定量程序 (2.3.1)



2.2 注意事项与准备工作

遵循所有关于生物危害材料操作的通用安全预防措施, 例如始终穿着实验服和手套。妥善处置所有受污染材料, 对工作台面进行消毒, 并在可能产生气溶胶时使用生物安全柜。

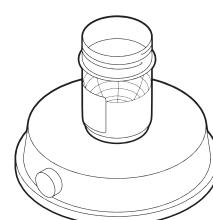
更多信息请参阅相应的安全数据表 (SDS)。SDS 可在线获取: www.hygiena.com/sds。

- 为避免交叉污染, 务必使用过滤吸头。

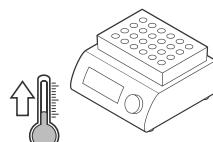


- 样品制备时吸取缓冲液需充分混匀。不建议超过96个反应。

容器必须保留部分试剂。当容器达到最低液位标记时, 请停止使用试剂。该标记表示搅拌器未运行时的最低允许移液液位。

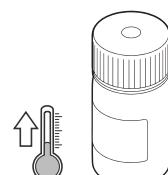


- 将加热装置设定为95至 100 °C。



- 使用前需解冻试剂D。

避免超过三次冻融。必要时可按试剂D说明书分装保存, 避免长时间暴露于光照下。



2.3 工作流程

第2.3.1节提供了在5小时内对不同基质中所有酵母菌和霉菌进行定量分析的操作规程，且无需富集步骤。

第2.3.2节提供了酵母菌和霉菌定性分析的操作规程，包含富集步骤。

2.3.1 酵母菌与霉菌 - 定量分析

不同基质的推荐操作流程

从各类样本制备基因组DNA用于定量分析时，请参照下表并根据样本材料选择相应操作流程。

缓冲溶液:

SoCi: 柠檬酸钠溶液

海鲜产品 样本	定量程序					稀释样本
	A	B	C	D	E	
生鱼	-	+	-	-	-	1:10 (w/v) 的SoCi溶液, 2 % (w/v)
鱼肉碎	-	+	-	-	-	1:10 (w/v) 含SoCi, 2 % (w/v)
罐装鱼	-	+	-	-	-	1:10 (w/v) 的SoCi溶液 2 % (w/v)
酸制腌渍鱼	-	+	-	-	-	1:10 (w/v) 与SoCi混合, 2 % (w/v)
鱼沙拉	-	+	-	-	-	1:10 (w/v) 与SoCi混合, 2 % (w/v)

大麻 样品	定量程序					稀释样品
	A	B	C	D	E	
可食用软糖	-	+	-	-	-	1:10 (w/v) 与SoCi混合, 2 % (w/v)
花朵	-	+	-	-	-	1:100 (w/v) 含SoCi, 2 % (w/v)
蜡	-	+	-	-	-	1:10 (w/v) 与SoCi混合, 2 % (w/v)
白巧克力	-	+	-	-	-	1:10 (w/v) 含SoCi, 2 % (w/v)

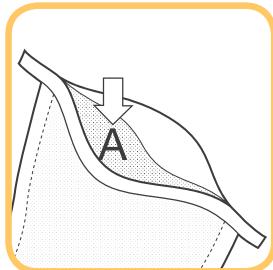
啤酒 样品	定量程序					稀释样品
	A	B	C	D	E	
啤酒花	-	+	-	-	-	1:100 (w/v) 与SoCi混合, 2 % (w/v)

乳制品 样品	定量程序					稀释样品
	A	B	C	D	E	
黄油	+	-	-	-	-	1:10 (w/v) 的SoCi溶液, 2 % (w/v)
奶油/打发奶油	+	+	-	-	-	1:10 (w/v) 的SoCi溶液, 2 % (w/v)
炼乳	+	+	+	-	-	1:10 (w/v) 含SoCi, 2 % (w/v)
牛奶	+	+	+	-	-	1:10 (w/v) 与SoCi混合, 2 % (w/v)
酪乳	-	+	+	-	-	1:10 (w/v) 与SoCi混合, 2 % (w/v)
酸奶	-	+	+	-	-	1:10 (w/v) 与SoCi混合, 2 % (w/v)
酸奶油	-	+	+	-	-	1:10 (w/v) 的SoCi溶液, 2 % (w/v)
鲜奶油	-	+	+	-	-	1:10 (w/v) 的SoCi溶液, 2 % (w/v)
马斯卡彭奶酪	-	+	+	-	-	1:10 (w/v) 与SoCi混合, 2 % (w/v)
酸奶	-	+	+	-	-	1:10 (w/v) 含SoCi, 2 % (w/v)
克菲尔	-	+	+	-	-	1:10 (w/v) 与SoCi混合, 2 % (w/v)
布丁	-	+	+	-	-	1:10 (w/v) 与SoCi混合, 2 % (w/v)
冰淇淋	-	+	+	-	-	1:10 (w/v) 与SoCi混合, 2 % (w/v)
半硬质奶酪	-	+	+	-	-	1:10 (w/v) 与SoCi混合, 2 % (w/v)
烫煮奶酪	-	+	+	-	-	1:10 (w/v) 与SoCi混合, 2 % (w/v)
熟制奶酪	-	+	+	-	-	1:10 (w/v) 的SoCi溶液, 2 % (w/v)
盐水奶酪	-	+	+	-	-	1:10 (w/v) 的SoCi溶液, 2 % (w/v)
脱脂奶粉	-	+	+	-	-	1:10 (w/v) 的SoCi溶液, 2 % (w/v)
婴儿配方奶粉	-	+	+	-	-	1:10 (w/v) 与SoCi混合, 2 % (w/v)
乳清	-	-	+	-	-	1:10 (w/v) 与SoCi混合, 2 % (w/v)
乳清粉	-	-	+	-	-	1:10 (w/v) 的SoCi溶液, 2 % (w/v)
全脂奶粉	-	-	+	+	-	1:10 (w/v) 与SoCi混合, 2 % (w/v)
喷雾奶油粉	-	-	+	+	-	1:10 (w/v) 与SoCi混合, 2 % (w/v)
软质奶酪	-	-	+	+	-	1:10 (w/v) 的SoCi溶液, 2 % (w/v)
凝乳/凝乳干酪	-	-	-	+	-	1:10 (w/v) 与SoCi混合, 2 % (w/v)
酸奶粉	-	-	-	-	+	1:10 (w/v) 与SoCi, 2 % (w/v)
凝乳粉	-	-	-	-	+	1:10 (w/v) 含SoCi, 2 % (w/v)

酵母菌与霉菌 - 定量分析

2.3.1.1 提取程序 A

本方案适用于黄油和奶油等样品。包含使用试剂D进行活死细胞鉴别的步骤。



1. 悬浮样品

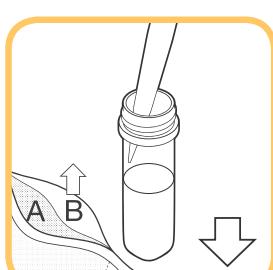
在带过滤层的均质袋中用缓冲液稀释样品 (详见表2.3.1)。

注意: 将样品称量于带过滤层的均质袋一侧 (A)。



2. 样品均质化

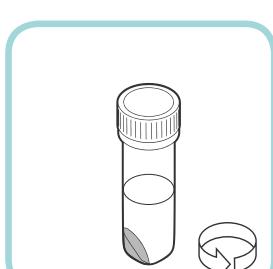
在均质机中以最高转速均质60秒。静置悬浮液5至10分钟。



3. 添加样品

将不超过1,000 μL样品 (上清液) 转移至带透明螺纹盖的2 mL透明反应管中。

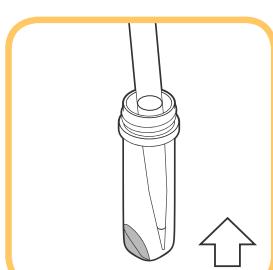
注: 使用均质袋另一侧 (B) 的上清液。



4. 离心

13,000 x g 离心 5 分钟。

注意: 必要时, 应根据所用离心机的手册计算离心力。



5. 去除上清液

离心结束后立即用移液器彻底弃去液体, 并进行适当灭活处理。

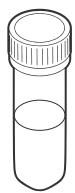
注意: 移液时注意移液吸头位于沉淀物对侧。



6. 加入试剂D

移入300 μL 试剂D，通过上下轻柔吸取5至10次使沉淀物复悬。

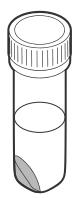
注意：请立即进行后续操作步骤，避免长时间暴露于光照下。
为达到最佳效率，沉淀物必须完全复悬。



7. D-LIGHT 处理

在D-Light设备中于室温暗处孵育10分钟。

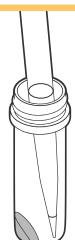
在D-Light设备中于室温下进行5分钟光照孵育。



8. 离心

13,000 $\times \text{g}$ 离心5分钟。

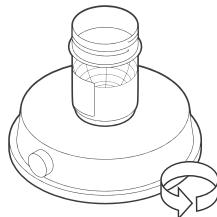
注意：必要时，应根据离心机使用说明书计算离心力。



9. 去除上清液

离心结束后立即用移液器彻底弃去液体，并进行适当灭活处理。

注意：移液时注意移液吸头位于沉淀物对侧。



10. 制备裂解缓冲液

将密封的裂解缓冲液容器置于磁力搅拌器上。

在磁力搅拌器上以400转/分钟持续搅拌裂解缓冲液，保持溶液均匀。

打开裂解缓冲液容器。

注意：开启磁力搅拌器及移液操作时需握住容器。

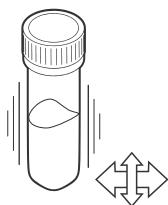


11. 加入裂解缓冲液

将300 μL 裂解缓冲液移入含样品沉淀的离心管。

注意：沿裂解缓冲液容器壁垂直吸取，距离底部约0.5厘米。

使用1,000 μL 过滤吸头将裂解缓冲液转移到样品中。

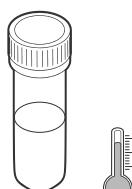


12. 机械破碎

将试管置于细胞破碎装置中进行破碎：

GeneReady - 4分钟, 6.5米/秒或

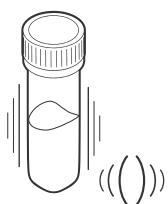
BeadBug - 4000转/分钟, 2分钟



13. 孵育

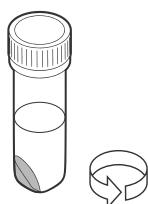
在加热装置中于95至100°C下孵育5分钟。

从加热装置中小心取出反应管, 让管子在 15 至 25 °C 下静置 1 分钟。



14. 混匀

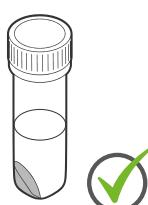
涡旋2秒。



15. 离心

$13,000 \times g$ 离心 5 分钟。

注意：必要时，应根据所用离心机说明书计算离心力。



用于检测的上清液

取25μL提取液用于foodproof酵母菌和霉菌定量冻干试剂盒。

严禁将沉淀物转移至PCR反应体系, 否则可能导致PCR反应抑制。

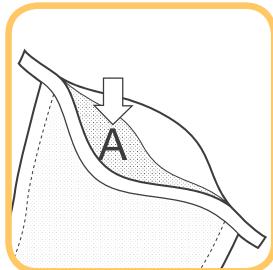
为后续分析使用, 将DNA储存于-15至-25°C。

解冻后, 用涡旋器短暂混匀, 然后以 $13,000 \times g$ 离心2分钟。

酵母菌与霉菌 - 定量分析

2.3.1.2 提取程序 B

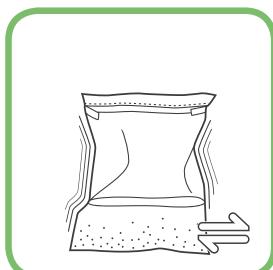
推荐使用此快速方案处理牛奶、酸奶、奶酪和脱脂奶粉等样本。包含使用试剂 D 区分活细胞与死细胞的步骤。



1. 悬浮样本

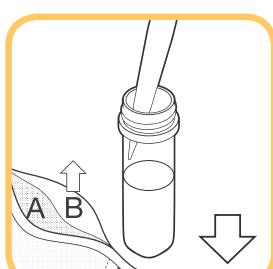
在带过滤层的均质袋中用缓冲液稀释样品 (详见表2.3.1)。

注意: 将样品称量于带过滤层的均质袋一侧 (A)。



2. 样品均质化

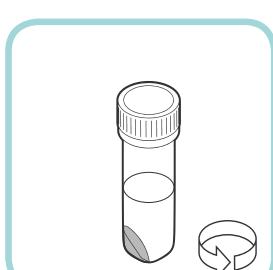
在均质机中以最高转速均质60秒。静置悬浮液5至10分钟。



3. 添加样品

将最多500 μL样品 (上清液) 转移至带透明螺纹盖的透明2 mL反应管中。.

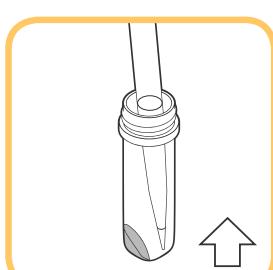
注意: 请使用均质袋另一侧 (B) 的上清液。



4. 离心

13,000 x g 离心 5 分钟。

注意: 必要时, 应根据离心机使用说明书计算离心力。



5. 去除上清液

离心结束后立即用移液器彻底弃去液体, 并进行适当灭活处理。

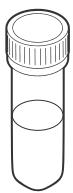
注意: 移液时注意移液吸头位于沉淀物对侧。



6. 加入试剂D

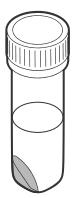
移入300 μL 试剂D，通过上下轻柔吸取5至10次使沉淀物复悬。

注意：请立即进行后续操作步骤，避免长时间暴露于光照环境。
为达到最佳效果，沉淀物必须完全复悬。



7. D-LIGHT 处理

在D-Light设备中于室温暗处孵育10分钟，
在D-Light设备中于室温下进行5分钟光照孵育。



8. 离心

13,000 $\times \text{g}$ 离心5分钟。

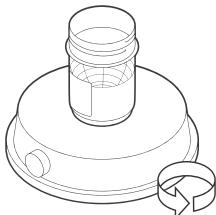
注：必要时应参照所用离心机说明书计算离心力值。



9. 除上清液

离心结束后立即用移液器彻底弃去液体，并进行适当灭活处理。

注意：移液时注意移液吸头位于沉淀物对侧。



10. 制备裂解缓冲液

将密闭的裂解缓冲液容器置于磁力搅拌器上。

在磁力搅拌器上以400转/分钟持续搅拌裂解缓冲液，保持溶液均匀。
打开裂解缓冲液容器。

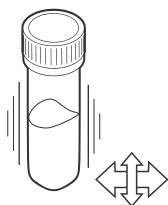
注意：开启磁力搅拌器及移液操作时请握住容器。



11. 加入裂解缓冲液

将300 μL 裂解缓冲液移入含样品沉淀的离心管。

注意：沿裂解缓冲液容器壁垂直吸取，距离底部约0.5厘米。
使用1,000 μL 滤芯吸头将裂解缓冲液转移至样品中。

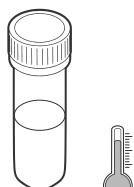


12. 机械性破碎

将试管放入细胞破碎装置中进行破碎：

GeneReady - 6.5 m/s 条件下处理4分钟, 或

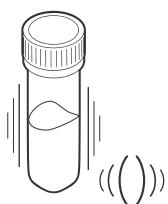
BeadBug - 4000转/分钟处理2分钟



13. 孵育

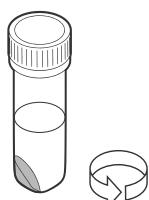
在加热装置中于95至100°C孵育5分钟。

小心从加热装置中取出反应管, 在15至25°C下静置1分钟。



14. 混匀

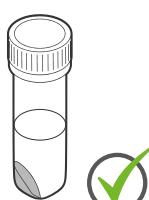
涡旋2秒。



15. 离心

13,000 × g 离心 5 分钟。

注意：必要时，应根据所用离心机说明书计算离心力。



用于检测的上清液

使用25 μL提取液进行foodproof酵母和霉菌定量冻干试剂盒检测。

严禁将沉淀物转移至PCR反应体系，否则可能导致PCR反应抑制。

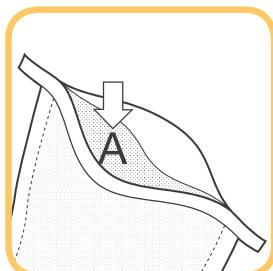
为后续分析使用，将DNA储存于-15至-25°C。

解冻后，用涡旋器短暂混匀，然后以 13,000 × g 离心 2 分钟。

酵母菌与霉菌 - 定量检测

2.3.1.3 提取程序 C

本方案适用于乳清、乳清粉、全脂奶粉和奶油粉等样本。包含使用试剂D区分活细胞与死细胞的步骤，以及延长加热步骤。



1. 悬浮样品

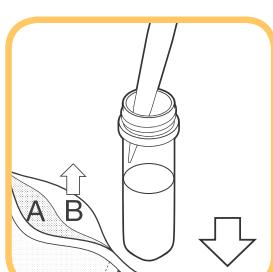
在带过滤层的合适均质袋中，用缓冲液(详见表 2.3.1)稀释样品。

注意：将样品称量于带滤层的均质袋一侧(A)。



2. 样品均质化

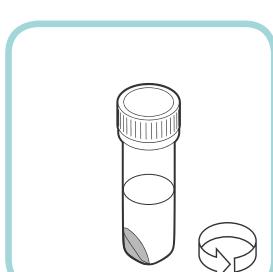
在均质机中以最高速度均质60秒。静置悬浮液5至10分钟。



3. 加入样品

将不超过500 μL样品(上清液)转移至带透明螺纹盖的2mL透明反应管中。

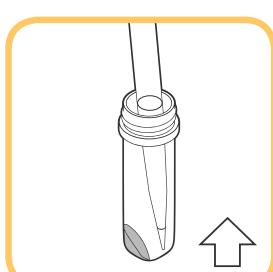
注：使用均质袋另一侧(B)的上清液。



4. 离心

以13,000 x g离心5分钟。

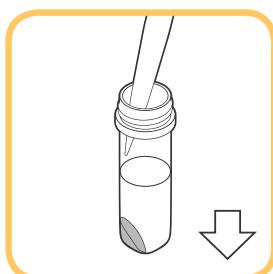
注意：如有必要，应根据离心机使用说明书计算离心力。



5. 去除上清液

离心结束后立即用移液器彻底弃去液体，并进行适当灭活处理。

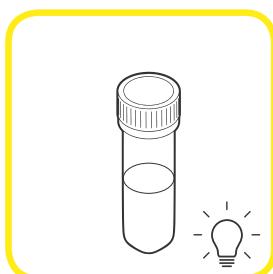
注意：移液时请确保移液吸头位于沉淀物对侧。



6. 加入试剂D

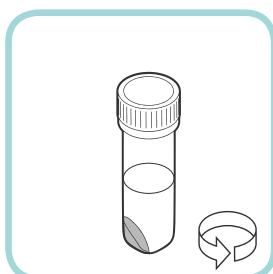
移入300 μL 试剂D, 通过上下轻柔吸取5至10次使沉淀物复悬。

注意:请立即进行后续操作步骤, 避免长时间暴露于光照下。
为达到最佳效率, 沉淀物必须完全复悬。



7. D-LIGHT处理

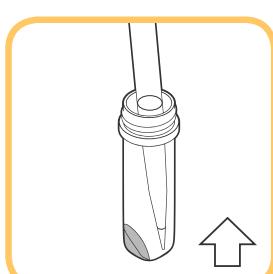
在D-Light设备中于室温暗处孵育10分钟,
在D-Light设备中于室温下进行5分钟光照孵育。



8. 离心

13,000 $\times \text{g}$ 离心 5 分钟。

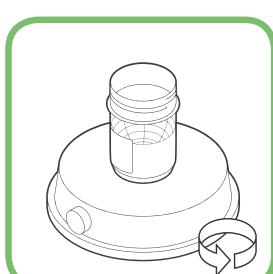
注:如有必要, 应根据离心机使用说明书计算离心力。



9. 去除上清液

离心结束后立即用移液器彻底弃去液体, 并进行适当灭活处理。

注意:移液时注意移液吸头位于沉淀物对侧。



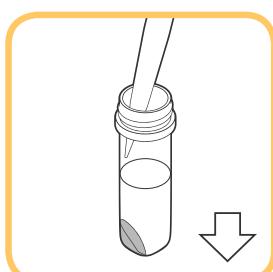
10. 制备裂解缓冲液

将密封的裂解缓冲液容器置于磁力搅拌器上。

在磁力搅拌器上以400转/分钟持续搅拌裂解缓冲液, 保持溶液均匀。

打开裂解缓冲液容器。

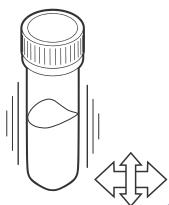
注意:开启磁力搅拌器及移液操作时请握住容器。



11. 添加裂解缓冲液

将300 μL 裂解缓冲液移入含样品沉淀的离心管中。

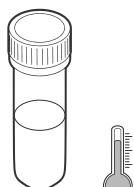
注意:沿裂解缓冲液容器壁垂直吸取, 距离底部约0.5厘米处操作。
使用1,000 μL 滤芯吸头将裂解缓冲液转移至样品中。



12. 机械破碎

将试管置于细胞破碎装置中进行破碎:

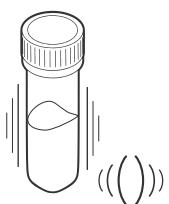
GeneReady - 6.5 m/s 条件下处理4分钟或
BeadBug - 4,000 rpm 转速下处理2分钟



13. 孵育

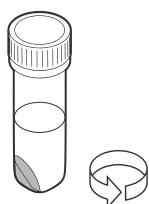
于加热装置中于95至100 °C孵育30分钟。

小心从加热装置中取出反应管, 在15至25°C下静置1分钟。



14. 混匀

涡旋2秒。



15. 离心

13,000 × g 离心 5 分钟。

注:必要时应参照所用离心机说明书计算离心力值。

检测用上清液

取25μL提取液用于foodproof酵母菌与霉菌定量冻干试剂盒检测。

严格避免将沉淀物转移至PCR反应中, 否则可能导致PCR抑制。

为后续分析使用 DNA应储存于-15至-25°C。

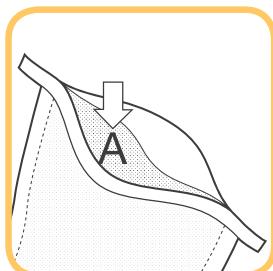
解冻后, 用涡旋器短暂混匀, 然后以 13,000 × g 离心 2 分钟。



酵母菌与霉菌定量检测

2.3.1.4 提取程序D

本方案适用于凝乳和凝乳干酪等样本。包含使用试剂 D 区分活细胞与死细胞的步骤、柠檬酸钠溶液洗涤步骤以及延长加热时间。



1. 悬浮样品

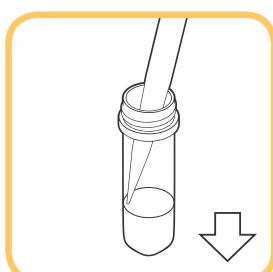
用缓冲溶液(详见表2.3.1)将样品稀释于带过滤层的均质袋中。

注意: 将样品称量于带过滤层的均质袋一侧(A)。



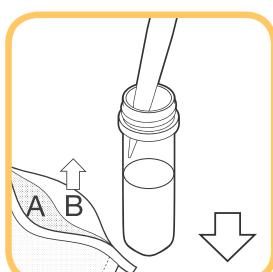
2. 样品均质化

在均质机中以最高转速均质60秒。静置悬浮液5至10分钟。



3. 向新试管中加入柠檬酸钠

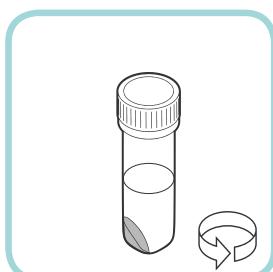
将不超过 $500\mu\text{L}$, m2% (w/v) 柠檬酸钠溶液至带透明螺纹盖的2 mL透明反应管中。



4. 加入样品

移入不超过 $500\mu\text{L}$ 样品(上清液)。

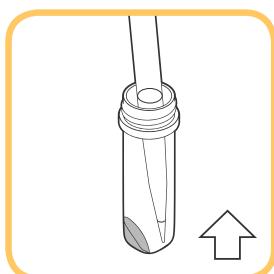
注: 使用均质袋另一侧(B)的上清液。



5. 离心

$13,000 \times g$ 离心 5 分钟。

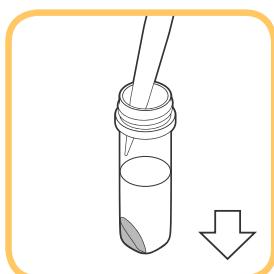
注意: 必要时, 应根据离心机使用说明书计算离心力。



6. 去除上清液

离心结束后立即用移液器彻底弃去液体，并进行适当灭活处理。

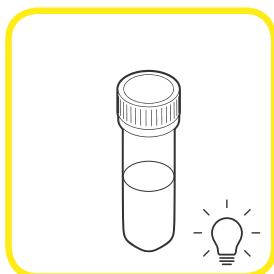
注意：移液时注意移液吸头位于沉淀物对侧。



7. 加入试剂D

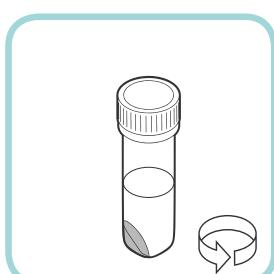
移入300 μL试剂D，通过上下轻柔吸取5至10次使沉淀物复悬。

注意：请立即进行后续操作步骤，避免长时间暴露于光照下。
为达到最佳效率，沉淀物必须完全复悬。



8. D-LIGHT 处理

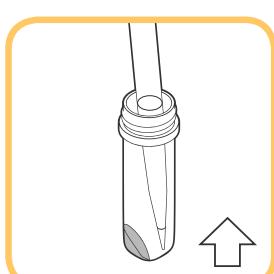
在D-Light设备中于室温暗处孵育10分钟，
在D-Light设备中于室温下进行5分钟光照孵育。



9. 离心

13,000 x g 离心5分钟。

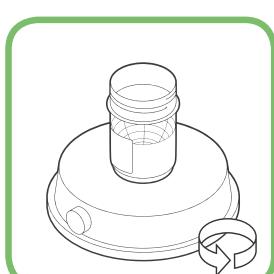
注：必要时应参照离心机使用手册计算离心力值。



10. 去除上清液

离心结束后立即用移液器彻底弃去液体，并进行适当灭活处理。

注意：移液时注意移液吸头位于沉淀物对侧。

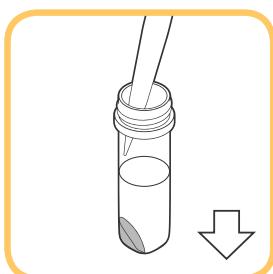


11. 制备裂解缓冲液

将密封的裂解缓冲液容器置于磁力搅拌器上。

在磁力搅拌器上以400转/分钟持续搅拌裂解缓冲液，保持溶液均匀。
打开裂解缓冲液容器。

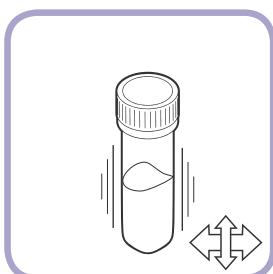
Note: Hold the container while switching on the magnetic stirrer and during pipetting.



12. 加入裂解缓冲液

将300 μL 裂解缓冲液移入含样品沉淀的离心管。

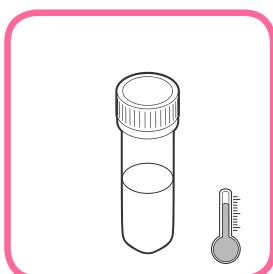
注意：沿裂解缓冲液容器壁垂直吸取，距离底部约0.5厘米。
使用 1,000 μL 过滤吸头将裂解缓冲液转移至样品中。



13. 机械破碎

将试管置于细胞破碎装置中进行破碎：

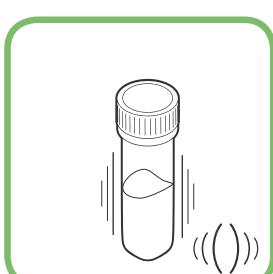
GeneReady - 4分钟, 6.5米/秒或
BeadBug - 4000转/分钟, 2分钟



14. 孵育

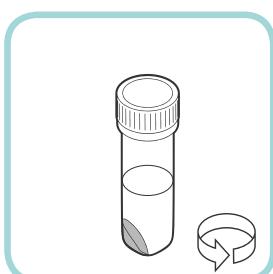
在加热装置中于95至100°C下孵育30分钟。

从加热装置中小心取出反应管，在 15 至 25 °C 下静置 1 分钟。



15. 混匀

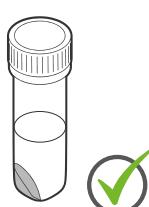
涡旋2秒。



16. 离心

13,000 $\times \text{g}$ 离心 5 分钟。

注意：必要时，应根据所用离心机说明书计算离心力。



用于检测的上清液

取25 μL 提取液用于食品专用酵母菌和霉菌定量冻干试剂盒。

严禁将沉淀物转移至PCR反应体系，否则可能导致PCR反应抑制。

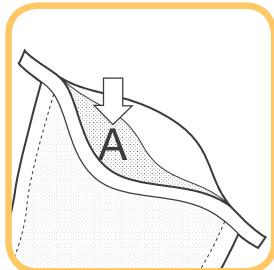
为后续分析使用，将DNA储存于-15至-25°C。

解冻后，用涡旋器短暂混匀，然后以13,000 $\times \text{g}$ 离心2分钟。

酵母菌与霉菌 - 定量分析

2.3.1.5 提取程序E

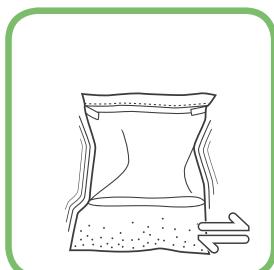
本方案适用于酸奶粉、凝乳粉等样品。包含使用试剂D区分活细胞与死细胞的步骤、额外的离心步骤、柠檬酸钠溶液洗涤步骤以及延长加热时间。



1. 悬浮样品

在带过滤层的均质袋中用缓冲液稀释样品(详见表 2.3.1)。

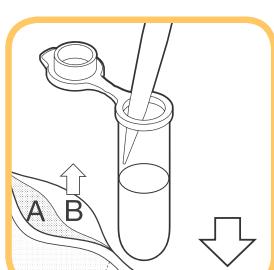
注意: 将样品称量于带过滤层的均质袋一侧(A)。



2. 样品均质化

在均质机中以最高转速均质60秒。

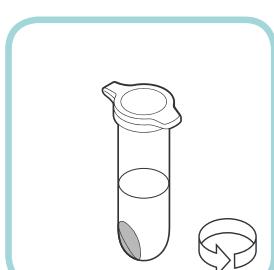
静置悬浮液5至10分钟。



3. 添加样品

将最多1,500 µL样品(上清液)转移至2 mL反应管中。

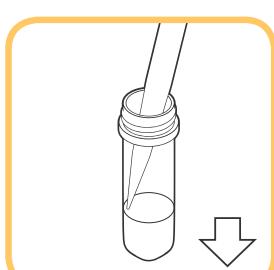
注意: 请使用均质袋另一侧(B)的上清液。



4. 离心

低速离心1分钟: 100 x g.

注意: 必要时, 应根据离心机使用说明书计算离心力。



5. 向新试管中加入柠檬酸钠溶液

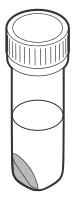
将不超过500 µL的2% (w/v) 柠檬酸钠溶液
至带透明螺纹盖的2 mL透明反应管中。



6. 加入样本

移取最多500 μL 样品(步骤4的上清液),通过移液吸头轻柔上下吸取5至10次进行混合。

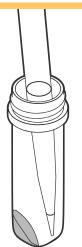
注意:步骤4沉淀物中的部分成分可能抑制PCR反应,严禁使用。



7. 离心

13,000 $\times \text{g}$ 离心5分钟。

注意:必要时,应根据离心机使用说明书计算离心力。



8. 移除上清液

离心结束后立即用移液器彻底弃去液体,并进行适当灭活处理。

注意:移液时注意移液吸头位于沉淀物对侧。

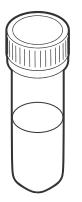


9. 加入试剂D

移入300 μL 试剂D,通过轻柔上下吸取5至10次使沉淀物复悬。

注意:请立即进行后续操作步骤,避免长时间暴露于光照环境。

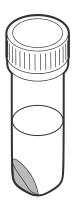
为达到最佳效果,需将沉淀完全重新悬浮。



10. D-LIGHT处理

在D-Light设备中于室温暗处孵育10分钟,

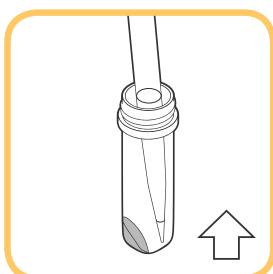
在D-Light设备中于室温下进行5分钟光照孵育。



11. 离心

13,000 $\times \text{g}$ 离心5分钟。

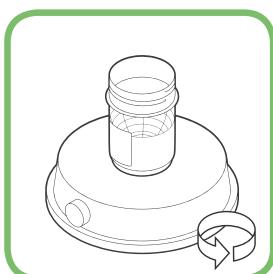
注:必要时应参照离心机使用手册计算离心力值。



12. 去除上清液

离心结束后立即用移液器彻底弃去液体，并进行适当灭活处理。

注意：移液时注意移液吸头位于沉淀物对侧。



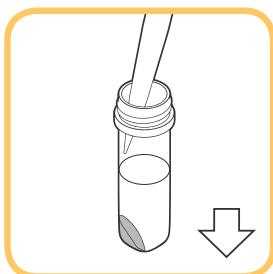
13. 制备裂解缓冲液

将密闭的裂解缓冲液容器置于磁力搅拌器上。

在磁力搅拌器上以400转/分钟持续搅拌裂解缓冲液，保持溶液均匀。

打开裂解缓冲液容器。

注意：开启磁力搅拌器及移液操作时请握住容器。

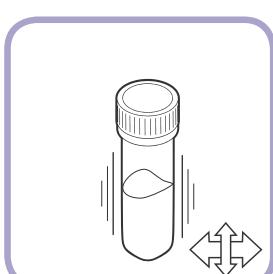


14. 加入裂解缓冲液

将300 μL裂解缓冲液移入含样品沉淀的离心管。

注意：沿裂解缓冲液容器壁垂直吸取，距离底部约0.5厘米。

使用1,000 μL过滤吸头将裂解缓冲液转移至样品中。

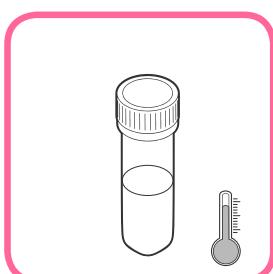


15. 机械性破碎

将管子放入细胞破碎装置中进行破碎：

GeneReady - 6.5 m/s条件下处理4分钟，或

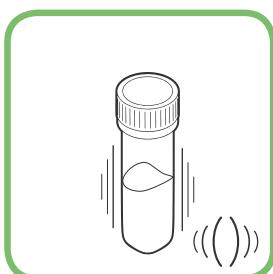
BeadBug - 4000转/分钟处理2分钟



16. 孵育

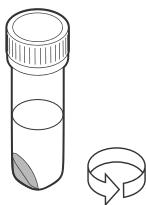
在加热装置中于95至100°C下孵育30分钟。

小心从加热装置中取出反应管，在15至25°C下静置1分钟。



17. 混匀

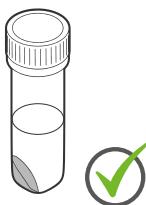
涡旋2秒。



18. 离心

13,000 × g 离心 5 分钟。

注意：如有必要，应根据所用离心机的手册计算离心力。



用于检测的上清液

使用25 μL提取液进行foodproof酵母和霉菌定量冻干试剂盒检测。

严禁将沉淀物碎片转移至PCR反应体系，否则可能导致PCR反应抑制。

为后续分析使用，将DNA储存于-15至-25°C。

解冻后，用涡旋器短暂混匀，然后以 13,000 × g 离心 2 分钟。

2.3.2 酵母菌和霉菌 - 定性检测

不同食品类型的推荐操作流程

从各种样品中制备基因组DNA进行定性分析时, 请参考下表。

乳制品 样品	程序 F
巧克力牛奶	+

酵母菌与霉菌 - 定性检测

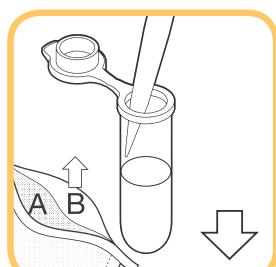
2.3.2.1 提取程序F

本快速方案适用于富集样本。包含使用试剂D进行活死细胞鉴别的步骤。



1. 摆匀样本

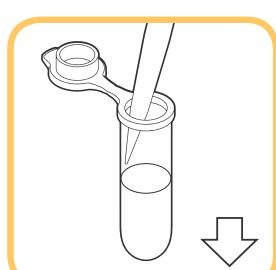
轻柔摇晃富集培养液，静置悬浮液5至10分钟。



2. 添加样本

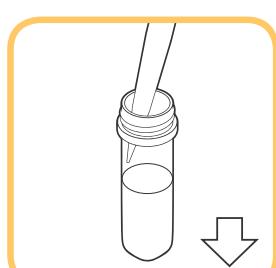
将150 μL样本（上清液）转移至2mL反应管中。

注意：请使用均质袋另一侧(B)的上清液。



3. 悬浮样本

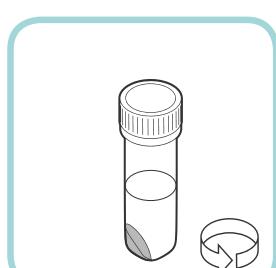
用1,350 μL pH 7.0的缓冲氯化钠蛋白胨溶液将样品以1:10 (w/v) 的比例稀释。
静置悬浮液3至5分钟。



4. 将上清液转移至新试管

将500 μL上清液转移至带透明螺纹盖的2 mL透明新反应管中。

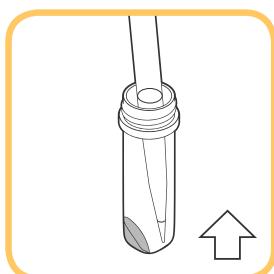
注意：沉淀物可能抑制PCR反应，严禁使用。



5. 离心

13,000 x g 离心 5 分钟。

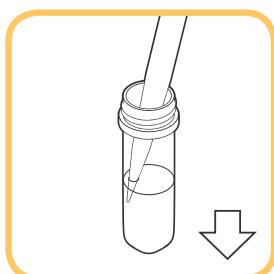
注意：必要时应根据离心机使用说明书计算离心力值。



6. 去除上清液

离心结束后立即用移液器彻底弃去液体，并进行适当灭活处理。

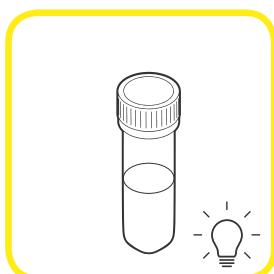
注意：移液时注意移液吸头位于沉淀物对侧。



7. 加入试剂D

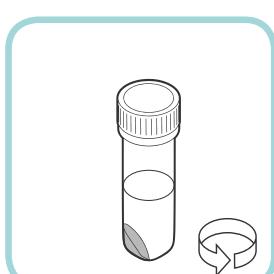
移入300 μL 试剂D，通过移液吸头上下轻柔吸取5至10次使沉淀物复悬。

注意：请立即进行后续操作步骤，避免长时间暴露于光照下。
为达到最佳效率，沉淀物必须完全复悬。



8. D-LIGHT 处理

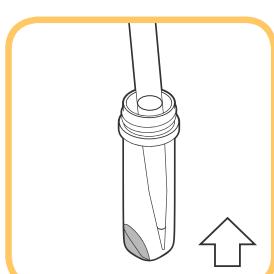
在D-Light设备中于室温暗处孵育10分钟，
在D-Light设备中于室温下进行5分钟光照孵育。



9. 离心

13,000 $\times \text{g}$ 离心5分钟。

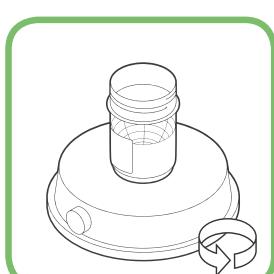
注：必要时应参照离心机使用说明书计算离心力值。



10. 去除上清液

离心结束后立即用移液器彻底弃去液体，并进行适当灭活处理。

注意：移液时注意移液吸头位于沉淀物对侧。



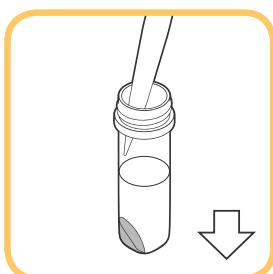
11. 制备裂解缓冲液

将密封的裂解缓冲液容器置于磁力搅拌器上。

在磁力搅拌器上以400转/分钟持续搅拌裂解缓冲液，保持溶液均匀。

开启裂解缓冲液容器。

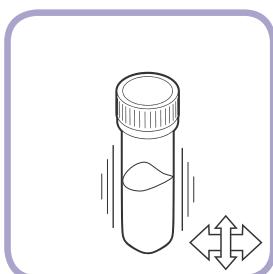
注意：开启磁力搅拌器及移液操作时请握住容器。



12. 加入裂解缓冲液

将300 μL 裂解缓冲液移入含样品沉淀的离心管。

注意：沿裂解缓冲液容器壁垂直吸取，距离底部约0.5厘米。
使用 1,000 μL 过滤吸头将裂解缓冲液转移至样本中。

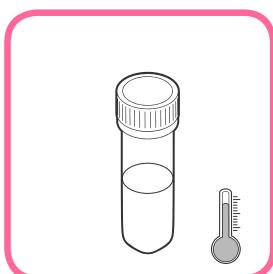


13. 机械破碎

将试管置于细胞破碎装置中进行破碎：

GeneReady - 4分钟, 6.5米/秒或

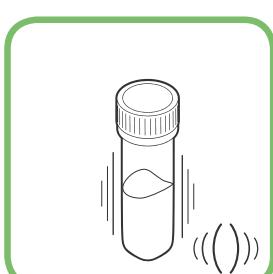
BeadBug - 4000转/分钟, 2分钟



14. 孵育

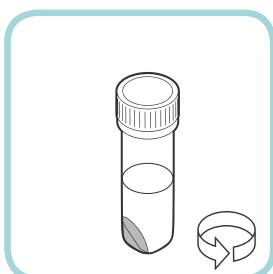
在加热装置中于95至100°C下孵育5分钟。

从加热装置中小心取出反应管，让管子在 15 至 25 °C 下静置 1 分钟。



15. 混匀

涡旋2秒。



16. 离心

13,000 $\times \text{g}$ 离心 5 分钟。

注意：必要时，应根据离心机使用说明书计算离心力。

用于检测的上清液

取25 μL 提取液用于 foodproof 酵母菌和霉菌定量冻干试剂盒。

严禁将沉淀物转移至 PCR 反应体系，否则可能导致 PCR 反应抑制。

为后续分析使用，请将 DNA 储存于 -15 至 -25 °C 环境中。

解冻后，用涡旋器短暂混匀，然后以 13,000 $\times \text{g}$ 离心 2 分钟。



2.4 故障排除

问题	可能原因	建议
DNA提取物抑制PCR	DNA提取物中含有过多PCR抑制剂。	稀释DNA提取物(例如1:10),或减少提取的DNA量(例如LyoKits试剂盒中使用5 μL替代25 μL)。
	部分离心沉淀物转移至PCR体系中。	进行PCR前务必离心DNA样本。 使用上清液顶层作为PCR模板。 避免滤芯吸头接触沉淀物。
	上清液未完全移除。	彻底去除上清液(例如在试剂D处理后)。
DNA产量低	试剂盒组分储存不当。	将试剂盒试剂储存于15至25 °C环境中。
	样品中含有降低DNA提取效率的物质。	减少样品体积。
	沉淀物重悬不完全。	通过移液吸头多次吹吸或涡旋混合改善重悬效果。
	反应液中无珠粒或珠粒不足(StarPrep Two, S 400 08.1)。	使用正确的搅拌设置。 移液操作不得超过96个反应。 请勿使用低于标示最低液位的试剂。
	反应条件不佳。	确保适当的细胞裂解和加热条件。 用温度计验证加热块的温度是否正确。
反应管盖在加热过程中或结束后打开	反应管未拧紧。	加热前确保所有反应管均已拧紧。 使用盖夹将试管妥善密封。 使用加热装置时,需确保移除试管时避免直接接触管盖。

2.5 支持

若您对产品有任何疑问或遇到问题, 请联系我们:



www.hygiena.com/support

我们的目标是为您提供快速有效的解决方案。若您对产品改进有任何建议, 或希望将产品应用于其他领域, 也欢迎随时联系我们。您的反馈对我们至关重要。

附加信息

3. 补充信息

3.1 基本信息

质量控制

所有产品均接受质量控制部门的定期监测。您可在官网查阅分析证书(COA)。若需自行进行质量检测,证书中详述了分析方法。

废弃物处理

所有受污染及潜在传染性物质(如富集培养物或食品样本)须经高压灭菌处理后,按当地法规处置。未使用的化学品请参照安全数据表(SDS)进行规范处置。

保修条款与免责声明

“有限保修”与“免责声明”:Hygiena Diagnostics GmbH公司保证,在标签所示有效期内,本产品在材料和工艺上无缺陷,但须满足以下条件:

- (1) 产品使用须遵循产品说明书中的指导原则与操作说明;
- (2) 在下列情况下,Hygiena Diagnostics GmbH不承担任何缺陷担保责任:缺陷源于非本公司提供的材料或工艺;因误用、违反说明使用、不当储存或操作导致的缺陷;
- (3) 所有关于适销性及特定用途适用性的书面、口头、明示或暗示担保,有效期均自生产日期起仅为一年。除本保修条款明确规定外,不存在其他任何超出上述范围的担保;
- (4) Hygiena Diagnostics GmbH不对任何经销商或分销商超出本文件明确表述范围所作的承诺、陈述或担保承担责任,除非该承诺、陈述或担保由Hygiena Diagnostics GmbH高管以书面形式明确作出;
- (5) Hygiena Diagnostics GmbH不承担任何附带或间接损害赔偿责任,包括但不限于:产品使用损失、拆卸或更换人工费、时间损失、不便损失、电话费、运输费、财产损失或损坏、收入损失、人身伤害或非正常死亡;
- (6) Hygiena Diagnostics GmbH保留对依据本保修条款退回的任何模块进行更换或提供信用额度处理的权利。

商标

foodproof®, microproof®, vetproof®, ShortPrep®, StarPrep®, RoboPrep® 和 LyoKit® 是 Hygiena Diagnostics GmbH 的注册商标。

Hygiena®是 Hygiena 的注册商标。

其他品牌或产品名称均为其各自所有者的商标。

3.2 参考编号

参考编号和 Hygiena Diagnostics GmbH 原文编号:

S 400 08.1

3.3 变更索引

版本 1, 2019 年 11 月:

新文档版式和内容。

修订版A, 2023年12月:

品牌重塑与版式调整

S 400 08.1 20-4 -> INS-KIT230177-4-REVA

海净纳(上海)商贸有限公司
地址:上海市杨浦区黄兴路2218号1202室(上海合生汇)
电话:021-65060292
微信公众号:hygienachina

由 Hygiena Diagnostics GmbH 公司制造

地址

Hermannswerder 17
14473 波茨坦
德国

www.hygiena.com