

Biomarker Plant DNA Kit

◆ 产品介绍

通过改良的经典CTAB法，在植物DNA抽提液内添加了多种去除植物多糖、多酚的成份，能迅速裂解细胞和灭活细胞内核酸酶，氯仿抽提后通过离心清除多糖、多酚和蛋白质；在高离子盐状态下，基因组DNA选择性吸附于离心柱内硅基质膜，再通过一系列快速的漂洗—离心的步骤，进一步将多糖、多酚和细胞代谢物、蛋白等杂质去除；最后利用低盐的洗脱缓冲液将纯净基因组DNA从硅基质膜上洗脱。

本试剂盒使用硅胶柱纯化方式，提取过程中无需使用苯酚等有毒试剂，也无需进行耗时的醇类沉淀，并最大限度的去除杂质。

◆ 试剂盒组成

试剂盒组成	保存	50次
裂解液PL	室温	30 ml
结合液PQ	室温	15 ml 第一次使用前按说明加指定量乙醇
抑制物去除液IR	室温	25 ml
漂洗液WB	室温	13ml 第一次使用前按说明加指定量乙醇
洗脱缓冲液EB	室温	15 ml
吸附柱AC	室温	50个
收集管 (2ml)	室温	50个

◆ 储存事项:

- 1.裂解液PL、或者抑制物去除液IR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，恢复澄清透明后冷却到室温即可使用。结合液PQ盐酸胍浓度高，加入乙醇后可能出现一些沉淀但不影响使用，直接取上清用。
- 2.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。

◆ 注意事项

- 1.所有的离心步骤均在室温完成，使用转速可以达到13,000rpm的传统台式离心机。
- 2.开始实验前将需要的水浴先预热到65°C备用。
- 3.需要自备氯仿或者氯仿/异戊醇（体积比24：1混合）、无水乙醇和β-巯基乙醇。
- 4.结合液PQ和抑制物去除液IR中含有刺激性化合物，操作时要戴乳胶手套，避免沾染皮肤、眼睛和衣服。若沾染皮肤、眼睛时，要用大量清水或者生理盐水冲洗。
- 5.不同来源的植物组织材料中提取DNA的量会有差异，一般100mg新鲜组织产量可达3-25 μg。
- 6.洗脱液EB不含有螯合剂EDTA，不影响下游酶切、连接等反应。也可以用水洗脱，但需要确保pH大于7.5，pH过低影响洗脱效率。用水洗脱DNA需要保存在-20°C。DNA如果需要长期保存，可以用TE缓冲液洗脱（10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8.0），但是EDTA可能影响下游酶切反应，使用时可以适当稀释。
- 7.本试剂盒是按照标准提取过程配置各溶液体积，如果样品DNA含量低或者产量低，需要扩大提取量，还需要另外购买溶液。

本试剂盒可在室温储存12个月不会影响使用效果

◆ 标准操作步骤:(实验前请先阅读注意事项)

提示:

第一次使用前请先在漂洗液WB和结合液PQ中加入指定量的无水乙醇,充分混匀,加入后请及时在方框打钩标记已加入乙醇,以免多次加入!

取所需适量裂解液PL放置在65°C预热,使用前加入 β -巯基乙醇到终浓度2%。

1.取适量植物组织(新鲜组织100 mg或干重组织30 mg)在研钵中加入液氮充分碾磨成粉末或者使用打碎仪将组织样破碎。

2.转移破碎之后的组织样到一个1.5ml离心管中,不要解冻,立即加入加600 μ l 65°C预热的裂解液PL(确认已加入 β -巯基乙醇至2%),剧烈涡旋振荡混匀,用大口径枪头轻柔吹打帮助裂解。

① 如果组织裂解困难,可根据需要加一个轻柔匀浆10秒的步骤帮助裂解。

② 加裂解液之前动作要快,不要使组织样融化,不然会影响核酸的完整性。

3.65°C水浴20-30分钟,期间颠倒混匀2-3次。

可选步骤:如果预计样品RNA丰富易残留,可在水浴前加入5-6 μ l RNA酶(20mg/ml)。如果组织干燥或者产量低,可以适当延长水浴时间。

注:如果提取的DNA残留RNA较多导致电泳时候条带拖尾,条带扭曲,背景很高等不正常电泳情况,可以加1% RNA酶(10mg/ml) 37°C或者室温放置半小时消化RNA,消化完后不需要特殊处理便可用于PCR或者酶切。

4.加入700 μ l 氯仿或者氯仿/异戊醇(体积比24:1混合),颠倒充分混匀数次(或者涡旋混匀),13,000rpm离心5分钟。

可选步骤(一般不需要):若提取的植物组织富含多糖多酚,可以在第4步前用等体积Tris饱和酚(PH8.0)/氯仿(1:1)抽提一遍。

5.小心吸取上清到一个新的1.5ml离心管,注意不要吸到界面物质。

可选步骤(一般不需要):如上清比较浑浊,则可重复步骤4一遍,直到得到透亮上清。

6.较精确估算上清量,加入1.5倍体积结合液PQ(请先检查是否已加入无水乙醇!)后立刻涡旋,充分混匀。此时可能出现沉淀,但不影响实验结果。

7.将上一步所得混合物(包括可能出现的沉淀)加入一个吸附柱AC中,(吸附柱放入收集管中)13,000rpm离心30秒,倒掉收集管中的废液(先加700 μ l离心,弃废液,再加入剩余的溶液,再次离心)。

8.加入500 μ l抑制物去除液IR,12,000rpm离心30秒,弃废液。

9.加入600 μ l漂洗液WB(请先检查是否已加入无水乙醇!),12,000rpm离心30秒,弃掉废液。

10.加入600 μ l漂洗液WB,12,000rpm离心30秒,弃掉废液。

11.将吸附柱AC放回空收集管中,13,000rpm离心2分钟,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100 μ l洗脱缓冲液EB(洗脱缓冲液事先在65-70°C水浴中预热),室温放置

3-5分钟,12,000rpm离心1分钟。将得到的溶液重新加入离心吸附柱中,室温放置2分钟,12,000rpm离心1分钟。

洗脱体积越大,洗脱效率越高,如果预计和需要产量高,可增大洗脱体积,如果需要DNA浓度较高,可以适当减少洗脱体积,但是最小体积不能少于50 μ l,体积过小降低DNA洗脱效率,减少DNA产量。

13.DNA可以存放在2-8°C,如果要长时间存放,可以放置在-20°C。

◆ 附录(低DNA含量或者产量低样品操作步骤):

1.取适量植物组织(新鲜组织400 mg或干重组织200 mg)在研钵中加入液氮充分碾磨成粉末。

2.转移破碎之后的组织样到一个15ml离心管中,不要解冻,立即加入9ml 65°C预热的裂解液PL(确认已经加入 β -巯基乙醇至2%),剧烈涡旋振荡混匀,用大口径枪头吹打帮助裂解。

如果组织裂解困难,可根据需要加一个轻柔匀浆10秒的步骤帮助裂解。

3.室温放置60分钟，中间不时颠倒离心管以混合样品数次。

如果组织干燥或者产量低，可以放置在65℃水浴。

4.加4.5ml氯仿/异戊醇（体积比24：1混合），涡旋充分混匀，3,000g 离心10分钟。

5.小心吸取上清到一个新的15ml离心管，注意不要吸到界面物质。重复一遍步骤4。

6.小心吸取上清到一个新的15ml离心管，估算上清量，加入0.7倍体积的异丙醇，涡旋混匀来沉淀DNA。

7.立刻3,000g 离心20分钟沉淀DNA，弃上清，颠倒离心管口放在纸巾上控干残留液体，并小心用移液枪吸干沉淀周围残留液体（不要过于干燥DNA沉淀）。

8.加入300 μ l—400 μ l预热到65℃的灭菌水，重新溶解DNA，可能需要在65℃短暂温育帮助溶解，期间不断轻弹管底帮助溶解。

9.加入1.5倍体积结合液PQ（450 μ l—600 μ l，请先检查是否已加入无水乙醇!）后立刻涡旋，充分混匀。此时可能出现沉淀，但不影响实验结果。

10.后续步骤和上面标准操作步骤7开始后完全一样。