

版本号:220301

New Type Plant DNA Kit**新型植物基因组 DNA 快速提取试剂盒**

目录号: DN15

❖ **适用范围:**

适用于快速提取植物组织细胞和真菌基因组DNA等。

❖ **试剂盒组成、储存、稳定性:**

试剂盒组成	保存	50 次	100 次	200 次
RNase A(10mg/ml)	-20℃	250 µl	500 µl	1 ml
缓冲液 AP1	室温	20 ml	40 ml	80 ml
缓冲液 AP2	室温	7 ml	13 ml	26 ml
缓冲液 AP3/E	室温	15 ml	25 ml	50 ml
		第一次使用前按说明加指定量乙醇		
漂洗液 WB	室温	13 ml	25ml	50 ml
		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	15 ml	20 ml
吸附柱 AC	室温	50 个	100 个	200 个
收集管 (2ml)	室温	50 个	100 个	200 个

本试剂盒全部组分常温运输, 各组分按照指定温度储存 12 个月不影响使用效果。

储存事项:

1. **缓冲液 AP1、AP3/E 低温时可能出现析出和沉淀**, 可以在 65℃ 水浴几分钟帮助重新溶解 (AP3 加入乙醇前可加热, 加入乙醇后不可加热), **恢复澄清透明后冷却到室温即可使用**。
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。

❖ 产品介绍:

该试剂盒采用 DNA 吸附柱和新型独特的溶液系统, 适合于从含酚类、多糖类和酶抑制物的植物样品中快速简单地提取基因组 DNA。可在 30 分钟内完成一个或多个 100mg 新鲜或 20mg 干燥的植物样品 DNA 的纯化工作。提取过程不需要用到有毒的酚氯仿等有机物抽提, 也不需要用到耗时的异丙醇或乙醇沉淀, 并能快速高效地去除多糖类、酚类和酶抑制物等杂质, 纯化的 DNA 可直接用于 PCR、酶切和杂交等实验。

新鲜或干燥的植物组织(细胞)磨碎后经裂解液裂解; 蛋白质、多糖、细胞残片被沉淀去除; 然后基因组 DNA 在高离序盐状态下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, 最后低盐的洗脱缓冲液将纯净基因组 DNA 从硅基质膜上洗脱。

❖ 产品特点:

1. 离心吸附柱内硅基质膜全部采用特制吸附膜, 柱与柱之间吸附量差异极小, 可重复性好。克服了国产试剂盒膜质量不稳定的弊端。
2. 不需要使用有毒的苯酚等试剂, 也不需要乙醇沉淀等步骤。
3. 快速, 简捷, 单个样品操作一般可在 1 小时内完成。
4. 数种去多糖、多酚成份和多次柱漂洗确保高纯度, OD260/OD280 典型的比值达 1.7~1.9, 可直接用于 PCR, Southern-blot 和各种酶切反应。

❖ 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 13,000 rpm 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℃ 备用。
3. 缓冲液 AP3/E 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。**
4. 不同来源的植物组织材料中提取 DNA 的量会有差异, 一般 100mg 新鲜组织典型产量可达 3-25μg。

5. **洗脱液 EB 不含有螯合剂 EDTA**，不影响下游酶切、连接等反应。**也可以使用水洗脱，但应该确保 pH 大于 7.5**，pH 过低影响洗脱效率。用水洗脱 DNA 应该保存在 -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。

❖ **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 中加入指定量无水乙醇，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！
- ⇒ 第一次使用前请先在缓冲液 AP3/E 中加入指定量无水乙醇！

1. 取适量植物组织（新鲜组织 100 mg 或干重组织 20 mg，可适当多取一些样品弥补粘在研钵上的损失）在研钵中加入液氮充分碾磨成细粉。

研磨前，可准备一个 1.5ml 离心管，加入 400 μl 缓冲液 AP1 和 4 μl RNase A(10 mg/ml)室温备用。

2. 转移细粉（新鲜组织 100 mg 或干重组织 20 mg）到前面准备的 1.5ml 离心管（已加入 400 μl 缓冲液 AP1 和 4 μl RNase A(10 mg/ml)旋涡振荡，充分混匀帮助裂解。
3. 65°C 水浴 10 分钟，在水浴过程中可颠倒离心管 2-3 次，混合样品。

注意：此步骤也可室温操作，室温放置 10 分钟，但是 DNA 得率会降低一些。

4. 加入 130 μl 缓冲液 AP2，涡旋振荡混匀 1 分钟，冰上放置 5 分钟，13,000 rpm 离心 5-10 分钟，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。

此步骤可以沉淀去除蛋白、多糖、等各种杂质。

5. 计算上清量，加入 1.5 倍体积的 AP3/E（**请先检查是否已加入无水乙醇!**），立即振荡混匀。

加入 AP3/E 可能会出现絮状沉淀，但不影响 DNA 提取。注意将 AP3/E 直接加入到上清并立即吹打或者振荡混匀。

6. 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) 13,000 rpm 离心 30-60 秒, 倒掉收集管中的废液 (先加 650 μ l 离心, 弃废液, 再加入剩余的溶液, 再次离心)。

7. 加入 600 μ l 漂洗液 WB (请先检查是否已加入无水乙醇!), 13,000 rpm 离心 30 秒, 弃掉废液。
8. 重复一遍操作步骤 7。

注意: 如果吸附柱膜还呈现较多绿色色素, 可添加此步漂洗, 向吸附柱 AC 中加入 500 μ l 无水乙醇, 13,000 rpm 离心 30 秒, 弃掉废液。

9. 将吸附柱 AC 放回空收集管中, 13,000 rpm 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。
10. 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 μ l-100 μ l 洗脱缓冲液 EB, 室温放置 3-5 分钟, 13,000 rpm 离心 1 分钟。将得到的溶液重新加入吸附柱中, 室温放置 2 分钟, 13,000 rpm 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, 但是最小体积不应少于 50 μ l, 体积过小降低 DNA 洗脱效率, 减少 DNA 产量。
11. DNA 可以存放在 2-8 $^{\circ}$ C, 如果要长时间存放, 可以放置在一 20 $^{\circ}$ C。