

HiPure Plant DNA Mini Kit

广谱植物 DNA 小提试剂盒

本产品为植物 DNA 抽提提供一种广谱性的解决方案，本产品结合硅胶柱纯化技术和经典的 CTAB/氯仿抽提技术，适合于从 $\leq 200\text{mg}$ 新鲜/冻藏植物样品， $\leq 50\text{mg}$ 干燥植物/种子样品提取高纯度的总 DNA。纯化的 DNA 包括基因组 DNA 和叶绿体 DNA。得到的 DNA 可直接用于 PCR, SSR, AFLP, RAPD 以及 Southern Blot 等实验。以下离心条件都在室温下进行。

产品组份

产品编号	D3161-01	D3161-02	D3161-03	D3161-04
纯化次数	10 次	50 次	250 次	1000 次
HiPure gDNA Mini Columns	10	50	250	4 x 250
2ml Collection Tubes	10	50	2 x 125	10 x 100
Buffer PTL	10 ml	40 ml	200 ml	2 x 400 ml
PVP-40	0.2 g	0.8 g	4 g	2 x 8 g
Buffer PBD*	5 ml	20 ml	80 ml	2 x 160 ml
Buffer GWP	8 ml	30 ml	150 ml	550 ml
Buffer GW2*	6 ml	20 ml	50 ml	2 x 100 ml
RNase A	5 mg	10 mg	45 mg	180 mg
Protease Dissolve Buffer	1.8 ml	1.8 ml	5 ml	15 ml
Buffer AE	5 ml	15 ml	30 ml	120 ml

保存条件

本产品室温(15~25℃)可保存 18 个月。低温下, Buffer PTL 可能会有沉淀形成, 需 65℃ 水浴让沉淀完全溶解。RNase A 室温运输和保存, 长期贮藏(>3 个月)建议保存于-20~8℃。

准备事项

- 65℃ 水浴锅
- 酚氯仿(25:24)或氯仿
- 按瓶子标签所示, 用无水乙醇稀释 Buffer GW2, 并于室温保存。
- 按瓶子标签所示, 加入 2 倍体积的无水乙醇稀释 Buffer PBD, 于室温保存。
- 溶解 RNase A (15mg/ml): 加入适量的 Protease Dissolve Buffer 溶解 RNase A 至终浓度为 15mg/ml, 颠倒混匀让 RNase A 充分溶解。RNase A 干粉可在室温下, 但溶解的 RNase A 须保存于 2~8℃。

实验步骤

1. **用液氮把植物/真菌样品研磨成粉末, 转移 50~200mg 新鲜/冻藏样品或 15~50mg 干燥样品至 2ml 离心管中。**

正确使用样品量才能获得理想结果。过量样品会造成柱子堵塞, 而引起产量和纯度下降。由于植物样品 DNA 和代谢物质含量差异很大。初次实验时, 推荐使用 50mg 新鲜或 15mg 干燥样品, 根据实验结果再调整样品用量。试剂盒最大的用量取决于样品类型, 处理常规的经济作物如水稻、玉米、小麦嫩叶等样品时, 样品用量可达到 200mg。处理富含多糖或多酚样品时, 可适当提高 Buffer PTL 用量, 以提高裂解效果。

2. **加入 700 μ l Buffer PTL 至样品中, 立即最高速度涡旋 10-15 秒使样品充分分散。65℃ 水浴 10~15 分钟, 期间混匀 1~3 次。**

处理多酚多糖类样品时, 加入 PVP-40 (干粉) 至 Buffer PTL 中, 终浓度为 2%(W/V), 颠倒混匀使 PVP-40 充分溶解。该混合液可以在室温保存 1 个月。PVP-40 可以结合多酚类物质, 减少多酚类物质对 DNA 的损伤。若处理复杂样品时, 再加入适量的 2-巯基乙醇(自配)至 Buffer PTL 中, 终浓

度为 2%(V/V)，极难提样品可加至 10%(V/V)，以提高裂解液的抗氧化能力。处理常规的经济作物，如水稻、玉米、番茄等无需加入 PVP-40 和 2-巯基乙醇。

3. **加入 700 μ l 氯仿或酚氯仿，涡旋混匀 10 秒。室温下，12,000 \times g 离心 5 分钟。**
处理复杂的样品时，用酚氯仿（25:24）代替氯仿。氯仿属于易制毒管制化学品，可以订购 Buffer BDP 代替氯仿。
4. **转移上清液至新的离心管中，加入 10 μ l RNase A，混匀，室温放置 15 分钟。**
5. **加入 1.5 倍体积的 Buffer PBD 至上清中，涡旋混匀 10 秒。**
Buffer PBD 在使用前须加入 2 倍的无水乙醇进行稀释，按瓶子标签指示进行稀释。若出现明显的沉淀，用移液枪吸打几次打散沉淀团。
6. **把 gDNA 柱装在收集管中，转移一半体积的混合液至柱子中。12,000 \times g 离心 30~60 秒。**
7. **倒弃滤液把柱子装回收集管，把剩余混合液转移至柱子中。12,000 \times g 离心 30~60 秒。**
8. **倒弃滤液把柱子装回收集管，加入 500 μ l Buffer GWP 至柱子中，静置 2 分钟。12,000 \times g 离心 30~60 秒。**
9. **倒弃滤液把柱子装回收集管，加入 500 μ l Buffer GW2(已用无水乙醇稀释)至柱子中。12,000 \times g 离心 30~60 秒。**
Buffer GW2 在使用之前，须按瓶子标签指示加入无水乙醇进行稀释。
10. **倒弃滤液，把柱子套回收集管中。加入 300 μ l Buffer GW2(已用无水乙醇稀释)至柱子。12,000 \times g 离心 2 分钟。**
取出柱子时不要颠倒或侧转，不要让柱子的底部碰到收集管中的液体。若碰到了液体，倒弃废液后，把柱子放回收集管中再离心一次甩干柱子。
11. **将柱子转移至新的 1.5ml 离心管中，加入 50 μ l 预热到 65 $^{\circ}$ C Buffer AE 至柱子的膜中央。室温静置 3 分钟，12,000 \times g 离心 1 分钟。**
12. **再加入 50 μ l 预热至 65 $^{\circ}$ C 的 Buffer AE 至柱子的膜中央。放置 3 分钟。12,000 \times g 离心 1 分钟。**
13. **丢弃 DNA 结合柱，把 DNA 保存于-20 $^{\circ}$ C。**

常见问题

1. 柱子堵塞

- **样品用量太多**：减少样品用量。初次实验时，推荐使用 50mg 新鲜或 15mg 干燥样品，根据实验结果再调整样品用量。
- **富含多糖类样品**：某些植物样品中含有丰富的粘液和高分子多糖，会让裂解液变得非常粘稠，减少样品用量或加大 Buffer PTL 的用量。
- **氯仿抽提不充分**：重新抽提，加入氯仿时一定要剧烈振荡混匀。充分混匀时，溶液变成均一的乳白状。

2. DNA 产量低

- **样品裂解不充分**：用液氮将样品研磨细小的粉末状。加入 Buffer PTL 后，没有让样品充分分散。若涡旋无法让样品充分分散时，可用移液枪吸打几次打散样品。
- **沉淀未充分打散**：加入 Buffer PBD 时，若产生絮状沉淀时，用移液枪吸打多次打散沉淀。
- **样品富含多酚类物质**：加入 PVP-40 和 2-巯基乙醇至 Buffer PTL，以提高裂解液的抗氧化能力。
- **试剂准备有误**：Buffer PBD、Buffer GW1 和 Buffer GW2 都需要按瓶子标签加入正确的乙醇。
- **样品用量太多**：处理某些样品时，减少样品量有利于提高产量。

3. DNA 纯度不达标

- **样品富含多糖类物质**：加入 PVP-40 和 2-巯基乙醇至 Buffer PTL 中，有利于提高纯度。
- **样品用量太多**：减少样品量有利于提高纯度。
- **富含色素的样品**：对于某些富含色素的样品，再用 350 μ l Buffer GW2 洗涤柱子一次，以去除色素，提高 A260/230 的读数。