

目 录

简 介-----	2
原 理-----	2
试剂盒组成-----	3
保质期-----	4
方案 1:植物 DNA 中量抽提-----	7
方案 2:植物 DNA 大量抽提-----	6
常见问题回答-----	8

版本: 2010-01

简介

HiPure Plant DNA Kits 为植物组织 DNA 抽提提供一种快速可靠的方法。试剂盒采用硅胶柱纯化技术和经典的 CTAB/氯仿抽提技术，适合于从各种植物样品(包括常规，多糖和多酚类)中快速提取高纯度的植物 DNA。得到的 DNA 可直接用于 PCR, SSR, AFLP, RAPD 以及 Southern blot 等实验。

试剂盒	Mini Kit	Midi Kit	Maxi Kit
编号	D3161	D3162	D3163
新鲜样品	<100 mg	0.5-1 g	2-5 g
干燥样品	<20 mg	0.1-0.2 g	0.5-1 g
结合能力	100 µg	500 µg	2 mg
柱型	1.5 ml 柱	15 ml 柱	50 ml 柱
样品类型	植物和真菌类样品		

原理

HiPure 硅胶柱是采用高结合力的玻璃纤维滤膜为基质。滤膜在高浓度离子化剂(如盐酸胍或异硫氰酸胍)条件下，可通过氢键和静电等物理作用吸附核酸，而蛋白质或其它杂质不被吸附而去除。吸附了核酸的滤膜经洗涤去除蛋白质和盐，最后可以用低盐缓冲液(如 Buffer TE)或水，洗脱出滤膜上吸附的核酸。得到的核酸纯度高，可直接用于各种下游实验。HiPure Plant DNA Kit 基于硅胶柱纯化方式。样品在含 CTAB 裂解液中匀浆裂解，DNA 释放到裂解液中，用氯仿抽提去除多糖、蛋白质等杂质，得到上清液并加入结合液，转移至柱子中过滤，DNA 被吸附上柱子的膜上，而蛋白质等杂质则不被吸附而去除。柱子经 Buffer GW1 和 Buffer GW2 洗涤去除盐分，最后 DNA 被 Buffer AE (10Mm Tris, pH8.5)洗脱。洗脱的 DNA 可直接用于 PCR、Southern blot、RAPD 等实验。

保质期

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℃。

组 成

HiPure Plant DNA Midi Kit

产品编号	D3162-01	D3162-02	D3162-03
纯化次数	2 次	10 次	50 次
HiPure gDNA Midi Columns	2	10	50
15ml Collection Tubes	2	10	50
Buffer PTL	15 ml	60 ml	270 ml
Buffer PBD*	6 ml	40 ml	140 ml
Buffer GW1*	6.6 ml	22 ml	66 ml
Buffer GW2*	6 ml	20 ml	2 x 50 ml
RNase A	5 mg	10 mg	60 mg
Protease Dissolve Buffer	1.8 ml	1.8 ml	5 ml
Buffer AE	5 ml	15 ml	60 ml
说明书	1	1	1

HiPure Plant DNA Maxi Kit

产品编号	D3163-01	D3163-02	D3163-03
纯化次数	2 次	10 次	50 次
HiPure gDNA Maxi Columns	2	10	50
50ml Collection Tubes	2	10	50
Buffer PTL	35 ml	200 ml	2 x 500 ml
Buffer PBD*	20 ml	100 ml	2 x 110 ml
Buffer GW1*	13 ml	66 ml	3 x 110 ml
Buffer GW2*	20 ml	50 ml	2 x 50 ml
RNase A	5 mg	20 mg	90 mg
Protease Dissolve Buffer	1.8 ml	1.8 ml	15 ml
Buffer AE	5 ml	30 ml	120 ml
说明书	1	1	1

*:使用前，须用乙醇进行稀释。

方案 1. 植物 DNA 中量提取(D3162)

该方案适合于从 0.5-1g 新鲜/冻藏植物样品、或 125-250mg 干燥植物/种子样品中提取高纯度的总 DNA。纯化的 DNA 包括基因组 DNA 和叶绿体 DNA。以下离心都在室温下进行。

准备材料和工具

- 无水乙醇(96-100%)
- 65°C 水浴锅
- 氯仿/异戊醇(24:1)
- 2-巯基乙醇
- (可选) PVP-40
- 按瓶子标签所示, 用无水乙醇稀释 Buffer GW1, 并于室温保存。
- 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, 用无水乙醇稀释 Buffer PBD, 并于室温保存。
- 溶解 RNase A (1.5mg/ml): 加入适量的 Protease Dissolve Buffer 溶解 RNase A 至终浓度为 1.5mg/ml, 颠倒混匀让 RNase A 充分溶解。RNase A 干粉可在室温保存, 但溶解的 RNase A 须保存于 2~8°C。

操作流程:

1. 用液氮把植物样品研磨成细小的粉末。转移 0.5-1g 新鲜样品或 125-250mg 干燥样品至 15ml 离心管中。

正确使用组织用量, 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 和其它代谢物质含量差异很大。初次实验时, 我们推荐使用 500mg 新鲜样品或 125mg 干燥样品, 根据实验结果再调整组织用量。
2. **立即加入 5ml Buffer PTL 和 50 μ l RNase A 至样品中。**立即涡旋使样品充分分散。65°C 水浴 30 分钟, 期间涡旋混匀 3~5 次。

处理多酚多糖类样品时, 加入 PVP-40 (干粉) 至 Buffer PTL 中至终浓度为 2%(W/V), 颠倒混匀使 PVP-40 充分溶解。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 中至终浓度为

1~2%(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、番茄可以无需加入 PVP-40 和 2-巯基乙醇。

3. 加入 **5 ml 氯仿/异戊醇(24:1)**, 颠倒混匀 30~50 次。室温静置 5 分钟。
4. 4,000 x g 离心 15 分钟。小心转移上清液至新的离心管中。
5. 加入 **1.5 倍体积的 Buffer PBD(已用无水乙醇稀释)**至上清液中。颠倒混匀 **15~20 次**。若出现明显的沉淀, 用移液枪吸打几次打散沉淀团。
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。
6. 把 gDNA 中柱装在收集管中。**转移 4ml 混合液至柱子中**, 4,000 x g 离心 3 分钟。
7. 倒弃滤液把柱子装回收集管。把剩余混合液转移至柱子。4,000 x g 离心 3 分钟。重复此步直到所有混合液都转移至柱子中并过滤。
8. 倒弃滤液把柱子装回收集管。**加入 2ml Buffer GW1(已用无水乙醇稀释)**至柱子中, 4,000 x g 离心 3 分钟。
Buffer GW1 在使用之前须用无水乙醇进行稀释。按瓶子标签指示进行稀释。
9. 倒弃滤液把柱子装回收集管。**加入 3ml Buffer GW2(已用无水乙醇稀释)**至柱子中, 4,000 x g 离心 3 分钟。
Buffer GW2 在使用之前须用无水乙醇进行稀释。按瓶子标签指示进行稀释。
10. 倒弃滤液把柱子装回收集管。**加入 3ml Buffer GW2(已用无水乙醇稀释)**至柱子中, 4,000 x g 离心 3 分钟。
11. 倒弃滤液把柱子装回收集管。4,000 x g 离心 15 分钟去除柱子中残留的乙醇。
12. 将柱子转移至新的 15ml 离心管中。**加入 250 μ l 预热到 65 $^{\circ}$ C Buffer AE 至柱子的膜中央**。室温静置 5 分钟。4,000 x g 离心 3 分钟。
13. **再加入 250 μ l 预热到 65 $^{\circ}$ C Buffer AE 至柱子的膜中央**。室温静置 5 分钟。4,000 x g 离心 3 分钟。
14. 丢弃 DNA 结合柱, 把 DNA 保存于 -20 $^{\circ}$ C 或 -80 $^{\circ}$ C。

方案 2. 植物 DNA 大量提取(D3163)

该方案适合于从 2-5g 新鲜/冻藏植物样品、或 0.3-1g 干燥的植物样品，种子提取高纯度的总 DNA。纯化的 DNA 包括基因组 DNA 和叶绿体 DNA。以下离心都在室温下进行。

准备材料和工具

- 无水乙醇(96-100%)
- 灭菌 50ml 离心管和移液枪头
- 中型离心管($\leq 5,000 \times g$)
- 65°C 水浴锅
- 氯仿/异戊醇(24:1)
- 研钵和液氮
- 2-巯基乙醇
- (可选) PVP-40
- 按瓶子标签所示，用无水乙醇稀释 Buffer GW1，并于室温保存。
- 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，用无水乙醇稀释 Buffer PBD，并于室温保存。
- 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 干粉可在室温保存，但溶解的 RNase A 须保存于 2~8°C。

操作流程:

1. 用液氮把植物样品研磨成细小的粉末。转移 2-5g 新鲜样品或 0.3-1g 干燥样品至 50ml 离心管中。
正确使用组织用量，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 和其它代谢物质含量差异很大。初次实验时，我们推荐使用 2.5g 新鲜样品或 500mg 干燥样品，根据实验结果再调整组织用量。
2. 立即加入 18ml Buffer PTL/2-Me 和 100 μ l RNase A 至样品中。立即涡旋使样

品充分分散。65°C 水浴 60 分钟，期间涡旋混匀 3-5 次。

使用前，按 1 ml Buffer PTL 加入 20 μ l 2-巯基乙醇。该混合液可在室温放置 2 周。若植物样品富含多酚类物质，称取一定量的 PVP-40，加到 Buffer PTL1/2-Me 至终浓度为 2%(W/V)，振荡使 PVP-40 充分溶解。PVP-40 可以结合多酚类物质，减少多酚类物质对 DNA 的损伤。Buffer PTL/2-Me/PVP-40 混合液可以在室温放置 2 周。

3. 加入 18 ml 氯仿/异戊醇(24:1)，剧烈涡旋 60 秒混匀。室温静置 5 分钟。
4. 4,000 x g 离心 15 分钟。小心转移上清液至新的离心管中。
5. 加入 1.5 倍体积的 Buffer PBD(已用无水乙醇稀释)至上清液中。涡旋混匀 30 秒。若出现明显的沉淀，用移液枪吸打几次打散沉淀团。
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。
6. 把 gDNA 大量柱装在收集管中。转移混合液(<20ml)至柱子中。4,000 x g 离心 5 分钟。
7. 倒弃滤液把柱子装回收集管。把剩余混合液转移至柱子。4,000 x g 离心 5 分钟。重复此步直到把所有混合液都转移至柱子中过滤完毕。
8. 倒弃滤液把柱子装回收集管。加入 10ml Buffer GW1(已用无水乙醇稀释)至柱子中。4,000 x g 离心 5 分钟。
9. 倒弃滤液把柱子装回收集管。加入 20ml Buffer GW2(已用无水乙醇稀释)至柱子中。4,000 x g 离心 5 分钟。
10. 倒弃滤液把柱子装回收集管。4,000 x g 离心 15 分钟去除柱子中残留的乙醇。
11. 将柱子转移至新的 50ml 离心管中。加入 500 μ l 预热到 65°C Buffer AE 至柱子的膜中央。室温静置 5 分钟。4,000 x g 离心 5 分钟。
12. 再加入 500 μ l 预热到 65°C Buffer AE 至柱子的膜中央。室温静置 5 分钟。4,000 x g 离心 5 分钟。
13. 丢弃 DNA 结合柱，把 DNA 保存于-20°C。

常见问题解答

该列表可能有利于解决提取过程所碰到的问题。此外，Magen 的技术人员也可以随时为您提供服务，若您对试剂盒存在问题或建议，或您在分子生物学碰到问题，都请您联系我们。我们将竭尽全力为您排忧解难。

现象	原因及解决方法
柱子堵塞	
转移上清液时带有太多沉淀	在下一次提取过程中，转移上清液时不要吸到沉淀物。若吸到沉淀物，可把上清液再离心一次。
裂解液非常粘稠	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。减少样品用量或加入 Buffer PTL 的用量。
离心速度太低	提高离心速度
加入氯仿后，混匀不够	在下次制备时，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。
DNA 产量低	
样品匀浆不充分	用液氮将样品研磨细小的粉末状。或延长珠磨仪的研磨时间和速度。
样品裂解不充分	加入 Buffer PTL 后，没有让植物样品充分分散。而涡旋无法让样品充分分散，可用移液枪吸打几次。
不正确的结合条件	计算上清液的体积，加入正确的 Buffer PBD 和无水乙醇。
产生絮状沉淀时，没有打散	当加入 Buffer PBD 和无水乙醇时，有些样品会产生明显的絮状沉淀物，必须用移液枪吸打尽量打散沉淀物。
洗脱效率不够	洗脱时 Buffer AE 预热至 65°C，并加到膜中央，室温放置 3 分钟。Buffer AE 的洗脱体积不够。
Buffer GW2 中乙醇没有加入或加入量不够	按说明书或瓶子标签所示，加入正确的乙醇。
柱子没有空甩	柱子必须空甩 2-3 分钟以去除膜上残留的乙醇。