

## RaPure Plant DNA Mini Kit

### 植物 DNA 快提试剂盒

RaPure Plant DNA Kits 为植物组织 DNA 抽提提供一种安全快速的解决方案。试剂盒基于硅胶柱纯化技术和 CTAB 预处理方式，无需进行耗时的醇类沉淀，整个提取过程只需 30-50 分钟。得到的 DNA 可直接用于 PCR, SSR, AFLP, RAPD, 以及 Southern blot 等实验。

### 产品组份

产品编号	D3187-01	D3187-02	D3187-03	D3187-04
纯化次数	20 次	50 次	250 次	1000 次
HiPure DNA Mini Columns II	20	50	250	4 x 250
2ml Collection Tubes	20	50	250	10 x 100
Buffer PAL	15 ml	40 ml	200 ml	2 x 380 ml
Buffer GWP	15 ml	40 ml	200 ml	2 x 380 ml
Buffer PW1	15 ml	30 ml	140 ml	550 ml
Buffer PW2*	6 ml	10 ml	2 x 50 ml	2 x 100 ml
Buffer AE	5 ml	15 ml	60 ml	120 ml
说明书	1	1	1	1

### 保存条件

本产品室温(15~25℃)可保存 18 个月。低温下，Buffer PAL 可能会有沉淀形成，需 65℃ 水浴让沉淀完全溶解。

## 准备事项

- 无水乙醇(96-100%)
- 65°C水浴锅
- 氯仿/异戊醇(24:1)
- (可选)2-巯基乙醇和 PVP-40
- 按瓶子标签所示，用无水乙醇稀释 Buffer PW2，并于室温保存

## 实验步骤 A

1. **用液氮把植物/真菌样品研磨成粉末，转移 50~150mg 新鲜/冻藏样品或 15~40mg 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。处理富含粘液质丰富的样品时，建议样品用量不要超过 30~50mg(新鲜)。

2. **立即加入 700 $\mu$ l 预热至 65°C Buffer PAL 至样品中，剧烈涡旋使样品充分分散，65°C 水浴 20 分钟，期间混匀 2~3 次。**

处理复杂样品时，加入 2-巯基乙醇(自配)至 Buffer PAL 中，终浓度为 0.1%(V/V)，极难提样品可加至 2%(V/V)，以提高裂解液的抗氧化能力。处理常规的简易经济作物，如水稻、玉米、番茄等可无需加入 2-巯基乙醇。由于 PVP-40 对该方案的产量影响极大，该流程不能加入 PVP。处理极易氧化植物样品，加入 PVP-40 有利于提高产量，按方案 B 进行操作。

3. **加入 700 $\mu$ l 氯仿至样品中，涡旋混匀 15 秒。**

处理富含多酚或淀粉的植物/真菌组织，可在第 3 步前，用酚:氯仿/1:1 进行等体积抽提。

4. **室温下，12,000  $\times$  g 离心 5 分钟，小心转移上清液至新离心管中。**

若需彻底去除 RNA，加入 10 $\mu$ l RNase A 至上清液中，颠倒混匀，室温放置 5~10 分钟。

5. **加入 700 $\mu$ l Buffer GWP 至上清中，颠倒混匀 10~15 次。**

6. **把 DNA 柱装在收集管中，转移一半体积混合液至柱子中。12,000  $\times$  g 离心 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 60 秒。**

8. **倒弃滤液把柱子装回收集管，加入 500 $\mu$ l Buffer PW1 至柱子。12,000  $\times$  g 离心 60 秒。**

9. **倒弃滤液把柱子装回收集管，加入 500 $\mu$ l Buffer PW2 至柱子中。12,000  $\times$  g 离心 60**

秒。

10. (可选)倒弃滤液把柱子装回收集管，加入 500 $\mu$ l Buffer PW2 至柱子中。12,000  $\times$  g 离心 60 秒。
11. 倒弃滤液把柱子装回收集管。12,000  $\times$  g 离心 2 分钟去除柱子中残留的乙醇。
12. 将柱子转移至新的 1.5ml 离心管中，加入 40~75 $\mu$ l 预热到 65 $^{\circ}$ C Buffer AE 至柱子的膜中央。室温静置 2 分钟，12,000  $\times$  g 离心 1 分钟。
13. (可选)再加入 40~75 $\mu$ l 预热至 65 $^{\circ}$ C 的 Buffer AE 至柱子的膜中央。放置 2 分钟。12,000  $\times$  g 离心 1 分钟。
14. 丢弃 DNA 结合柱，把 DNA 保存于-20 $^{\circ}$ C。

## 实验步骤 B

处理极易发生氧化的植物或真菌样品时，加入 PVP-40 至 Buffer PAL 中，终浓度为 2%(W/V)，颠倒使之充分溶解，该混合液室温放置时间不要超过 1 周。使用前，再加入 2-巯基乙醇(自配)至 Buffer PAL 中，终浓度为 0.1%(V/V)。

1. 用液氮把植物/真菌样品研磨成粉末，转移 50~100mg 新鲜/冻藏样品或 15~30mg 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。
2. 立即加入 700 $\mu$ l 预热至 65 $^{\circ}$ C Buffer PAL/PVP-40 至样品中，剧烈涡旋使样品充分分散，65 $^{\circ}$ C 水浴 15~30 分钟，期间混匀 1~3 次。
3. 加入 700 $\mu$ l 氯仿至样品中，涡旋混匀 15 秒。室温下，12,000  $\times$  g 离心 5 分钟。  
处理富含多酚或淀粉的植物/真菌组织，可在第 3 步前，用酚:氯仿/1:1 进行等体积抽提。
4. 小心转移 560 $\mu$ l 上清液至新离心管中，加入 10 $\mu$ l RNase A(自配)至上清，混匀。室温放置 10 分钟消化去除 RNA。
5. 加入 560 $\mu$ l Buffer GWP 和 560 $\mu$ l 无水乙醇至上清中，颠倒混匀 10~15 次。若出现明显的沉淀，用移液枪吸打几次打散沉淀团。
6. 按步骤 A 的第 5~13 步进行操作。

## 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 PAL 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 PAL 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 GWP/乙醇时, 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 PAL, 以提高裂解液的抗氧化能力。
- **试剂准备有误:** Buffer PW2 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 PAL 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 500 $\mu$ l 无水乙醇洗涤柱子一次, 以去除色素, 提高 A260/230 的读数。