

## 植物 DNA 提取试剂盒

(硅胶膜离心柱法)

货号/规格: N1221/24 次, N1222/100 次

### 产品简介

本产品将 CTAB 提取方法与柱式纯化技术相结合, 适合于从各种植物、真菌样品中提取高纯度的 DNA。得到的 DNA 可直接用于 PCR, SSR, AFLP, RAPD, 以及 Southern blot 等实验。试剂盒提供毒性更低的氯仿代替物(Buffer BDP), 并采用无醇的高浓度胍盐介导过滤纯化, 可高效去除样品的多糖多酚等代谢物和 RNA。

### 产品组分

组分	N1221	N1222
Buffer PAL	20 ml	80 ml
Buffer BDP	20 ml	80 ml
Buffer GWP	20 ml	110 ml
Buffer SW2	6 ml	25 ml
Elution Buffer	10 ml	20 ml
DNA 纯化柱	24 个	100 个
收集管	24 个	100 个

\* Buffer SW2 需要自行添加乙醇, 按标签所示加入 4 倍体积的无水乙醇, 充分混匀后再使用, 室温保存。

### 保存条件

本产品室温(15~25°C)可保存 18 个月。低温下 Buffer PAL 可能会析出沉淀, 55°C 温育溶解后颠倒混匀后使用。本产品采用材质为 PET 的试剂瓶, 不能高温高压灭菌和超过 55°C 直接温育。

### 操作步骤

#### A. 常规样品

1. 样品研磨: 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)。

• 扩大样品量: 纯化柱最大结合力为 20 $\mu$ g, 若样品中 DNA 含量较低, 可以扩大 2~3 倍样品用量, 并按比例加入 Buffer PAL 和 Buffer BDP, 然后过柱纯化时多次过柱。

2. 样品裂解: 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 15~30 分钟, 期间混匀 2~3 次。

• 实验前加入  $\beta$ -巯基乙醇至 Buffer PAL 至终浓度为 2%, 可以提高裂解液的抗氧化能力。由于  $\beta$ -巯基乙醇气味较大, 多数样品不需要添加。Buffer PAL 为 CTAB 裂解液, 更多试剂可以自行配制或订购。该步骤不允许加入 PVP-40 至 Buffer PAL 或自配的 CTAB 裂解液。

3. 有机物抽提: 加入 700 $\mu$ l Buffer BDP (或氯仿), 涡旋混匀 15 秒。室温下, 12,000 x g 离心 5 分钟。

• 富含多酚或淀粉的组织样品, 可在第 3 步前, 增加一步酚氯仿进行等体积抽提去除多糖和其它杂质。Buffer BDP 为氯仿代替物, 主要成分为更低毒性的溴氯丙烷。皮肤接触时, 立即脱去污染衣着, 用大量流动清水冲洗, 就医。

4. 调节结合条件 (高盐介导): 转移 600 $\mu$ l 上清液至新离心管中。加入 600 $\mu$ l Buffer GWP, 颠倒混匀 6-8 次。

• 高盐介导: 纯化柱 B10 在胍盐(GWP)条件下, 只吸附 DNA 而不吸附 RNA, 无需 RNA 酶处理, 但柱子最高吸附力只能达到 10 $\mu$ g, 多余 DNA 会随滤液流出。高盐介导能有效去除色素、多糖和蛋白等代谢产物。

• 醇类介导: 若样品中 DNA 含量超过 10 $\mu$ g 时, 可改用乙醇介导来提高产量。转移 600 $\mu$ l 上清液至新离心管中, 加入 10 $\mu$ l RNase A(自配)颠倒混匀, 室温放置 10 分钟。加入 300 $\mu$ l Buffer GWP 和 600 $\mu$ l 无水乙醇, 颠倒混匀 15-30 次, 按第 5 步进行操作。

5. 过柱纯化: 把纯化柱装在收集管中, 转移一半体积混合液至柱子中。10,000 x g 离心 1 分钟。倒弃收集管中的滤液并装回柱子, 把剩余混合液转移至柱子中再离心。

6. 去除蛋白和 RNA: 倒弃滤液把柱子装回收集管, 加入 400 $\mu$ l Buffer GWP, 10,000 x g 离心 1 分钟。

7. 脱盐: 倒弃滤液把柱子装回收集管, 加入 750 $\mu$ l Buffer SW2, 10,000 x g 离心 1 分钟。

• DNA 浓度低于 50ng/ $\mu$ l, 建议把 Buffer SW2 分成两次, 每次 500 $\mu$ l, 可以稳定 A260/230 比值。

8. 倒弃滤液把柱子装回收集管。10,000 x g 离心 1 分钟去除柱子中残留的乙醇。

9. 洗脱: 将柱子转移至新的 1.5ml 离心管中, 加入 50 $\mu$ l 预热到 65°C Elution Buffer 至柱子

的膜中央。室温静置 3 分钟,  $10,000 \times g$  离心 1 分钟。

10. 再洗脱: 再加入  $50\mu\text{l}$  预热至  $65^\circ\text{C}$  的 *Elution Buffer* 柱子的膜中央。放置 3 分钟。 $10,000 \times g$  离心 1 分钟。

11. 丢弃 DNA 结合柱, 把 DNA 保存于  $-20^\circ\text{C}$ 。

## B. 难提取植物样品

处理低核酸含量或难提取样品, 加入 *PVP-40* 和  $\beta$ -巯基乙醇至 *Buffer PAL* 以提高裂解和抗氧化能力。按  $1\text{ml}$  *Buffer PAL* 加入  $50\mu\text{l}$   $40\%$  *PVP-40* (也可以用 *PVP-40* 干粉代替) 和  $20\mu\text{l}$   $\beta$ -巯基乙醇, 该混合液可以在室温保存一个月。

1. 样品研磨和裂解: 用液氮把植物/真菌样品研磨成粉末, 转移适量新鲜/冻藏样品或干燥样品至相应的离心管中, 立即加入预热至  $65^\circ\text{C}$  *Buffer PAL/PVP-40* 混合液, 涡旋使样品充分分散,  $65^\circ\text{C}$  水浴 20 分钟, 期间混匀 2~3 次。

- *Buffer PAL* 用量: 按  $100\text{mg}$  新鲜或  $20\text{mg}$  干燥样品, 加入  $0.7\text{ml}$  *Buffer PAL*。若样品中核酸含量低或需要获得更多 DNA, 样品用量可以提升至  $200\text{-}500\text{mg}$ , 按比例加入 *Buffer PAL*。更多的 *Buffer PAL* 可以自己配制或订购。

2. 有机物抽提: 加入等倍体积 *Buffer BDP* 或氯仿, 涡旋混匀 15 秒。室温下,  $10,000 \times g$  离心 5 分钟。

- 提取富含多酚或淀粉样品, 可在第 2 步前, 增加一步酚氯仿进行等体积抽提去除杂质。*Buffer BDP* 为氯仿代替物, 主要成分为更低毒性的溴氯丙烷。皮肤接触时, 立即脱去污染的衣着, 用大量的流动的清水冲洗, 就医。更多的 *Buffer BDP*, 可以另外订购。若总体积超过  $2\text{ml}$ , 用  $5\text{-}15\text{ml}$  离心管中进行操作, 离心条件改为  $4,000\text{-}5,000 \times g$  离心 15 分钟。

3. 沉淀富集: 转移上清液至新的离心管中, 加入 0.7 倍体积异丙醇, 温和地上下翻转混匀 15~20 次。室温下,  $10,000 \times g$  离心 5 分钟, 小心倒弃所有上清液, 保留沉淀。

- 若总体积超过  $2\text{ml}$ , 用  $5\text{-}15\text{ml}$  离心管中进行操作, 离心条件改为  $4,000\text{-}5,000 \times g$  离心 10 分钟。当 DNA 比较丰富时, 加入异丙醇混匀时, 可以看到 DNA 形成的丝状或絮状沉淀。由于多糖也会形成絮状沉淀, 若这一步产生的沉淀很多, 则表明样品富含多糖, 第二次操作时, 在第 2 步进行酚氯仿等体积抽提。若加入异丙醇混匀时, 无明显的沉淀, 可以于  $-20^\circ\text{C}$  放置过夜后再离心收集 DNA, 以提高 DNA 得率。

4. 溶解: 短暂离心, 吸尽所有残液。加入  $200\mu\text{l}$  *Elution Buffer* 或灭菌水,  $65^\circ\text{C}$  轻轻振荡温育 10-15 分钟溶解 DNA。

- 其它方法获得的粗制基因组 DNA 也可以用该方法进行纯化, 用水将 DNA 补足至  $250\mu\text{l}$ , 按第 6 步

进行操作。

5. 过柱进一步纯化: 加入  $400\mu\text{l}$  *Buffer GWP* 至样品中, 颠倒混匀数次。按实验步骤 A 第 5-11 步进行操作。

- 处理多糖类植物样品, DNA 样品可能存在明显凝块, 于  $50^\circ\text{C}$  再温育 10 分钟, 并移液器反复吸打让凝胶尽量分散, 让 DNA 尽快从凝胶中释放出来。若 DNA 总量超过  $10\mu\text{g}$ , 再加入  $0.2\text{ml}$  异丙醇, 颠倒混匀后按步骤 A 的第 5 步的过柱纯化操作。

## OD 值测量和产量

A260/280 比值: 本产品正常值为 1.70~1.90。

A260/230 比值: 本产品正常值为 1.1~2.4。若核酸浓度低于  $50\text{ng}/\mu\text{l}$  时, 低于这个数据也是可以。

本品仅供科学研究使用。