

## 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	30 ml	110 ml
Elution Buffer	10 ml	20 ml
DNA 纯化柱	24 个	100 个
收集管	24 个	100 个

#### 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, 更多试剂可以自己配制或订购。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  $1.70\text{-}1.90$ 。

*A260/230* 比值: 本产品正常值为  $1.1\text{-}2.4$ 。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。