

## 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。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	250	10 x 100
Buffer PTL	10 ml	40 ml	200 ml	3 x 250 ml
PVP-40	0.2 g	0.8 g	3.6 g	3 x 5 g
Buffer PBD*	5 ml	20 ml	100 ml	2 x 200 ml
Buffer GW1*	6.6 ml	13 ml	66 ml	3 x 110 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°C)可保存 18 个月。低温下，Buffer PTL 可能会有沉淀形成，需 65°C 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°C。

## 准备事项

- 无水乙醇(96-100%)
- 65°C 水浴锅
- 氯仿/异戊醇(24:1)或氯仿
- 2-巯基乙醇
- 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，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°C。

## 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. 立即加入 700 $\mu$ l Buffer PTL 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 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)，极难裂解样品可加至 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 $\mu$ l 氯仿/异戊醇(24:1)或氯仿, 高速涡旋混匀 15 秒。
4. 室温下, 12,000  $\times$  g 离心 5 分钟。
5. 转移 600 $\mu$ l 上清液至新的离心管中, 加入 10 $\mu$ l RNase A 至上清液中, 混匀。室温放置 10 分钟。
6. 加入 1.5 倍体积的 Buffer PBD 至上清中, 涡旋混匀 15 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。
7. 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。
8. 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。
9. 倒弃滤液把柱子装回收集管, 加入 500 $\mu$ l Buffer GW1(已用无水乙醇稀释)至柱子中。12,000  $\times$  g 离心 30~60 秒。
10. 倒弃滤液把柱子装回收集管, 加入 650 $\mu$ 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。复杂样品, 重复第 10 步一次。
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 30~100 $\mu$ 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 30~100 $\mu$ 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。

## 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 $\mu$ l Buffer GW2 洗涤柱子一次，以去除色素，提高 A260/230 的读数。