

## 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
1.5ml 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 (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 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 $\mu$ 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中。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 $\mu$ 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 $\mu$ 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 $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\times$  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  $\times$  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中。4,000  $\times$  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  $\times$  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  $\times$  g 离心 5 分钟。
10. 倒弃滤液把柱子装回收集管。4,000  $\times$  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 $\mu$ 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  $\times$  g 离心 5 分钟。
12. **再加入 500 $\mu$ 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  $\times$  g 离心 5 分钟。
13. 丢弃 DNA 结合柱，把 DNA 保存于-20 $^{\circ}$ 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
<b>柱子堵塞</b>	
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。
<b>DNA 产量低</b>	
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℃，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。