

## HiPure Plant DNA Midi Kit

广谱植物 DNA 中提试剂盒

HiPure Plant DNA Midi Kits 适合于从 0.5-1g 新鲜/冻藏植物真菌样品、或 125-250mg 干燥植物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。试剂盒基于硅胶柱纯化技术和 CTAB/氯仿预处理方式，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	D3162-01	D3162-02	D3162-03
纯化次数	2 次	10 次	50 次
HiPure DNA Midi Columns II	2	10	50
1.5ml Collection Tubes	2	10	50
Buffer PTL	15 ml	60 ml	270 ml
PVP-40	0.3 g	1.2 g	5.4 g
Buffer PBD*	5 ml	30 ml	150 ml
Buffer GWP	8 ml	40 ml	180 ml
Buffer GW2*	6 ml	10 ml	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

Buffer AE 成分：10mM Tris, 0.5mM EDTA, pH9.0

## 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。RNase A 室温运输和保存, 长期贮藏(>3 个月)建议保存于-20~8℃。

## 准备材料和工具

- 无水乙醇(96-100%)
- 65℃ 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 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, 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℃。

## 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. 加入 5ml Buffer PTL 至样品中, 立即最高速度涡旋 10-15 秒使样品充分分散, 65℃ 水浴 15 分钟, 期间涡旋混匀 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%(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 氯仿或酚氯仿(25:24)，涡旋混匀 10 秒，4,000~5,000 × g 离心 15 分钟。**  
处理复杂的样品时，用酚氯仿（25:24）代替氯仿。氯仿属于易制毒管制化学品，可以订购 Buffer BDP 代替氯仿。
4. **转移上清液至新的离心管中，加入 50µl RNase A，混匀，室温放置 15 分钟。**
5. **加入 1.5 倍体积的 Buffer PBD（已加乙醇）至上清液，涡旋混匀 10 秒。**  
若出现明显的絮状沉淀，用移液枪吸打尽量打散沉淀。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 DNA 中量柱装在 15ml 收集管中，转移 4.0ml 混合液至柱子中。4,000 × g 离心 3 分钟。**
7. **倒弃滤液把柱子装回收集管中，转移剩余混合液至柱子中。4,000 × 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 3ml Buffer GWP 至柱子中，静置 2 分钟。4,000 × g 离心 3 分钟。**
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 × 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 无水乙醇至柱子中，4,000 × g 离心 10 分钟。**
11. **倒弃滤液并吸尽收集管中的残液。取出柱子，室温放置 10 分钟干燥柱子和收集管。**
12. **将 DNA 中量柱装在 15ml 离心管中。加入 400µl 预热到 65°C Buffer AE 至柱子的膜中央。室温静置 3 分钟。4,000 × g 离心 3 分钟。**
13. **再加入 300µl 预热到 65°C Buffer AE 至柱子的膜中央。室温静置 3 分钟。4,000 × g 离心 3 分钟。**
14. **丢弃 DNA 结合柱，把 DNA 保存于-20°C 或-80°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 500mg 新鲜或 150mg 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。

### 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 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 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 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。