



北京博凌科为生物科技有限公司

Beijing BLKW Biotechnology Co., Ltd.

Tel: 010-57158602/52872342/80773165 (Fax)

[Http://www.blkwbio.com/](http://www.blkwbio.com/)

E-mail: blkwbio@blkwbio.com

- ◆ 新型大量植物DNA快速提取试剂盒
 - ◆ 目录号 141504
 - ◆ 使用手册
 - ◆ 实验室使用，仅用于体外
-

新型大量植物 DNA 快速提取试剂盒

目录号: 141504

❖ 适用范围:

适用于快速提取植物组织、细胞、真菌基因组DNA

❖ 试剂盒组成、储存、稳定性:

试剂盒组成	保存	10 次 (141504)
RNase A(10mg/ml)	-20℃	500 µl
缓冲液 AP1	室温	50 ml
缓冲液 AP2	室温	20 ml
缓冲液 AP3/E	室温	40 ml <u>第一次使用前按说明加指定量乙醇</u>
漂洗液 WB	室温	25ml x2 <u>第一次使用前按说明加指定量乙醇</u>
洗脱缓冲液 EB	室温	20 ml
吸附柱 AC	室温	10 个
收集管 (50ml)	室温	10 个

本试剂盒在室温储存 12 个月不影响使用效果。

储存事项:

1. 裂解液 AP1、AP3/E 低温时可能出现析出和沉淀, 可以在 65℃ 水浴几分钟帮助重新溶解 (AP3/E 加入乙醇前可加热, 加入乙醇后不可加热), 恢复澄清透明后冷却到室温即可使用。
2. 避免试剂长时间暴露于空气中产生挥发、氧化、pH 值变化, 各溶液使用后应及时盖紧盖子。

❖ 产品介绍:

该试剂盒采用 DNA 吸附柱和新型独特的溶液系统, 适合于从含酚类、多糖类和酶抑制物的植物样品中快速简单地提取基因组 DNA。可在 1 小时左右完成一个或多个 1g 新鲜或 200mg 干燥的植物样品 DNA 的纯化工作。提取过程不需要用到有毒的酚氯仿等有机物抽提, 也不需要用到耗时的异丙醇或乙醇沉淀, 并能快速高效地去除多糖类、酚类和酶抑制物等杂质, 纯化的 DNA 可直接用于 PCR、酶切和杂交等实验。

新鲜或干燥的植物组织(细胞)磨碎后经裂解液裂解; 蛋白质、多糖、细胞残片被沉淀去除; 然后基因组 DNA 在高离子盐状态下选择性吸附于离心柱内硅基质膜, 再通过一系列快速的漂洗—离心的步骤, 进一步将多糖, 多酚和细胞代谢物, 蛋白等杂质去除, 最后低盐的洗脱缓冲液将纯净基因组 DNA 从硅基质膜上洗脱。

❖ 产品特点:

1. 离心吸附柱内硅基质膜全部采用进口特制吸附膜, 柱与柱之间吸附量差异极小, 可重复性好。克服了国产试剂盒膜质量不稳定的弊端。
2. 不需要使用有毒的苯酚等试剂, 也不需要乙醇沉淀等步骤。
3. 快速, 简捷, 单个样品操作一般可在 1 小时内完成。
4. 数种去多糖、多酚成份和多次柱漂洗确保高纯度, OD260/OD280 典型的比值达 1.7~1.9, 可直接用于 PCR, Southern-blot 和各种酶切反应。

❖ 注意事项:

1. 开始实验前将需要的水浴先预热到 65℃ 备用。
2. 缓冲液 AP3/E 中含有刺激性化合物, 操作时要戴乳胶手套, **避免沾染皮肤, 眼睛和衣服。若沾染皮肤、眼睛时, 要用大量清水或者生理盐水冲洗。**
3. 不同来源的植物组织材料中提取 DNA 的量会有差异, 一般 1g 新鲜组织典型产量

可达30-260 μ g。

4. **洗脱液 EB 不含有螯合剂 EDTA**，不影响下游酶切、连接等反应。也可以使用水洗脱，但应该确保 pH 大于 7.5，pH 过低影响洗脱效率。用水洗脱 DNA 应该保存在 -20℃。DNA 如果需要长期保存，可以用 TE 缓冲液洗脱（10mM Tris-HCl，1mM EDTA，pH 8.0），但是 EDTA 可能影响下游酶切反应，使用时可以适当稀释。

❖ **操作步骤：**（实验前请先阅读注意事项）

提示：

⇒ 第一次使用前请先在漂洗液 WB 中加入指定量无水乙醇，充分混匀，加入后请及时在方框打钩标记已加入乙醇，以免多次加入！

⇒ 第一次使用前请先在缓冲液 AP3/E 中加入指定量无水乙醇！

⇒ 将缓冲液 AP1 在 65℃ 水浴预热。

1. 取适量植物组织（最大处理量不超过新鲜组织 1g 或干重组织 200 mg）在研钵中加入液氮充分碾磨成细粉。
2. 转移细粉到一个 15ml 离心管，不要解冻，加入 5ml 缓冲液 AP1（已经 65℃ 预热）和 40 μ l RNase A(10 mg/ml)，旋涡振荡，充分混匀帮助裂解。

如果组织裂解困难，可根据需要加一个轻柔匀浆 10 秒的步骤帮助裂解。大多数情况下不需要离心去除未完全裂解的组织，因为后面有一个离心去除的步骤。

可选：多糖含量特别高的时候可以在 AP1 加入 2%PVP40, 000；多酚含量特别高的时候可以在 AP1 中加入 0.2% beta 巯基乙醇。也可两者同时加入。

3. 65℃ 水浴 10-15 分钟，在水浴过程中颠倒离心管 2-3 次，混合样品。
4. 加入 1.8ml 缓冲液 AP2，充分混匀，冰上放置 10 分钟，9,000 x g 室温离心 10 分钟，小心吸取上清到一个新的 50ml 离心管，注意不要吸到界面物质。

如果没有高速离心机，也可以 4,000-5,000 x g 离心，适当延长时间即可。

5. 计算上清量，加入 1.5 倍体积的 AP3/E（请先检查是否已加入无水乙醇!），立即涡旋振荡混匀。

加入 AP3/E 可能会出现絮状沉淀，但不影响 DNA 提取。注意将 AP3/E 直接加入到上清并立即涡旋振荡混匀。

6. 将上一步所得混合物（包括可能出现的沉淀）加入一个吸附柱 AC 中，（吸附柱放入收集管中）3,000-5,000 x g 离心 5 分钟，倒掉收集管中的废液。
7. 加入 10ml 漂洗液 WB（请先检查是否已加入无水乙醇!），3,000-5,000 x g 离心 4 分钟，弃掉废液。
8. 加入 10ml 漂洗液 WB（请先检查是否已加入无水乙醇!），3,000-5,000 x g 离心 3 分钟，弃掉废液。
9. 将吸附柱 AC 放回空收集管中，最高速（最好大于 9,000 x g，如果离心机转速低，需要相应延长离心时间）离心 10 分钟以干燥膜基质残留乙醇，用枪头吸除内圈压环和柱壁之间可能残留的乙醇，室温或者烘箱晾干几分钟。
10. 取出吸附柱 AC，放入一个干净的离心管中，在**吸附膜的中间部位**加 1-2ml 洗脱缓冲液 EB（洗脱缓冲液可事先在 65-70℃ 水浴中预热），室温放置 5 分钟，3,000-5,000 x g 离心 3 分钟，得到 DNA。此外将得到的溶液重新加入吸附柱中，室温放置 2 分钟后再洗脱一遍，可以提高浓度和产量。

洗脱体积越大，洗脱效率越高，如果预计和需要产量高，可增大洗脱体积，如果需要 DNA 浓度较高，可以适当减少洗脱体积，但是最小体积不应少于 500μl，体积过小降低 DNA 洗脱效率，减少 DNA 产量。

11. DNA 可以存放在 2-8℃，如果要长时间存放，可以放置在一 20℃。

❖ 问题与解决方法

问题	评论与建议
DNA 产量低	*处理材料过量或者裂解不完全-建议：使用适量的起始材料，充分研磨或者匀浆 *结合条件不恰当-建议：步骤 5 精确估计上清量，加入 1.5 倍体积 AP3/E 量要准确
RNA 残留	*植物 RNA 含量太丰富-建议：提高 RNase A 处理浓度
未提取到 DNA	*漂洗液 WB 中忘记加无水乙醇-建议：第一次实验时，在漂洗液 WB 中加入指定量无水乙醇。
离心柱堵塞	*研磨裂解不充分，团块多；裂解物太粘稠；离心力太小-建议：参见步骤 2，加一个离心步骤去除；减低起始材料量，不要处理过量，加大离心力
洗脱下来的 DNA 溶液带颜色或者膜上有明显的色素残留	*漂洗次数不够-建议：步骤 8 完成后，加 10ml 乙醇再漂洗一遍 *起始材料太多过量-建议：减少起始处理材料，不要过量
洗脱下来的 DNA 产量低	*离心柱残留有较多乙醇或者底部不慎沾有乙醇-建议：确保做了步骤 9，否则残留乙醇会影响洗脱效率。 *使用了水或者其它非最佳液体代替洗脱缓冲液-建议：仔细阅读步骤 10 和注意事项 4 和只使用洗脱缓冲液 EB 洗脱。 *洗脱缓冲液量偏低-建议：使用 2ml 洗脱缓冲液洗脱
A ₂₆₀ 吸光值异常偏高	*一些硅基质膜成分一起洗脱下来，干扰了吸光值-建议：将洗脱的基因组 DNA 溶液 13,000rpm 再离心一分钟，小心取上清使用。
DNA 下游酶切不能切开或者酶切不完全	*一些硅基质膜成分一起洗脱下来，抑制了酶切反应-建议：将洗脱的基因组 DNA 溶液 13,000rpm 再离心一分钟，小心取上清使用。 *离心柱残留有较多乙醇或者底部不慎沾有乙醇抑制了酶切反应-建议：确保做了步骤 9，然后空气中晾几分钟，让残留乙醇挥发。