

植物/真菌 DNA 试剂盒说明书

产品组成

植物/真菌 DNA 试剂盒 Cat. No.	5 次样品 3200005	50 次制备 3200050	250 次制备 3200250
核酸纯化柱	5 个	50 个	250 个
2 ml 收集管	5 个	50 个	250 个
β -巯基乙醇	20 μ l	200 μ l	1 ml
Buffer PD	6 ml	55 ml	260 ml
Buffer EX	5 ml	45 ml	225 ml
Buffer GP	4 ml	32 ml	160 ml
Buffer WA（浓缩液）	1.9 ml	12 ml	60 ml
Buffer WB（浓缩液）	1.5 ml	10 ml	50 ml
Buffer TE	1.2 ml	12 ml	60 ml
说明书	1 份	1 份	1 份

产品储存

产品储存于常温（0~30℃），可在两年内保持使用性能无明显变化。

技术支持

杭州新景生物试剂开发有限公司研发部：e-mail: technical@simgen.cn, 电话：400-0099-857。

产品介绍

本产品适合从 100~500 mg 高多糖多酚的新鲜植物组织或真菌（或者 20~50 mg 干燥的植物组织）中分离纯化总 DNA。样本加入裂解液研磨后释放基因组 DNA，再经 Buffer EX 抽提沉淀植物组织的蛋白及多糖等杂质。将含有 DNA 的上清液加入核酸纯化柱后，DNA 结合在核酸纯化柱上，残留的蛋白与 PCR 抑制物则被过滤除去，DNA 经 Buffer WA 和 Buffer WB 洗涤后，用 Buffer TE 洗脱，即可用于各种分子生物学实验。

用户需自备的试剂与物品

1. 无水乙醇，可能需要 RNase A（50 mg/ml，Simgen Cat. No. 8001001）
2. 液氮与研钵
3. 2 ml 离心管、1.5 ml 离心管、移液器及吸头
4. 乳胶手套、一次性口罩等防护用品和纸巾
5. 台式小量离心机（可配离心 1.5 ml 离心管和 2 ml 离心管的转子）
6. 水浴锅和旋涡振荡器

使用前准备

1. 如果离心机有制冷功能，请将温度设置到 25℃。
2. 将水浴锅温度设置到 65℃，并将 Buffer PD 和 Buffer TE 温育至 65℃。
注意：当室温低于 15℃时，Buffer PD 可能会有不溶物析出，温育后请仔细观察不溶物是否完全溶解，并颠倒混匀后再使用。
3. 根据试剂瓶标签上的指示在 Buffer WA 和 Buffer WB 中加入无水乙醇，并在标签的方框中打勾做好“乙醇已加”的标记。

从植物中分离纯化 DNA 的操作步骤：

1. 将 100~500 mg 的新鲜植物组织或 20~50 mg 干燥的植物组织（剪碎的叶片/花/茎/根/种子均可），置于研钵或者匀浆器中，加入 100~200 μ l 65°C 预热的 Buffer PD 和 2 μ l β -巯基乙醇，用力研磨至匀浆状。
 - * 对于纤维含量比较高的组织，应取最大组织用量（500 mg 新鲜组织或 50 mg 干燥组织），并添加液氮将组织研磨成粉末状后再按步骤 1 操作，否则会严重影响 DNA 的回收率。
2. 研磨充分后加入 800~900 μ l 65°C 预热的 Buffer PD（与之前所加的 Buffer PD 体积总和是 1 ml），继续研磨 1 分钟，使组织完全裂解。
3. 转移 800 μ l 裂解产物至用户自备的 2 ml 离心管中，盖上管盖，65°C 水浴 30 分钟。水浴期间每隔 5~10 分钟翻转离心管数次以帮助 DNA 的释放。
 - * 对于葡萄等纤维比较多的组织可适当延长时间至 1 小时。
 - * 如果从新鲜获取的样本中提取 DNA，可能会将组织中的部分 RNA 一起分离纯化出来，但是 RNA 的存在并不影响 PCR 相关的实验。如果要彻底除去 RNA，可在本步骤中补加 5 μ l RNase A（50 mg/ml，Simgen Cat. No. 8001001，用户自备）。
4. 加入 800 μ l Buffer EX，盖上管盖，用力上下摇晃混合直至形成均一的乳油液状，12000 rpm 离心 5 分钟。
 - * 离心后溶液会分成三层，上层应为清澈透明溶液，若上层液体出现浑浊或者顶部有较多色素残留，可能是没有混合均匀导致，需重新用力摇晃混合，再 12000 rpm 离心 5 分钟。
5. 小心吸取 500 μ l 上清液到一个新的 1.5 ml 离心管中，加入 250 μ l Buffer GP，盖上管盖，上下颠倒混合均匀。
 - * 小心缓慢地吸取上清液，宁可少吸取也不要吸到中间相。由于样本种类和用量的不同，上清液体积会在 500~600 μ l 之间波动。如果想要提高 DNA 产量，可以增加吸取的上清液体积，然后加入 0.5 倍上清液体积的 Buffer GP，混合均匀，并在后续步骤 6 中分两次将混合液滤过核酸纯化柱。
 - * 如果是从衰老的或者陈旧的植物组织（冷冻样本或烘干的中药制剂等）中提取 DNA，由于样本中的 DNA 可能有严重的降解，应加入与上清液等体积的 Buffer GP，以提高小片段 DNA 的回收效率，并在后续步骤 6 中分两次将混合液滤过核酸纯化柱。
6. 将步骤 5 中的混合液全部加入到核酸纯化柱中（核酸纯化柱置于 2 ml 收集管中），盖上管盖，12000 rpm 离心 30 秒。
 - * 滤液无须彻底弃尽，如果要避免黏附在收集管管口的滤液对离心机的污染，可将 2 ml 收集管在纸巾上倒扣拍击一次。
7. 弃 2 ml 收集管中的滤液，将核酸纯化柱置回到 2 ml 收集管中，在核酸纯化柱中加入 500 μ l Buffer WA，盖上管盖，12000 rpm 离心 30 秒。
 - * 确认在 Buffer WA 中已经加入无水乙醇。
8. 弃 2 ml 收集管中的滤液，将核酸纯化柱置回到 2 ml 收集管中，在核酸纯化柱中加入 600 μ l Buffer WB，盖上管盖，12000 rpm 离心 30 秒。
 - * 确认在 Buffer WB 中已经加入无水乙醇。
9. 弃 2 ml 收集管中的滤液，将核酸纯化柱置回到 2 ml 收集管中，14000 rpm 离心 1 分钟。
 - * 如果离心机的离心速度达不到 14000 rpm，则用最高速离心 2 分钟。
 - * 请勿省略该步骤，否则可能因所纯化的核酸中混有乙醇而影响后续的实验效果。
10. 弃 2 ml 收集管，将核酸纯化柱置于一个洁净的 1.5 ml 离心管中，在纯化柱中加入 100~200 μ l 65°C 预热的 Buffer TE，盖上管盖，室温静置 2 分钟，12000 rpm 离心 30 秒。
 - * 如果离心机没有防泄漏的盖子，请将离心条件改为 8000 rpm 离心 1 分钟，以免管盖脱落而损伤离心机。
11. 弃纯化柱，洗脱的 DNA 可立即用于各种分子生物学实验；或者将 DNA 储存于 -20°C 备用。

从真菌中分离纯化 DNA 的操作步骤：

1. 称取约 300~500 mg 真菌于研钵中，加液氮浸没菌体，研磨成细小颗粒状，待液氮蒸发后再将菌体颗粒快速研磨至粉末状。加入 1 ml 65°C 预热的 Buffer PD 和 2 μ l β -巯基乙醇，继续研磨 1 分钟，使菌体完全裂解。
 - * 菌体研磨过程中应及时补加液氮，避免菌体颗粒因融化而难以充分研磨。
 - * 如果真菌菌丝达不到 300 mg（比如霉菌菌落），则将整个菌落刮下进行提取。
 - * 酵母、霉菌等非大型真菌类样本可以使用真菌样品裂解管（Simgen, Cat. No.: C-001-2，用户自备）进行研磨：称取约 300~500 mg 真菌加入真菌样品裂解管，加入 1 ml 65°C 预热的 Buffer PD 和 2 μ l β -巯基乙醇，盖上管盖，将样品裂解管放入样品匀质仪中处理，或者在旋涡振荡器上旋涡振荡 5-15 分钟。
2. 转移 800 μ l 裂解产物至用户自备的 2 ml 离心管中，盖上管盖，65°C 水浴 30 分钟。水浴期间每隔 5~10 分钟翻转离心管数次以帮助 DNA 的释放。
 - * 如果从新鲜获取的样本中提取 DNA，通常会将真菌中的 RNA（特别是酵母等 RNA 含量高的真菌）一起分离纯化出来，但是 RNA 的存在并不影响 PCR 相关的实验。如果要彻底除去 RNA，可在本步骤中补加 5 μ l RNase A（50 mg/ml，Simgen Cat. No. 8001001，用户自备）。
3. 加入 800 μ l Buffer EX，盖上管盖，用力上下摇晃混合直至形成均一的乳油液状，12000 rpm 离心 5 分钟。
 - * 离心后溶液会分成三层，上层应为清澈透明溶液，若上层液体出现浑浊或者顶部有较多色素残留，可能是没有混合均匀导致，需重新用力摇晃混合，再 12000 rpm 离心 5 分钟。
4. 小心吸取 500 μ l 上清液到一个新的 1.5 ml 离心管中，加入 250 μ l Buffer GP，盖上管盖，上下颠倒混合均匀。
 - * 小心缓慢地吸取上清液，宁可少吸取也不要吸到中间相。由于样本种类和用量的不同，上清液体积会在 500~600 μ l 之间波动。如果想要提高 DNA 产量，可以增加吸取的上清液体积，然后加入 0.5 倍上清液体积的 Buffer GP，混合均匀，并在后续步骤 6 中分两次将混合液滤过核酸纯化柱。
 - * 如果是从冷冻的样本中提取 DNA，由于样本中的 DNA 可能有严重的降解，应加入与上清液等体积的 Buffer GP，以提高小片段 DNA 的回收效率，并在后续步骤 6 中分两次将混合液滤过核酸纯化柱。
5. 将步骤 4 中的混合液全部加入到核酸纯化柱中（核酸纯化柱置于 2 ml 收集管中），盖上管盖，12000 rpm 离心 30 秒。
 - * 滤液无须彻底弃尽，如果要避免黏附在收集管管口的滤液对离心机的污染，可将 2 ml 收集管在纸巾上倒扣拍击一次。
6. 弃 2 ml 收集管中的滤液，将核酸纯化柱置回到 2 ml 收集管中，在核酸纯化柱中加入 500 μ l Buffer WA，盖上管盖，12000 rpm 离心 30 秒。
 - * 确认在 Buffer WA 中已经加入无水乙醇。
7. 弃 2 ml 收集管中的滤液，将核酸纯化柱置回到 2 ml 收集管中，在核酸纯化柱中加入 600 μ l Buffer WB，盖上管盖，12000 rpm 离心 30 秒。
 - * 确认在 Buffer WB 中已经加入无水乙醇。
8. 弃 2 ml 收集管中的滤液，将核酸纯化柱置回到 2 ml 收集管中，14000 rpm 离心 1 分钟。
 - * 如果离心机的离心速度达不到 14000 rpm，则用最高速离心 2 分钟。
 - * 请勿省略该步骤，否则可能因所纯化的核酸中混有乙醇而影响后续的实验效果。
9. 弃 2 ml 收集管，将核酸纯化柱置于一个洁净的 1.5 ml 离心管中，在纯化柱中加入 100~200 μ l 65°C 预热的 Buffer TE，盖上管盖，室温静置 2 分钟，12000 rpm 离心 30 秒。
 - * 如果离心机没有防泄漏的盖子，请将离心条件改为 8000 rpm 离心 1 分钟，以免管盖脱落而损伤离心机。
10. 弃纯化柱，洗脱的 DNA 可立即用于各种分子生物学实验；或者将 DNA 储存于 -20°C 备用。