

植物/真菌 DNA 试剂盒说明书

产品组成

植物/真菌 DNA 试剂盒	5 次样品	50 次制备	250 次制备
Cat. No.	3200005	3200050	3200250
核酸纯化柱	5 个	50 个	250 个
2 ml 离心管	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

试剂盒如果储存于常温（0~30℃），可在两年内保持使用性能无明显变化；如果将产品储存于 2~8℃，可延长产品的有效期至两年以上（2~8℃储存的产品使用前应先恢复到室温后再使用）。

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。经液氮冷冻后研磨破碎细胞，加入裂解液释放基因组 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 储存液（Simgen Cat. No. 8001001）
2. 液氮与研钵
3. 2 ml 离心管、1.5 ml 离心管与移液器及吸头
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. 旋涡振荡器
7. 水浴锅

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℃。
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 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℃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，应加大组织用量，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℃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，将离心管置于 65℃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 储存液（50 mg/ml，Simgen Cat. No. 8001001，本试剂盒不提供）。
4. 加入 800 μ l Buffer EX，用力混合均匀，12000 rpm，离心 5 分钟。
5. 小心吸取上清，转入一个新的 1.5 ml 管中（这时体积大概有 600 μ l）。
6. 在上清中加入等体积的 Buffer GP，混合均匀。
7. 吸取一半体积步骤 6 中的混合液（约 600 μ l）加入到核酸纯化柱中（核酸纯化柱置于 2 ml 离心管中），盖上管盖，12000 rpm 离心 30 秒。
8. 弃 2 ml 离心管中的滤液，将核酸纯化柱置回到 2 ml 离心管中，将步骤 6 中剩余的混合液全部加入到纯化柱中，盖上管盖，12000 rpm 离心 30 秒。
 - * 滤液无须彻底弃尽，如果要避免粘附在离心管管口的滤液对离心机的污染，可将 2 ml 离心管在纸巾上倒扣拍击一次。
9. 弃 2 ml 离心管中的滤液，将核酸纯化柱置回到 2 ml 离心管中，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。
10. 弃 2 ml 离心管中的滤液，将核酸纯化柱置回到 2 ml 离心管中，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。
11. 弃 2 ml 离心管中的滤液，将核酸纯化柱置回到 2 ml 离心管中，盖上管盖，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。
12. 弃 2 ml 离心管，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℃预热的 Buffer TE，盖上管盖，室温静置 2 分钟，12000 rpm 离心 1 分钟。
 - * 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。
13. 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℃备用。

从真菌中分离纯化 DNA 操作步骤：

1. 在液氮浸没样本的条件下先将约 300~500 mg 真菌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。
 - * 真菌细胞壁极其坚韧，必须添加液氮才能将其研磨至粉末状，达到充分破坏细胞壁的目的，否则将严重影响最终DNA的回收效率。
 - * 组织研磨过程中应及时补加液氮，避免组织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，放入研钵中加液氮后将菌体研磨至粉末状。
2. 加入 1 ml 65℃预热的 Buffer PD，2 μl β-巯基乙醇继续研磨 1 分钟，使菌体完全裂解。
3. 转移 800 μl 裂解产物至用户自备的 2 ml 离心管中，将离心管置于 65℃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 μl RNase A储存液（50 mg/ml，Simgen Cat. No. 8001001，本试剂盒不提供）。
4. 加入 800 μl Buffer EX，用力混合均匀，12000 rpm 离心 5 分钟。
5. 小心吸取上清，转入一个新的 1.5 ml 管中（这时体积大概有 600 μl）。
6. 在上清中加入等体积的 Buffer GP，混合均匀。
7. 吸取一半体积步骤 6 中的混合液（约 600 μl）加入到核酸纯化柱中（核酸纯化柱置于 2 ml 离心管中），盖上管盖，12000 rpm 离心 30 秒。
8. 弃 2 ml 离心管中的滤液，将核酸纯化柱置回到 2 ml 离心管中，将步骤 6 中剩余的混合液全部加入到纯化柱中，盖上管盖，12000 rpm 离心 30 秒。
 - * 滤液无须彻底弃尽，如果要避免粘附在离心管管口的滤液对离心机的污染，可将 2 ml 离心管在纸巾上倒扣拍击一次。
9. 弃 2 ml 离心管中的滤液，将核酸纯化柱置回到 2 ml 离心管中，在核酸纯化柱中加入 500 μl 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。
10. 弃 2 ml 离心管中的滤液，将核酸纯化柱置回到 2 ml 离心管中，在核酸纯化柱中加入 600 μl 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。
11. 弃 2 ml 离心管中的滤液，将核酸纯化柱置回到 2 ml 离心管中，盖上管盖，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。
12. 弃 2 ml 离心管，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 μl 65℃预热的 Buffer TE，盖上管盖，室温静置 2 分钟，12000 rpm 离心 1 分钟。
 - * 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。
13. 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℃备用。