



## **iPure 植物组织 gDNA 提取试剂盒**

### **( 离心柱型 )**

产品编号	规格
K318-01	100 次
K318-02	200 次

### **产品简介**

本试剂盒采用可以特异性结合 DNA 的离心柱和独特的缓冲液系统，提取多种植物细胞中的基因组 DNA。离心柱中采用的硅基质材料为本公司特有新型材料，能够高效、专一吸附 DNA，可最大限度去除杂质蛋白及细胞中其他有机化合物。提取的植物基因组 DNA 片段大，纯度高，质量稳定可靠。

## 一、试剂盒组成、储存条件

试剂盒组成	保存	K318-01	K318-02
裂解液 (Buffer APL)	室温	60mL/瓶×1 瓶	120 mL /瓶×1
洗液 1(wash1)	室温	36 mL/瓶×1 瓶	72 mL/瓶×1 瓶
洗液 2 (wash2)	室温	18 mL/瓶×1 瓶	36mL/瓶×1 瓶
Elution Buffer	室温	5mL /瓶×1 瓶	10 mL /瓶×1 瓶
吸附柱 C1	室温	100 个	200 个
2mL 收集管	室温	100 个	200 个
说明书	室温	1 份	1 份

本试剂盒室温下保存 12 个月不影响使用效果。低温条件下保存时，若裂解液 ( Buffer APL ) 产生沉淀，请先将裂解液 ( Buffer APL ) 室温 ( 20-30℃ ) 条件下放置一段时间，必要时可放 37℃水浴中温浴 10 min，以溶解沉淀。

## 二、实验前准备

- 65℃水浴锅、离心机
- 无水乙醇、异丙醇、Rnase A ( 另购：货号 F801-s )
- 液氮 及样品碾磨设备 ( 组织碾磨仪、研钵等设备 )
- 使用前，请按下表准确加入 98-100%的乙醇。

	100T	100T
洗液 1 ( wash1 )	36ml	72ml
乙醇	24ml	48ml

	100T	200T
洗液 2 ( wash2 )	18ml	36ml
乙醇	42ml	84ml

### 三、操作步骤 A (离心法)

使用前请先在洗液 1 (wash1) 和洗液 2 (wash2) 中加入无水乙醇, 加入体积请参照瓶上的标签。

1. 用液氮或其它工具将植物样品研磨成粉末。转移 50mg 粉末至 1.5mL 离心管。

(若是易糊化的样品(植物的种子), 请转移 20-30mg 的粉末至 1.5mL 或 2mL 的无 RNase&DNase 的离心管中)

2. 立即加入 600 $\mu$ l 裂解液(Buffer APL) 并剧烈涡旋打散样品; 若后续实验需要去除 RNA 的, 请加入 50 $\mu$ l Rnase A (10mg/ml)。

(若样品在裂解过程中糊化, 请增加裂解液 APL 的用量, 混匀后继续裂解, 本试剂盒不含 Rnase A, 可购买货号: F801-S)

3. 65 $^{\circ}$ C 水浴 30min 后, 12000rpm 离心 2min, 收集上清(通常 450-550  $\mu$ l) 转移至干净的离心管(未提供)。加入等体积的无水乙醇, 用移液器吹吸混合均匀。

(若样品糊化, 请延长离心时间, 以确保能够将膨化的样品沉淀, 延长裂解时间可以提高样品核酸回收率、种子样品的上清尽可能控制在 300 $\mu$  l, 如果膨化样品, 导致上清不够, 请加入适量裂解液 APL 涡旋后, 再次超速离心收集上清)

4. 将制备的混合物转移至吸附柱 C1 中, 将吸附柱 C1 12000 $\times$ g (~11000 rpm) 离心 1 分钟。弃掉流穿液, 并将吸附柱 C1 重新装入收集管中。

(此步骤是将核酸吸附到硅胶膜上, 蛋白、多糖、酚等其他成分通过离心弃掉, 此步骤将混合液体转移到吸附柱 C1 后, 放置 2min, 能够确保液体浸透硅胶膜, 提核酸高回收率)

5. 向吸附柱 C1 中加入 600  $\mu$ l 洗液 1 (wash1) (确保其中已加入乙醇)。12000 $\times$ g (~11000 rpm) 离心 1 分钟。弃掉流穿液; 将吸附柱 C1 置于收集管中。

(此步骤是为了漂洗蛋白, 如果蛋白含量高的样品, 请增加多一次该步骤的漂洗)

6. 向吸附柱 C1 中加入 600  $\mu$ l 无水乙醇。12000 $\times$ g (~11000 rpm) 离心 1 分钟。弃掉流穿液; 将吸附柱 C1 置于收集管中。

(若该植物色素丰富, 可以使用无水乙醇漂洗掉多余的色素, 其他不含叶绿素的样品可以省略该步骤, 直接进行第 7 步)

7. 向吸附柱 C1 中加入 600  $\mu$ l 洗液 2 (wash2) (确保其中已加入乙醇)。12000 $\times$ g (~11000 rpm) 离心 1 分钟。弃掉流穿液; 将吸附柱 C1 置于收集管中。

(若使用 Nano-drop 紫外分光光度法检测核酸, OD260/230 偏低, 可增加第 7 步, 或者用超纯水配置 70% 无水乙醇来漂洗过多的盐粒子)

8. 之后将吸附柱 C1 以最大速度  $\geq$ 20000 $\times$ g ( $\geq$ 14000 rpm) 重新离心 1 分钟。弃掉含有流穿液的收集管, 将吸附柱 C1 转移到 1.5 mL RNase-free 的离心管中。

(此步骤是为了将膜柱上的乙醇甩干, 避免乙醇对后续的 PCR 扩增产生影响, 如果您的离心机速度偏低, 可以延长离心时间或打开管盖室温挥发, 让乙醇挥发)

9. 向吸附柱 C1 的膜中心加入 50  $\mu$ l 不含核酸酶的水或 Elution buffer 以洗脱 DNA, 12000 $\times$ g (~11000 rpm) 离心 1 分钟。(注: 若预期 DNA 产量超过 30  $\mu$ g, 请重复一次洗脱步骤。)

(此步骤是将核酸从柱子上洗脱下来, 您可以将洗脱液预加热至 65 $^{\circ}$ C, 加入到膜上后室温放置 2min, 使硅胶膜尽可能的湿润, 保证 DNA 的洗脱效率)

10. 弃掉吸附柱 C1。将提取的 DNA 立即用于下游实验或贮存于 -20 $^{\circ}$ C。

(洗脱缓冲液体积不应少于 50  $\mu$ l, 体积过小影响回收效率。洗脱液的 pH 值对于洗脱效率有很大影响。若用 ddH<sub>2</sub>O 做洗脱液应保证其 pH 值在 7.0-8.5 范围内, pH 值低于 7.0 会降低洗脱效率; 且 DNA 产物应保存在 -20 $^{\circ}$ C, 以防 DNA 降解。为增加基因组 DNA 的得率, 可将离心得到的溶液再加入离心柱中, 室温放置 2 min, 12,000 rpm (~13,400 $\times$ g) 离心 2 min。)

## 五、操作步骤 B (负压法)

步骤 1-4 同离心法。

5. 将离心柱连到负压装置（如真空抽滤盒）上，将第4步获得的溶液转移到离心柱中，开启并调节负压至800mba，缓慢吸走液体。
6. 向离心柱依次加入600 $\mu$ l洗液1(Wash 1)、600 $\mu$ l 无水乙醇、600 $\mu$ l洗液2(Wash 2)，使用负压装置使得液体通过离心柱。
7. 干抽2min，使得离心柱上的乙醇挥发完全，然后关掉负压装置；
8. 将离心柱放置到新的1.5 mL收集管上，向离心柱中央加入50~100 $\mu$ l的Elution Buffer，盖好盖子，室温放置3 min。
9. 12000 rpm离心2 min，将所得的核酸放置-20 $^{\circ}$ C保存或立即使用。

## 常见问题解答

该列表可能有利于解决提取过程中所碰到的问题。我们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。我们将竭尽所能为您排忧解难。

现象	原因及解决方法
<b>DNA 降解</b>	
电泳条带涂抹	1、处理过程中，使用无 RNase&DNase 的耗材，样品保证新鲜，避免反复冻融造成样品的降解。 2、若使用研磨仪研磨样品，请使用液氮冷冻样品，然后再研磨，或者提高研磨仪的研磨频率，减少研磨时间，减少 DNA 的降解。 3、植物的种子类样品，建议使用 15mg 以内的粉末，使用粉碎仪器打碎的样品请尽快提取 DNA，推荐使用液氮研磨样品，再进行提取 DNA 的方法，能够得到更多的 DNA。
<b>DNA 产量低</b>	
多糖植物 DNA 堵柱子	减少样品的使用量，建议使用 10mg 左右的样品，尽可能的让多糖漂洗过滤。
DNA 电泳堵孔	1、多糖、多酚类植物样品，请使用我们的磁珠 DNA 纯化试剂盒或 K319 多糖多酚植物 DNA 提取试剂盒，对基因组 DNA 进行纯化回收，此类样品不可避免。 2、如果提取后的 DNA 已经达到粘稠状态的，请将 DNA 加入 200 $\mu$ l 的 TE 稀释，然后使用我们的基因组 DNA 纯化磁珠进行回收纯化，可以达到较好的效果，广泛用于多糖植物基因组 DNA 的纯化方面。
漂洗液中醇的量不够	1、请检查试剂 wash1、wash2 中的乙醇的量是否足够。
洗脱效率不够	2、增加洗脱体积和洗脱次数。由于基因组 DNA 片段大，水溶性较差。建议进行第三次洗脱以提高产量或提高洗脱液的体积。
<b>RNA 污染</b>	
延长 RNase 消化时间	加入 RNase A 至裂解液中消化去除 RNA 污染
增加 RNAase 的用量	在原用量的前提下，增加原来的 0.1 倍的用量，同时延长酶解时间，确保 RNase A 能够完全降解 RNA。
<b>OD260/280 或 OD260/230 比值不正常</b>	
RNA 污染	加入 RNase A 至裂解液中消化去除 RNA 污染
230 负值	可以尝试漂洗液改用 70% 的无水乙醇漂洗 2 次
核酸浓度太低	核酸浓度很低时，OD 比值偏差较大