

CP 植物基因组 DNA 分离试剂盒简明明说明书 (BW-GD2621)

产品简介

本试剂盒适用于从富含多糖、DNA 含量低的新鲜的或干燥的植物样本中提取基因组 DNA。可在 1 小时内处理至多 100 mg 的新鲜组织（或 50 mg 的干燥组织）。结合可逆核酸结合特性，快速、多用途的 Mini Column 技术，从植物组织裂解液中去除多糖、酚类化合物和酶抑制剂。该过程依赖阳离子洗涤剂十六烷基三甲基溴化铵（CTAB）的良好性能，以及 BIOMIGA 的 Mini Column 选择结合 DNA。样品在含有 CTAB 的高盐缓冲液中均质化和裂解，氯仿提取去除多糖和其它影响 DNA 纯化和下游实验的杂质。纯化得到的 DNA 可用于 PCR、限制性酶切和杂交技术。该方法减少了塑料浪费和手工时间，使得多个样品可以并行处理。

产品构成

Catalog#	-00	-01	-02
Preps	4	50	250
DNA Mini Columns	4	50	250
2 mL Collection Tubes	4	50	250
Buffer CP1	2.1 mL	26 mL	130 mL
Buffer CP2	1 mL	8 mL	40 mL
DNA Wash Buffer*	2 mL	15 mL	3 x 24 mL
RNase A (20 mg/mL)	25 μ L	270 μ L	1.4 mL
Elution Buffer	1 mL	8 mL	40 mL
User Manual	1	1	1

要点

- DNA Wash Buffer: 加入 8 mL (BW-GD2621-00) 或 60 mL (BW-GD2621-01) 或 96 mL (BW-GD2621-02) 96-100%乙醇至每个 DNA Wash Buffer 瓶内。
- 针对干燥和新鲜（或冷冻）样品，选择合适的操作步骤。另外，提供了一个简短的步骤用于提取 DNA（用于 PCR 反应）。

A. 干燥样品	约 50 mg 组织粉末
B. 新鲜/冷冻样品	不超过 100 mg 组织，得率与 A 相近

产品贮存及稳定性

本试剂盒生产之日起可保存 12 个月，请按以下方式储存：

RNase A 可在室温稳定储存 12 个月。长期储存请将 RNase A 存放于 4°C，其他试剂及用品可保存于室温（4-28°C）。

注意事项

- Buffer CP1 和 CP2 在低温条件下易形成沉淀，使用前置于 65°C 预热溶解沉淀。

实验前需准备的材料

- 离心机（14,000 \times g）
- 无核酸酶的 1.5 mL 或 2.0 mL 离心管
- 水浴锅（65°C）
- 无菌 ddH₂O 或 Elution Buffer（65°C）
- 96-100%乙醇
- 氯仿：异戊醇（24:1）

- 可选： β -巯基乙醇

操作步骤

A. 干燥组织

这是分离总细胞（线粒体、叶绿体、基因组）DNA 最可靠的方法。通常，DNA 得率对于 southern blot 和 RFLP 图谱是充足的。

对于较长时间保存野外样品，干燥是不错的选择。样品可以在 45°C 烘箱中干燥过夜，研磨成粉末后置于室温下干燥保存。制备干燥样品时，将大约 50 mg 的干燥组织放入 2 mL 离心管，使用研杵研磨。对于后续做 PCR 和克隆来说，研杵最好一次性使用，使用后应立即浸泡于稀释的漂白液中直至清洗干净。一次性研杵可多次灭菌。对于标准的 Southern 分析，通过乙醇洗涤和表面擦拭，同一根研杵可以重复使用几次研磨样本。粉末研磨细腻有助于获得最佳 DNA 产量和提取。每组可以处理 4-6 个样品。

1. 将 10-50 mg 的干燥组织粉末，加入至含 **500 μ L Buffer CP1** 的 2.0 mL 离心管内，快速涡旋混匀，确保所有团块分散。

2. 65°C 孵育 15 min，期间颠倒混匀 2 次。

可选：如有必要，孵育前，加入 **5 μ L RNase A** 至裂解液中，除去 RNA。

3. 加入 600 μ L 氯仿：异戊醇（24:1），涡旋混匀， $\geq 10,000 \times$ g 离心 10 min。

4. 小心转移 **300 μ L** 上清液至一个干净的 1.5 mL 离心管内。避免吸到沉淀或转移任何碎片。

5. 加入 **150 μ L Buffer CP2** 和 300 μ L 无水乙醇，涡旋混匀以均质化。加入乙醇后可能形成沉淀，但不会影响 DNA 提取。

注：该步骤后可选择负压/离心步骤。

6. 将一个 **DNA Mini Column** 插入至一个 **2 mL Collection Tube**, 将全部混合液加入至 **Mini Column**, 12,000 ×g 离心 1 min, 弃滤液。重复利用收集管。

7. 加入 **600 μL DNA Wash Buffer** (确保已经加入乙醇), 12,000 ×g 离心 1 min, 弃滤液。

注: DNA Wash Buffer 作为浓缩液提供, 使用前请务必按照瓶身要求加入乙醇。若冷藏过, 使用前请置于室温。

8. 加入 **600 μL DNA Wash Buffer**, 12,000 ×g 离心 1 min, 弃滤液。

9. 空离, 打开柱盖, 最大转速离心 2 min, 干燥柱子。

注: 该步骤对于残留乙醇 (将会影响到下游实验) 的去除非常必要。

10. 将 **DNA Mini Column** 置于一个干净的 1.5 mL 离心管, 加入 **100 μL** 预热至 65°C 的 **Elution Buffer**, 最大转速离心 1 min。

B. 新鲜/冷冻组织

该步骤适用于大多数新鲜或冷冻组织样品, 可有效提取 DNA。但由于各种真菌的含水量、多糖含量差异很大, 样品量应控制在 200 mg 以内。最好使用幼嫩的叶片或者针叶。提取得到的 DNA 可足够用于 Southern 分析中的几个泳道。

准备样品时, 将组织样品置于 1.5 mL 或 2 mL 离心管内, 然后用镊子将其浸入液氮中冷冻。使用一次性研杵研磨。或者也可让液氮蒸发后将样品储存于 -70°C。对于后续做 PCR 和克隆来说, 研杵最好一次性使用, 使用后应立即浸泡于稀释的漂白液中直至清洗干净。一次性研杵可多次灭菌。对于标准的 southern 分析, 通过乙醇洗涤和表面擦拭, 同一根研杵可以重复使用几次研磨样本。

1. 将研磨好的植物组织 (起始量 100 mg) 置于 2 mL 离心管内, 快速加入 **500 μL Buffer CP1**, 剧烈涡旋混匀, 确保没有团块, DNA 不能从团块组织中有效提取。

2. 65°C 孵育 15 min, 期间颠倒混匀 2 次。

可选: 如有必要, 孵育前, 加入 **5 μL RNase A** 至裂解液中, 除去 RNA。

3. 加入 800 μL 氯仿: 异戊醇 (24:1), 涡旋混匀, ≥10,000 ×g 离心 5 min。

4. 小心转移 **300 μL** 上清液至一个干净的 1.5 mL 离心管内。避免吸到沉淀或转移任何碎片。

5. 加入 **150 μL Buffer CP2** 和 300 μL 无水乙醇, 涡旋混匀以均质化。加入乙醇后可能形成沉淀, 但不会影响 DNA 提取。

注: 该步骤后可选择负压/离心步骤。

6. 将一个 **DNA Mini Column** 插入至一个 **2 mL Collection Tube**, 将全部混合液加入至 **Mini Column**, 12,000 ×g 离心 1 min, 弃滤液。

7. 加入 **600 μL DNA Wash Buffer**, 12,000 ×g 离心 1 min, 弃滤液。

注: DNA Wash Buffer 作为浓缩液提供, 使用前请务必按照瓶身要求加入乙醇。若冷藏过, 使用前请置于室温。

8. 加入 **600 μL DNA Wash Buffer**, 12,000 ×g 离心 1 min, 弃滤液。

9. 空离, 打开柱盖, 最大转速离心 2 min。

注: 该步骤对于残留乙醇 (将会影响到下游实验) 的去除非常必要。

10. 将 **DNA Mini Column** 置于一个干净的 1.5 mL 离心管, 加入 **100 μL** 预热至 65°C 的 **Elution Buffer**, 室温静置 1 min, 12,000 ×g 离心 1 min。

可选: 将洗脱下来的 DNA 二次上柱将会得到另外 20-30% 的 DNA,

通常第一次洗脱可得到 60-70% 的 DNA。

操作步骤 (负压/离心)

1. 按照先前的方法, 准备新鲜或干燥样品, 直至转移 **DNA/Buffer CP2/乙醇** 混合物至一个 **DNA Mini Column**。

2. 按厂家说明准备负压装置, 将 **DNA Mini Column** 连接至负压装置。

3. 转移 **DNA/Buffer CP2/乙醇** 混合物至一个 **DNA Mini Column**。

4. 打开负压装置, 使样品通过 **Mini Column**, 关闭负压装置。

5. 加入 **600 μL DNA Wash Buffer**, 打开负压装置, 使滤液流下。重复此步骤。

6. 将 **Mini Column** 转移至一个离心管, 离心 1 min 以干燥。

7. 转移 **Mini Column** 至一个干净的 1.5 mL 离心管, 加入 **100 μL Elution Buffer**, 室温静置 1-2 min, 离心 1 min 洗脱 DNA。

常见问题解答

问题	可能原因	建议
柱子堵塞	残留碎片	使用氯仿: 异戊醇, 确保没有转移沉淀。
	上柱前, DNA 没有完全溶解	加入 Buffer CP2 和乙醇之前, 确保 DNA 已溶解。这可能需要在 65°C 孵育并涡旋。
	样品太粘稠	起始样品量不要超过建议用量。可以增加 Buffer CP1 和 CP2 的量, 每个样品使用 2 个及以上的柱子。
低 DNA 得率	起始样品没有完全破坏	对于干燥和新鲜样品, 加入 Buffer CP1 前一定要充分均质化。
	组织裂解不充分	减少初始样品使用量或增加 Buffer

		CP1 和 CP2 的量。
	DNA 残留在柱子上	增加洗脱体积至 200 μ L, 离心前 65°C 孵育 5 min。
	DNA 漂洗不当	DNA Wash Buffer 使用前按要求加入乙醇。
下游实验有问题	盐离子污染	DNA Wash Buffer 须在室温保存。
	乙醇残留	DNA 漂洗两次后, 确保空离干燥, 使得残留乙醇完全去除。

杭州倍沃医学科技有限公司

BIOMIGA (中国)

www.beiwobiomedical.com

400-115-2855

sales@beiwobiomedical.com

倍沃医学