

M5 Plant Genomic DNA Max Kit

植物基因组 DNA 大量提取试剂盒

使用说明书 (V.2)

产品名称	单位	货号
M5 Plant Genomic DNA Max Kit	10T	MF136-01

【储存条件】 室温保存, RNase A(10mg/ml) -20°C

【试剂盒组分】

试剂盒组成	保存	10T
RNase A(10mg/ml)	-20°C	500 µl
缓冲液 LP1	室温	50 ml
缓冲液 LP2	室温	20 ml
缓冲液 LP3/E	室温	42 ml 第一次使用前按说明加指定量乙醇
漂洗液 WB2	室温	60ml 第一次使用前按说明加指定量乙醇
洗脱缓冲液 EB	室温	25 ml
吸附柱 AC	室温	10 个
收集管 (50ml)	室温	10 个

1. 缓冲液 LP1、LP3/E 低温时可能出现析出和沉淀，可以在 65°C 水浴几分钟帮助重新溶解（LP3/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。

【产品简介】

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 在高离序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特制吸附膜，柱与柱之间吸附量差异极小，可重复性好。
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. 去除多糖多酚成份和多次柱漂洗，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。

【实验前准备及注意事项】

1. 缓冲液 LP3/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。
2. 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 1mg。
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°C 。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】

<第一次使用前请先在漂洗液 WB2 中加入指定量无水乙醇，充分混匀，加入后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 LP3/E 中加入指定量无水乙醇。>

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 LP1 和 40 μl RNase A (10 mg/ml)，旋涡振荡，充分混匀帮助裂解，室温放置 20 分钟。65 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 15 分钟，在水浴过程中颠倒离心管 3 次，混合样本使其充分裂解。

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。

3. 加入 1.8ml 缓冲液 LP2，充分混匀，涡旋振荡 1 分钟，室温放置 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。

4. 计算上清量，加入 0.5 倍体积的无水乙醇，立即涡旋振荡混匀。
5. 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 1 分钟，倒掉收集管中的废液。
6. 向吸附柱中加入 5ml 的缓冲液 LP3/E，9,000 x g 室温离心 1 分钟，弃去滤液。
7. 加入 10ml 漂洗液 WB2（请先检查是否已加入无水乙醇!），9,000 x g 室温离心 1 分钟，弃掉废液。
8. 加入 5ml 漂洗液 WB2（请先检查是否已加入无水乙醇!），9,000 x g 室温离心 1 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 5 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 $^{\circ}\text{C}$ 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 分钟后再次洗脱一遍，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，但最小体积不应少于 500 μl ，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 $^{\circ}\text{C}$ ，如果要长时间存放，可以放置在 -20°C 。

【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 WB2 中忘记加无水乙醇- 建议 : 第一次实验时, 在漂洗液 WB2 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 7 完成后, 加 10ml 无水乙醇再漂洗一遍 *起始材料太多过量- 建议 : 减少起始处理材料, 不要过量 *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 8, 否则残留乙醇会影响洗脱效率。
洗脱下来的 DNA 产量低	*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 9 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。

【备注】

本产品仅供科研使用。在确认产品质量出现问题时, 本公司承诺为客户免费更换等量的质量合格产品。