

Code No. 9768S

研究用

TaKaRa

TaKaRa MiniBEST Plant
Genomic DNA Extraction Kit

说明书

目 录

内 容	页 码
● 制品说明	1
● 制品内容	1
● 保存与运输	1
● 实验前的准备	1
● 操作方法	2
● 实验例	3
● 不同植物组织 DNA 提取方法及提取量一览表	4
● 注意事项	6
● Q&A	6

● 制品说明

本试剂盒是专门用于提取各种植物组织材料基因组 DNA 的小量纯化试剂盒。本试剂盒采用了两套特别的裂解系统，分别可以提取简单的植物组织材料基因组 DNA 和富含多糖、多酚等较难提取的植物组织材料基因组 DNA。植物组织材料经液氮研磨后，由不同的处理液释放基因组 DNA，再结合 DNA 制备膜技术纯化基因组 DNA。本试剂盒具有高效、快速、方便之特点。液氮研磨完成后，提取操作仅需 40 分钟便可完成。使用本试剂盒可从 50~500 mg（根据材料的不同，组织起始量有所变化）植物材料中纯化得到 1~10 μg 的高纯度基因组 DNA，提取得到的基因组 DNA 可用于 PCR 反应、Southern 杂交以及 RAPD、AFLP、RFLP 等多种分子生物学实验。

● 制品内容（10 次量）

本试剂盒分 Part I 和 Part II 两部分

■ Part I 部分（请于-20℃保存）

50× DTT Buffer	125 μl
RNase A	125 μl

■ Part II 部分（请于室温 15~25℃保存）

Buffer HS I ^{*1,3}	5 ml
Buffer HS II ^{*1}	5 ml
Buffer KAC	750 μl
Buffer GB ^{*1}	6 ml
Buffer WA ^{*1}	6 ml
Buffer WB ^{*2}	4.5 ml
Elution Buffer	2 ml
Spin Columns	10 支
Collection tubes	10 支

*1 含有强变性剂，应避免与皮肤、衣物等接触。若不小心接触到眼睛或皮肤时，请立即到医院进行处理。

*2 在首次使用前，请添加 10.5 ml 的 100%乙醇，混合均匀。

*3 Buffer HS I 室温保存，当温度较低时可能会有沉淀产生，37℃温育后可溶解，不影响正常使用。

【试剂盒之外所需准备试剂】

- ◆ 无水乙醇
- ◆ 灭菌水

● 保存与运输

1. 本试剂盒 Part I 部分在-20℃保存和运输。
2. 本试剂盒 Part II 部分可以在室温下（15~25℃）保存和运输。

● 实验前的准备

1. 实验前请准备 56℃水浴。
2. Buffer WB 在首次使用前，请添加 10.5 ml 的 100%乙醇，混合均匀。
3. 洗脱结合于 DNA 制备膜上的基因组 DNA 时，将 Elution Buffer 或灭菌水加热至 65℃使用，将会提高基因组 DNA 的洗脱效率。

● 操作方法

操作流程见图 1，植物组织经液氮研磨后全套操作约需 40 分钟便可完成，分为材料裂解、DNA 与膜结合、DNA 纯化等步骤，详细说明如下：

植物材料的裂解：

本试剂盒采用了两套特别的裂解系统，分别可以提取简单的植物组织材料基因组 DNA 和富含多糖、多酚等较难提取的植物组织材料基因组 DNA。简单的植物组织材料 DNA 提取请参照 Protocol-I 进行；多糖、多酚等较难提取的植物组织材料的 DNA 提取请参照 Protocol-II 进行。

◆简单植物组织材料 (Protocol-I)：

简单植物组织材料是指幼嫩的植物的根、茎、叶等，或多糖、多酚及油脂含量较少或不合的材料。

- ① 首先在 tube 中加入 500 μ l 的 Buffer HS I 和 10 μ l 的 50 \times DTT Buffer (一般是以 100 mg 植物材料起始，对于 DNA 含量低的植物材料可适当增加起始量)。
- ② 准确称取植物材料后进行液氮研磨。
- ③ 迅速将研磨好的粉末加入到步骤①准备好的 tube 中混匀，然后加入 10 μ l 的 RNase A (10 mg/ml)，充分振荡混匀，于 56°C 水浴温育 10 分钟。

◆富含多糖、多酚及油脂植物材料 (Protocol-II)：

富含多糖、多酚及油脂的植物材料一般是指植物的花朵、果实、种子、块茎等。

- ① 首先在 tube 中加入 500 μ l 的 Buffer HS II (一般是以 100 mg 植物材料起始，对于 DNA 含量低的植物材料可适当增加起始量)。
- ② 准确称取植物材料后进行液氮研磨。
- ③ 迅速将研磨好的粉末加入到步骤①准备好的 tube 中混匀，然后加入 10 μ l 的 RNase A (10 mg/ml)，充分振荡混匀，于 56°C 水浴温育 10 分钟。

裂解好的样品按如下操作进行：

- 1 加入 62.5 μ l 的 Buffer KAC (Buffer HS I 或 Buffer HS II 的 1/8 体积)，充分混匀。冰上放置 5 分钟，12,000 rpm 离心 5 分钟。取上清，加入与上清液等体积的 Buffer GB，充分混匀。
- 2 将 Spin Column 安置于 Collection Tube，溶液移至 Spin Column 中 (由于溶液较多，一般需要分两次过柱，每次过柱的体积量不要超过 700 μ l)，12,000 rpm 离心 1 分钟，弃滤液。
- 3 将 500 μ l 的 Buffer WA 加入至 Spin Column 中，12,000 rpm 离心 1 分钟，弃滤液。
- 4 将 700 μ l 的 Buffer WB 加入至 Spin Column 中，12,000 rpm 离心 1 分钟，弃滤液。
注) 请确认 Buffer WB 中已经加入了指定体积的 100%乙醇。请沿 Spin Column 管壁四周加入 Buffer WB，这样有助于完全冲洗沾附于管壁上的盐份。
- 5 重复操作步骤 4。

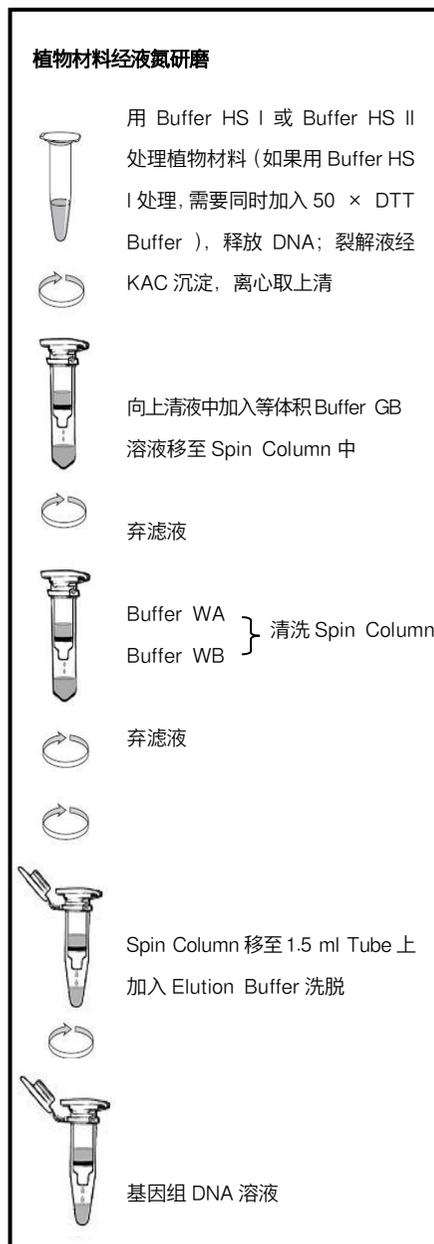


图 1. 操作流程简图

6. 将 Spin Column 安置于 Collection Tube 上, 12,000 rpm 离心 2 分钟。
7. 将 Spin Column 安置于新的 1.5 ml 的离心管上, 在 Spin Column 膜的中央处加入 30~50 μ l 的 Elution Buffer 或灭菌水, 室温静置 5 分钟。
注) 将 Elution Buffer 或灭菌水加热至 65 $^{\circ}$ C 时使用有利于提高洗脱效率。
8. 12, 000 rpm 离心 2 分钟洗脱 DNA。
如需获得更大收量, 可将离下液重新加入到 Spin Column 膜的中央或再加入 30~50 μ l 的 Elution Buffer 或灭菌水, 室温静置 5 分钟后, 12,000 rpm 离心 2 分钟洗脱 DNA。
9. 基因组 DNA 定量。
提取得到的基因组 DNA 可通过电泳或测定吸光度定量。提取的 DNA 若要长期保存建议使用 Elution Buffer 洗脱。

● 实验例

1. 从简单植物组织材料中提取基因组 DNA 的实验例

使用本试剂盒从简单植物组织材料中提取基因组 DNA, 最终分别从 100 mg 的芹菜叶片、玉米幼苗叶片、小麦幼苗叶片、绿豆幼苗叶片、向日葵幼苗叶片, 纯化得到了约 1.5 μ g、1.2 μ g、9 μ g、1.8 μ g、3 μ g 的高纯度基因组 DNA。其电泳结果见图 2。

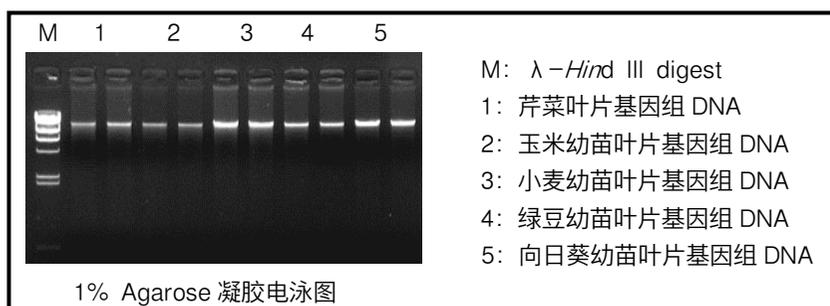


图 2. 从简单植物组织材料中提取的基因组 DNA

2. 从富含多糖多酚及油脂的植物材料中提取基因组 DNA 的实验例

使用本试剂盒从富含多糖多酚及油脂的植物材料中提取基因组 DNA, 最终分别从 100 mg 的芦荟叶片、松针、红掌叶片(花卉)、平菇子实体、花生种子、香菇菌丝中进行基因组 DNA 的提取, 分别纯化得到了约 0.2 μ g、3 μ g、2 μ g、0.15 μ g、1.5 μ g、0.4 μ g 的高纯度基因组 DNA。其电泳结果见图 3。

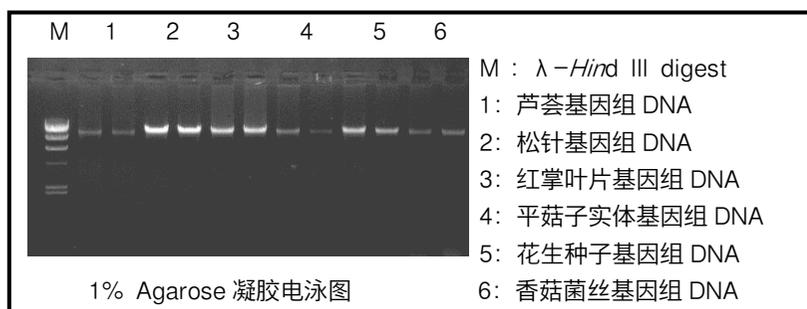


图 3. 从富含多糖多酚及油脂的植物材料中提取基因组 DNA

3. 从向日葵幼苗和松针中提取的基因组 DNA，扩增 5 kb 片段的实验例
使用本试剂盒从 100 mg 的向日葵幼苗和松针中，分别提取得到约 3 μ g 基因组 DNA。以此基因组 DNA 为模板，PCR 扩增了 ATP 基因的约 5 kb 的 DNA 片段。其电泳结果见图 4。

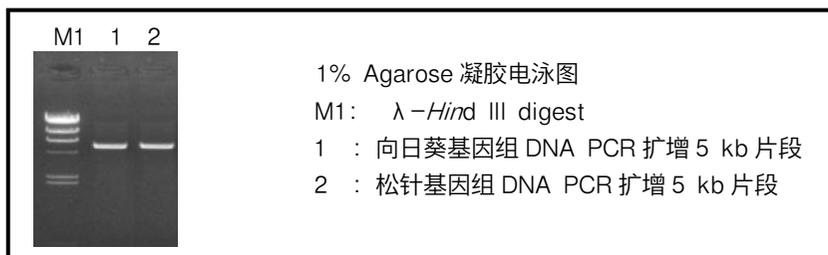


图 4. 从向日葵和松针中提取基因组 DNA 的 PCR 扩增结果

● 不同植物组织 DNA 提取方法及提取量一览表（已验证）

- ◆ 使用本试剂盒提取简单植物组织材料的基因组 DNA，用 Buffer HS I 处理植物材料，使用 100 μ l Elution Buffer 洗脱，材料推荐起始量和 DNA 收量如表 1 所示。

材料	推荐起始量	DNA 收量
菠菜叶片	100 mg	3~6 μ g
油菜叶片	100 mg	1~3 μ g
小麦幼苗叶片	100 mg	3~10 μ g
玉米幼苗叶片	100 mg	1~3 μ g
绿豆幼苗叶片	100 mg	1~3 μ g
萝卜幼苗叶片	200 mg	1~3 μ g
高粱幼苗叶片	100 mg	1~3 μ g
向日葵幼苗叶片	100 mg	1~3 μ g
小叶黄杨叶片	100 mg	1~3 μ g
芹菜叶片	100 mg	1~3 μ g
白菜叶片	200 mg	1~3 μ g
拟南芥叶片	200 mg	1~3 μ g
烟草叶片	100 mg	1~3 μ g

表 1. 简单植物组织材料的基因组 DNA 收量情况

- ◆ 使用本试剂盒提取富含多糖、多酚及油脂植物的基因组 DNA，用 Buffer HS II 处理植物材料，使用 100 μ l Elution Buffer 洗脱，材料推荐起始量和 DNA 收量如表 2 所示。

材料	推荐起始量	DNA 收量
苹果果肉	500 mg	0.1~0.5 μ g
马铃薯块茎	100 mg	1~3 μ g
西红柿果实	200 mg	1~3 μ g
香蕉果肉	200~500 mg	1~3 μ g
柏树叶片	100 mg	3~6 μ g
松针	100 mg	2~5 μ g
茶叶 (冻存)	100 mg	3~10 μ g
棉籽	100 mg	3~6 μ g
棉桃壳	100 mg	1~3 μ g
葡萄茎尖	200 mg	1~3 μ g
秋橄榄果实	200 mg	1~3 μ g
银杏叶片	100 mg	1~3 μ g
紫薯块茎	200 mg	0.2~1 μ g
龙骨叶片 (花卉)	100 mg	1~3 μ g
芦荟叶片 (花卉)	200 mg	0.2~1 μ g
花生种子	100 mg	1~2 μ g
香蕉苗叶片	200 mg	0.2~2 μ g
红掌叶片 (花卉)	100 mg	1~3 μ g
红景天叶片 (花卉)	200 mg	0.2~2 μ g
平菇子实体	200 mg	0.2~1 μ g
吊兰叶片 (花卉)	200 mg	0.2~1 μ g
香菇菌丝	100 mg	0.2~1 μ g
落地生根叶片 (花卉)	200 mg	0.2~1 μ g
玉米种子	100 mg	1~3 μ g
桔皮	200 mg	0.1~0.5 μ g
水稻种子	100 mg	1~3 μ g
梨肉	200~500 mg	0.1~1 μ g

表 2 富含多糖、多酚及油脂植物的基因组 DNA 收量情况

● 注意事项

1. 应尽量使用新鲜的植物材料，以确保提取的基因组 DNA 的收量及完整性。
2. 部分试剂中含刺激性化合物，操作时请戴上乳胶手套和眼镜，避免沾染皮肤和眼睛等，并应尽量在通风橱中进行操作。若沾染皮肤、眼睛，要立即用大量清水冲洗，必要时应寻求医疗咨询。
3. 基因组 DNA 需长期保存时，建议用 Elution Buffer 洗脱。
4. 植物基因组 DNA 的收量和完整性，与植物的生长状态有很大关系。一般情况下植物的 DNA 含量较低（可适当增加起始量），植物种子相对能高一些。如果想要获得高品质的 DNA 请使用幼嫩的植物材料，否则可能得不到完整的 DNA。
5. 对于简单植物组织材料和富含多糖多酚及油脂的植物材料处理方法是不同的，所以正确选择处理 Buffer 很重要。处理简单植物组织材料请用 Buffer HS I（使用时加入 50× DTT Buffer）；处理富含多糖多酚及油脂的材料请用 Buffer HS II。如果材料处理不当可能会造成 DNA 收量的降低，甚至得不到 DNA。

● Q&A

- Q1. 基因组 DNA 的收量如何？
- A1. 本试剂盒适合于植物材料基因组 DNA 的提取。基因组 DNA 的提取量因材料不同而各异，一般情况下，从 100 mg 的植物材料中，可以提取约 1~10 μg 的基因组 DNA。植物材料的 DNA 含量一般较低，尤其是含水分较多的植物果实及生长状况较老的叶片。幼嫩的植物叶苗及植物种子中基因组 DNA 含量相对丰富，且植物的 DNA 含量和植物的生长状态有很大关系，如果想要获得高品质的 DNA 请使用幼嫩的植物材料，否则可能得不到完整的 DNA。
- Q2. 基因组 DNA 的收量较低或无基因组 DNA，为什么？
- A2. 基因组 DNA 收量较低时，可以从以下几个方面考虑：
- ① 实验材料本身 DNA 含量低，比如从 100 mg 苹果果肉中仅能提取得到约几十纳克的基因组 DNA；
 - ② 液氮研磨不充分，DNA 未充分释放。植物材料是需要进行液氮研磨的，所以充分的液氮研磨是获得高品质 DNA 的关键；
 - ③ 选材不当，处于生长中期或末期的植物材料 DNA 含量较低，甚至是不完整的 DNA；
 - ④ 洗脱时将灭菌水或 Elution Buffer 加热至 65℃后使用将有利于提高洗脱效率；
 - ⑤ 请严格按照操作方法进行操作。
- Q3. 提取的基因组 DNA 有降解，为什么？
- ① 材料不够新鲜，收集后的材料未及时处理或未低温保存。我们建议材料应尽量在-80℃保存，运输过程中亦应使用干冰等。
 - ② 材料本身有残留的 DNA 酶活性。可以增加一次 Buffer WA 的清洗操作。
 - ③ 如需长期保存提取的 DNA，请使用 Elution Buffer 洗脱。
- Q4. 提取的基因组 DNA 中有 RNA 污染，为什么？
- A4. ① 实验过程中没有使用 RNase A。应严格按照实验操作要求使用 RNase A。
② RNase A 可能失活。RNase A 尽可能在-20℃下保存，RNase A 活性比较稳定，一般不易失活。
- Q5. 提取的基因组 DNA 反应性能差，为什么？
- A5. ① 提取的基因组 DNA 中盐份浓度过高。在使用 Buffer WA 和 Buffer WB 进行 DNA 制备膜的清洗时，请沿 Spin Column 的管壁四周加入，有助于彻底清洗掉 Column 上残留的盐离子，这样有利于提高清洗效果。
② 洗脱液中残留乙醇，在向 Spin Column 中加入洗脱液之前，将 Spin Column 在室温下静置 2 分钟有助于使 Spin Column 上残留的乙醇彻底挥发，然后再加入洗脱液洗脱。
③ 进行 DNA 洗脱时请一定在膜的中央加入洗脱液，尽量不要沾染 Spin Column 的管壁四周。

注意

本产品仅供科学研究使用，不能用于人、动物的医疗或诊断程序，不能使用本产品作为食品、化妆品或家庭用品等。

未经TAKARA BIO INC.书面许可授权或批准，不得制造、许诺销售、销售、进口Takara产品，或者使用Takara产品所有的相关专利及相关商标。

如果您需要其他用途的许可授权，请联络我们，或访问我们网站www.takara-bio.com。

您使用本产品必须遵守产品网页上适用的全部许可要求。阅读、了解并遵守此类声明的所有限制性条款是您的责任。

所有商标均属于各自商标所有者的财产。某些商标并未在全部行政区注册。

技术咨询热线：

0411-87641685, 87641686

4006518761, 4006518769

TAKARA BIO INC.

URL: <http://www.takara.com.cn>