

FastPure Plant DNA Mini Kit Handbook

FastPure 植物基因组 DNA 提取试剂盒说明书（离心柱型）

产品组成

FastPure Plant DNA Mini Kit		
产品编号	EK-1206-50T	EK-1206-100T
纯化次数	50 次	100 次
Buffer AP1	40mL	80mL
Buffer P3	20mL	40mL
Buffer AW1	19mL	38mL
Buffer AW2	17mL	34mL
Buffer AE	10mL	20mL
RNase A Solution (100mg/mL)	220μL	440μL
DNA Mini Columns	50 个	100 个
2mL Collection Tubes	50 个	100 个
过滤柱（含套管）	50 个	100 个
使用手册	1	1

产品介绍

本产品为植物 DNA 抽提提供一种广谱性的解决方案。产品结合硅胶柱纯化技术和创新的抑制剂清除试剂，无需酚氯仿等毒性试剂，适合于从≤200mg 新鲜/冻藏植物样品，≤50mg 干燥植物/种子样品提取高纯度的总 DNA。纯化的 DNA 包括基因组 DNA 和叶绿体 DNA。得到的 DNA 可直接用于 PCR, SSR, AFLP, RAPD 以及 Southern Blot 等实验。以下实验条件都在室温下进行。

存储条件

除 RNase A Solution 外，其它组份在室温（15-25°C）下干燥保存稳定至少 12 个月。RNase A Solution 收到后请冻于-20°C。

需要额外准备的材料

- 无水乙醇（96%-100%）
- 无菌 1.5mL 离心管
- 高速离心机
- 液氮或物理研磨设备

开始前注意事项 请务必在使用本试剂盒之前阅读此注意事项。

- Buffer AW1 和 Buffer AW2 均以浓缩液形式提供。首次使用前，请按照瓶上的指示添加适量的无水乙醇（96-100%），以获得有效的溶液。
- Buffer AP1 和 Buffer AW1 浓缩物可能形成沉淀。如有必要，将其加热至 65°C 以重新溶解（在将乙醇添加到 Buffer AW1 之前），Buffer AW1 添加乙醇后请勿加热
- 过滤柱（含套管）为固体杂质去除用途，对核酸无吸附作用。

操作步骤:

1. 用液氮把植物/真菌样品研磨成粉末,转移 50~200mg 新鲜/冻藏样品或 15~50mg 干燥样品至 2mL 离心管中。

也可以使用物理研磨设备将植物/真菌样品破碎,破碎是否彻底(粉末状)直接决定了 DNA 的产量。

2. 加入 400 μ L Buffer AP1 和 4 μ L RNase A Solution (100 mg / mL) 至最大 200 mg (湿重) 或 50 mg (干燥) 破坏的植物或真菌组织,并剧烈涡旋。

注意: 请勿在使用前混合 Buffer AP1 和 RNase A Solution。

3. 将混合物在 65°C 孵育 15-30 分钟。在孵育期间颠倒离心管混匀 2-3 次。

这一步主要是为了裂解细胞。

4. 向混合物中加入 130 μ L Buffer P3, 混匀并在冰上孵育 5 分钟。

加入 Buffer P3 后必须充分混匀,冰上孵育时间不建议缩短,这对去除植物多糖至关重要。。

5. 在最大转速下 ($\geq 14,000 \times g$) 将混合物室温离心 5 分钟。

在此步骤中,某些植物材料可能会产生非常粘稠的裂解物和大量沉淀物。建议高转速离心,若无法达至转速要求则建议延长离心时间取得最佳离心效果以减少后续提取影响。

6. 转移上清液至 2 mL 收集管中的过滤柱(含套管)中,并以最大转速 ($\geq 14,000 \times g$) 离心 2 分钟。

若裂解液过于粘稠导致过滤柱堵塞,可将离心时间延长至 5 分钟,或减少起始样本量。吸液时可能需要剪掉移液器吸头的前端,以将粘稠的裂解液移到过滤柱(含套管)中。过滤柱可去除大部分沉淀物和细胞碎片,但少量会通过并在收集管中形成沉淀。注意不要在下一步骤中吸取该沉淀物。

7. 将步骤 6 中的上清液部分转移到新的试管中,注意不要吸到细胞碎片沉淀。

一般通常可以回收约 450 μ L 裂解液。对于某些植物物种,回收的裂解液较少。在这种情况下,请确定体积以备下一步加入 Buffer AW1 参考。

8. 将 1.5 体积的 Buffer AW1 添加到澄清的裂解液中,并用移液器吹打混匀。

例如,向 450 μ L 裂解液中添加 675 μ L Buffer AW1。如果裂解液的体积较小,请相应减少 Buffer AW1 的量。加入缓冲液 AW1 后可能会形成沉淀,但这不会影响后续的提取。确保加入的 Buffer AW1 中提前加入相应乙醇混匀,将 Buffer AW1 直接吸到澄清的裂解液中并立即混合非常重要。

9. 将 650 μ L 步骤 8 的混合物(包括可能形成的任何沉淀物)转移到核酸吸附柱(提前套在 2mL 收集管中),并以 10,000 $\times g$ 转速离心 1 分钟,弃滤液。

每次加入 650 μ L 混合物至核酸吸附柱中离心,直至完成所有混合物的离心。

10. 重复步骤 9 直至完成全部的混合物离心,弃滤液。

11. 向核酸吸附柱中加入 500 μ L Buffer AW2, 并以 10,000 $\times g$ 转速离心 1 分钟,弃滤液。

注意: 确保 Buffer AW2 使用前加入了相应的无水乙醇。

12. 重复操作步骤 11 一次。

13. 倒弃滤液,将吸附柱放入收集管中,最大转速($\sim 13,400 \times g$)离心 2 分钟干燥柱子,目的是将吸附柱中残余的漂洗液去除。

离心是为将 Buffer AW2 中乙醇的残留去除以免影响后续的酶反应(酶切、PCR 等)实验。。

14. 把吸附柱转移至无菌的 1.5mL 离心管中,开盖室温静置 5-10 分钟以彻底挥发残留的乙醇。

15. 加入 50-100 μ L Buffer AE 至核酸吸附柱的膜中央并盖上盖子静置 5 分钟,后以最大转速($\sim 13,400 \times g$)离心 2 分钟以洗脱 DNA 至离心管中。

若需要获得最高产量,可重复操作步骤 15 进行第二次洗脱。Buffer AE 在 55-60°C 预热后加入膜中央洗脱也可提高 DNA 获得率。

16. 弃去吸附柱,将 DNA 溶液于 -20°C 保存或进行下游实验。