

## HiPure SF Plant DNA Mini Kit

安全型植物 DNA 小提试剂盒

HiPure SF Plant DNA Kits 为植物组织 DNA 抽提提供一种安全快速的解决方案。试剂盒基于硅胶柱纯化技术和 SDS/KAC 预处理方式，提取过程中无需使用有毒的酚氯仿抽提，也无需进行耗时的醇类沉淀，整个提取过程只需 30-50 分钟。得到的 DNA 可直接用于 PCR, SSR, AFLP, RAPD, 以及 Southern blot 等实验。

### 产品组份

产品编号	D3164-01	D3164-02	D3164-03	D3164-04
纯化次数	10 次	50 次	250 次	1000 次
HiPure gDNA Mini Columns	10	50	250	4 x 250
2ml Collection Tubes	10	50	250	10 x 100
Buffer SPL	10 ml	30 ml	150 ml	550 ml
Buffer PS	3 ml	10 ml	50 ml	200 ml
Buffer PBD*	5 ml	20 ml	100 ml	2 x 200 ml
Buffer GW2*	6 ml	20 ml	2 x 50 ml	2 x 100 ml
RNase A	5 mg	10 mg	45 mg	180 mg
Protease Dissolve Buffer	1.8 ml	1.8 ml	5 ml	15 ml
Buffer AE	5 ml	15 ml	60 ml	120 ml
说明书	1	1	1	1

## 保存条件

本产品室温(15~25℃)可保存 18 个月。低温下, Buffer SPL 可能会有沉淀形成, 需 65℃ 水浴让沉淀完全溶解。RNase A 室温运输和保存, 长期贮藏(>3 个月)建议保存于-20~8℃。

## 准备事项

- 无水乙醇(96-100%)
- 65℃ 水浴锅
- 2-巯基乙醇
- 按瓶子标签所示, 用无水乙醇稀释 Buffer GW1, 并于室温保存。
- 按瓶子标签所示, 用无水乙醇稀释 Buffer GW2, 并于室温保存。
- 按瓶子标签所示, 加入 2 倍体积的无水乙醇稀释 Buffer PBD, 于室温保存。
- 溶解 RNase A (15mg/ml): 加入适量的 Protease Dissolve Buffer 溶解 RNase A 至终浓度为 15mg/ml, 颠倒混匀让 RNase A 充分溶解。RNase A 干粉可在室温下保存, 但溶解的 RNase A 须保存于 2~8℃。

## 实验步骤

1. 用液氮把植物样品研磨成粉末。转移≤100mg 新鲜/冻藏样品或≤20mg 干燥样品至 1.5 ml 离心管中。

除液氮研磨外, 也可以将用珠磨仪(如 FastPrep-24, 2010 Gene Grinder)或机械匀浆器进行匀浆。采用珠磨仪匀浆时, 我们推荐使用 2ml 植物匀浆管, 该匀浆管包含数粒钢珠和菱角锋利珠子, 能高效地对植物样品进行分散研磨。由于植物样品代谢物质含量差别很大, 初次使用时, 推荐起始用量为 50mg 新鲜样品或 10mg 干燥样品。

2. **立即加入 500µl Buffer SPL**, 高速涡旋使样品充分分散。65℃ 处理 15 分钟, 水浴期间涡旋混匀 2 次。

可选: 使用前按 1ml Buffer SPL 加入 20~40µl 2-巯基乙醇, 提高裂解液抗氧化的能力, 防止多酚氧化而降低 DNA 产量。

3. 加入 160 $\mu$ l Buffer PS 至样品中。涡旋 15 秒，冰上放置 10 分钟。
4. 14,000  $\times$  g 离心 5 分钟。
5. 小心转移 600 $\mu$ l 上清液至新的离心管中，加入 10 $\mu$ l RNase A 混匀，室温放置 10 分钟消化去除 RNA。
6. 加入 900 $\mu$ l Buffer PBD(已用无水乙醇稀释)至样品中，涡旋混匀 10 秒。若出现明显的絮状沉淀，用移液枪吸打尽量打散沉淀。
7. 把 gDNA 柱装在收集管中，转移一半体积的混合液至柱子中。12,000  $\times$  g 离心 30~60 秒。
8. 倒弃滤液把柱子装回收集管，把剩余混合液转移至柱子中。12,000  $\times$  g 离心 30~60 秒。
9. 倒弃滤液把柱子装回收集管，加入 600 $\mu$ l Buffer GW2(已用无水乙醇稀释)至柱子中。12,000  $\times$  g 离心 30~60 秒。
10. 倒弃滤液把柱子装回收集管，加入 600 $\mu$ l Buffer GW2(已用无水乙醇稀释)至柱子中。12,000  $\times$  g 离心 30~60 秒。  
Buffer GW2 在使用之前，须按瓶子标签指示加入无水乙醇进行稀释。
11. 倒弃滤液把柱子装回收集管。12,000  $\times$  g 离心 2 分钟去除柱子中残留的乙醇。
12. 将柱子转移至新的 1.5ml 离心管中，加入 30~60 $\mu$ l 预热到 65 $^{\circ}$ C Buffer AE 至柱子的膜中央。室温静置 2 分钟，12,000  $\times$  g 离心 1 分钟。
13. (可选)再加入 30~60 $\mu$ l 预热至 65 $^{\circ}$ C 的 Buffer AE 至柱子的膜中央。放置 2 分钟。12,000  $\times$  g 离心 1 分钟。
14. 丢弃 DNA 结合柱，把 DNA 保存于-20 $^{\circ}$ C。

## 常见问题

### 1. 柱子堵塞

- **样品用量太多**：减少样品用量。初次实验时，推荐使用 50mg 新鲜或 15mg 干燥样品，根据实验结果再调整样品用量。
- **富含多糖类样品**：某些植物样品中含有丰富的粘液和高分子多糖，会让裂解液变得非常粘稠，减少样品用量或加大 Buffer SPL 的用量。

### 2. DNA 产量低

- **样品裂解不充分**：用液氮将样品研磨细小的粉末状。加入 Buffer SPL 后，没有让样品充分分散。若涡旋无法让样品充分分散时，可用移液枪吸打几次打散样品。
- **沉淀未充分打散**：加入 Buffer PBD 时，若产生絮状沉淀时，用移液枪吸打多次打散沉淀。
- **样品富含多酚类物质**：加入 2-巯基乙醇至 Buffer SPL，以提高裂解液的抗氧化能力。
- **试剂准备有误**：Buffer PBD 和 Buffer GW2 都需要按瓶子标签加入正确的乙醇。
- **样品用量太多**：处理某些样品时，减少样品量有利于提高产量。

### 3. DNA 纯度不达标

- **样品富含多糖类物质**：加入 2-巯基乙醇至 Buffer SPL 中，有利于提高纯度。
- **样品用量太多**：减少样品量有利于提高纯度。
- **富含色素的样品**：对于某些富含色素的样品，再用 350 $\mu$ l Buffer GW2 洗涤柱子一次，以去除色素，提高 A260/230 的读数。