

Code No. 9103

研究用

TaKaRa

Rice DNA Extraction Kit
(精米 20 粒 Scale)

说明书

目 录

内 容	页 码
● 制品内容	1
● 保 存	1
● Kit 外必备试剂和仪器	1
● 注意事项	1
● 实验操作方法	2
● 实验例	3
● 备 注	4
● 实验操作流程图	4

本制品是从 20 粒未加热精米中提取 DNA 的试剂盒。提取的 DNA 适合于 PCR 扩增等实验。
本试剂盒使用安全，无需使用苯酚、三氯甲烷等有害试剂。

● 制品内容 (50 次量)

1. Lysis Buffer A	18 ml
2. Lysis Buffer B	7.5 ml
3. Precipitation Buffer	8.5 ml
4. DNA Binding Buffer	50 ml
5. Wash Buffer A	7.5 ml × 2
6. Wash Buffer B	9 ml × 2
7. Elution Buffer	20 ml
8. Miniprep Spin Column	50 个

● 保存

室温 (25°C 左右) 保存。

注意避光，请将各试剂置于试剂盒中保存。

*: 自收到之日起，适当条件下保存，两年内有效。

● Kit 外必备试剂和仪器

- Proteinase K (20 mg/ml) (Code No. 9034 等)
- RNase A (100 mg/ml) (Code No. 740505 等)
- 灭菌水
- 乙醇 (99.5% 以上)
- 异丙醇
- 水浴锅 (可以设置 55°C 和 65°C)
- 离心机 (4°C 冷却，并适用于各种 Microtube)
- 适当型号的 Microtube、Tip 等

*: 各种型号 tube 需高压灭菌。

*: 应使用灭菌的带有滤膜的 tip，防止交叉感染。

● 注意事项

以下为使用本试剂盒时的注意事项，使用前一定认真阅读。

1. Lysis Buffer B、DNA Binding Buffer、Wash Buffer A 低温保存有时会出现沉淀，最好于室温 (25°C 左右) 保存。如果出现沉淀，可进行 40°C 加热，使沉淀完全溶解后使用。其中 Lysis Buffer B 要边溶解边搅拌，否则沉淀很难溶解。
2. DNA Binding Buffer、Wash Buffer A、1st Wash Buffer (Wash Buffer A 中加入异丙醇配制而成) 有刺激性，使用时请戴好手套。另外，请不要和次氯酸等漂白剂混合。
3. 为了防止污染，分装试剂时请使用一次性灭菌枪头。
4. DNA 的提取量及纯度因精米的种类及状态 (精米程度等) 不同而不同。
5. 有时有可能因为样品的原因，导致提取的 DNA 溶液中含有 PCR 反应的阻害物质，使 PCR 反应不能正常进行。

● 实验操作方法

【试剂的制备】

1. 1st Wash Buffer。
每瓶 Wash Buffer A 中加入 7.5 ml 的异丙醇，均匀混合。配制后的 1st Wash Buffer 请拧紧瓶盖于 20–25°C 保存，避免挥发。
2. 2nd Wash Buffer。
每瓶 Wash Buffer B 中加入 21 ml 的 99.5% 以上的乙醇，均匀混合。配制后的 2nd Wash Buffer 请拧紧瓶盖于 20–25°C 保存，避免挥发。

【DNA 制备流程】

1. 取 20 粒精米放入 2 ml Microtube 中，加入 540 μ l 灭菌水。
(所有米粒要充分浸泡于水中，米粒间不要有气泡。)
2. 室温 (25°C 左右) 过夜放置。
3. 加入 300 μ l Lysis Buffer A。
4. 磨碎米粒，不要留有块状物，并注意不要将液体溅出 Microtube 外。
磨碎方法例：可将 1 ml 枪头前部顶住一个新的 1.5 ml Microtube 管壁，用力压弯枪头前部，然后用弯曲的枪头前部按压过夜浸泡的精米，即可磨碎米粒。
5. 加入 120 μ l Lysis Buffer B。
6. 加入 50 μ l Proteinase K (20 mg/ml)。
加入方法：将吸取 Proteinase K 的枪头插入至 Microtube 底部后打出，然后用枪头吸吹，均匀混合后放入 55°C 水浴中，用枪头混合时注意不要产生气泡。
7. 55°C 保温 1 小时，期间 10 分钟、20 分钟、40 分钟时分别缓慢颠倒混匀一次。
(不要使用振荡器，尽量不要产生气泡。)
8. 4°C, 11,200 \times g^{*1} 离心 5 分钟。
9. 移取 470 μ l 上清液至已装有 147 μ l Precipitation Buffer 的 1.5 ml Microtube 中，颠倒混匀后立即放置冰上保存。(这时会有白色悬浊物产生。)
注意：移取上清时液面的浮游物会吸附于枪头外壁上，注意尽量不要将浮游物带入新的 Microtube 中。
10. 冰上放置 10 分钟，中间颠倒混匀一次，离心前再颠倒混匀一次。
(颠倒混合时请将 Microtube 底部的液体用手指弹下，以充分混匀。)
11. 4°C, 11,200 \times g^{*1} 离心 10 分钟。
12. 移取 150 μ l 上清液至已装有 1 μ l RNase A (100 mg/ml) 的 1.5 ml Microtube 中。
13. 用手指轻弹 Microtube，轻轻混匀后 55°C 放置 5 分钟。
14. 加入 855 μ l DNA Binding Buffer，用移液枪混匀。
15. 将 Miniprep Spin Column 安置于 2 ml Microtube 上，移取上述步骤 14 的溶液 500 μ l 至 Miniprep Spin Column 中。
16. 室温, 10,000 \times g^{*1} 离心 1 分钟。
17. 弃滤液后将上述步骤 14 中残余的液体再加入至 Miniprep Spin Column 中。
18. 室温, 10,000 \times g^{*1} 离心 1 分钟。
19. 将 Miniprep Spin Column 移至新的 2 ml Microtube 上，加入 500 μ l 的 1st Wash Buffer。
20. 室温, 10,000 \times g^{*1} 离心 1 分钟。
21. 弃滤液后向 Miniprep Spin Column 中加入 600 μ l 的 2nd Wash Buffer。
22. 室温, 10,000 \times g^{*1} 离心 1 分钟。
23. 弃滤液后向 Miniprep Spin Column 中加入 400 μ l 的 2nd Wash Buffer。

24. 室温, $12,700 \times g^{*1}$ 离心 3 分钟。
25. 将 Miniprep Spin Column 移至新的 1.5 ml Microtube 上。
26. 加入 50 μ l 65°C 预热的 Elution Buffer, 室温静置 5 分钟。
(不要将 Miniprep Spin Column 上盖。)
27. 1.5 ml Tube 打开的状态, 室温, $7,000 \times g^{*1}$ 离心 1 分钟。
28. 取下 Miniprep Spin Column, 将洗脱液(滤液)轻轻振荡混匀后 4°C 保存。
29. 制备 10 倍稀释液, 测定 OD₂₆₀ 及 OD₃₂₀^{*2} 值。稀释时, 使用灭菌水将 TE Buffer^{*3} 稀释 10 倍后, 再进行样品稀释。
30. 根据测定的(OD₂₆₀-OD₃₂₀)值, 利用公式: $1 (OD_{260}-OD_{320}) = 50 \text{ ng}/\mu\text{l}$, 计算提取 DNA 的浓度。
例: 10 倍稀释的 DNA 溶液的 OD 测定为: OD₂₆₀=0.0524, OD₃₂₀=0.0092, 则:
DNA 原液浓度= $(0.0524-0.0092) \times 10 \times 50 \text{ (ng}/\mu\text{l}) = 21.6 \text{ (ng}/\mu\text{l})$

*1: 关于离心力

取最小转子直径。

使用 TOMY 精工制造的 TMA-24 转子时, 各对应离心转速如下:

$7,000 \times g \rightarrow 10,700 \text{ rpm}$ 、 $10,000 \times g \rightarrow 12,800 \text{ rpm}$

$11,200 \times g \rightarrow 13,500 \text{ rpm}$ 、 $12,700 \times g \rightarrow 14,400 \text{ rpm}$

*2 吸光度值:

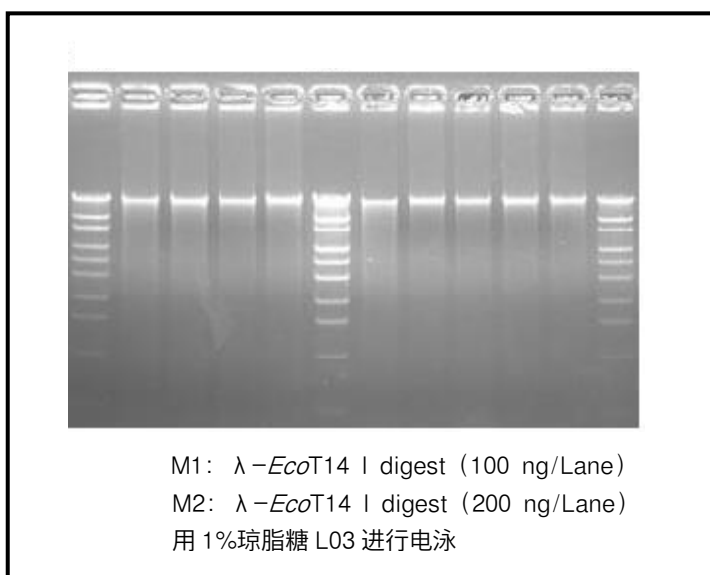
使用本试剂盒提取的 DNA 溶液稀释 10 倍后, OD₂₆₀ 通常小于 0.1, 请使用能表示到小数点后第三位数字的分光光度计。另外, 请务必测定 OD₃₂₀ 的数值。

*3 TE Buffer 组成:

10 mM Tris-HCl (pH8.0); 1 mM EDTA (pH8.0)

● 实验例

使用本试剂盒, 按照“实验操作方法”提取 DNA 后, 测定吸光度值。分别使用相当于 200 ng 的 DNA 提取液进行 1% 的琼脂糖凝胶电泳的结果如下。



● 备注

使用本试剂盒制备 DNA 溶液时，请参照以下几点：

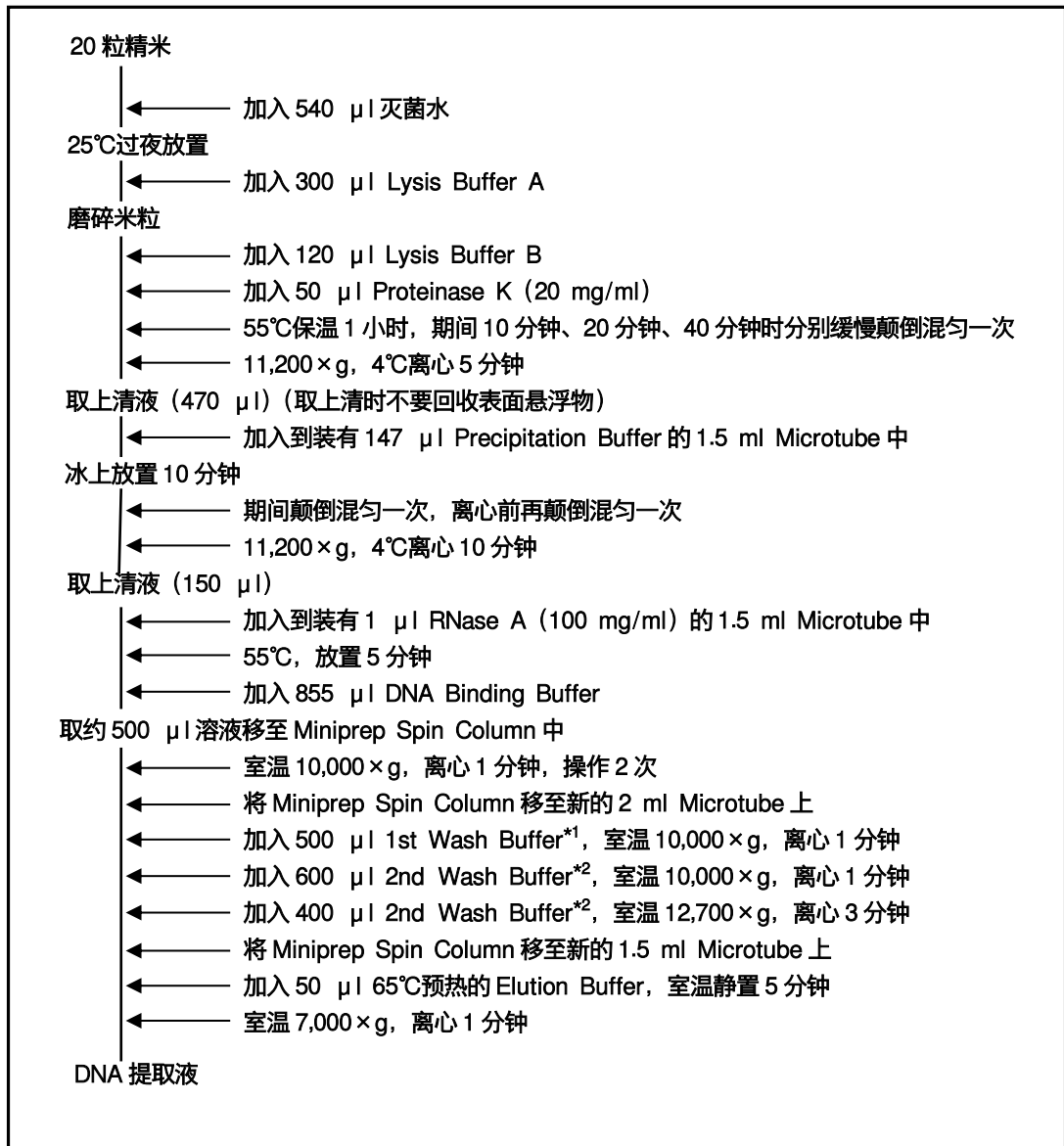
【Rice 鉴别用 PCR Kit (Code No. RR211A)】

1 次反应时，以吸光度换算后约 10 ng 的 DNA 为模板。另外，电泳时，每孔 5 μl 添加 Loading Buffer 后的 PCR 反应液。

【Rice 鉴别用 PCR Kit II (Code No. RR213A)】

1 次反应时，以吸光度换算后约 10 ng 的 DNA 为模板。另外，电泳时，每孔 10 μl 添加 Loading Buffer 后的 PCR 反应液。

● 实验操作流程



* 离心取最小转子直径

*1. 1st Wash Buffer。

每瓶Wash Buffer A中加入7.5 ml的异丙醇，均匀混合。配制后的1st Wash Buffer请拧紧瓶盖于20–25°C保存，避免挥发。

*2. 2nd Wash Buffer。

每瓶 Wash Buffer B 中加入 21 ml 的 99.5%以上的乙醇，均匀混合。配制后的 2nd Wash Buffer 请拧紧瓶盖于 20–25°C保存，避免挥发。

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。

本文件由宝日生物技术（北京）有限公司翻译制作，最新版本文件请参考 TAKARA BIO INC.网站。为正确使用 Takara 产品，您应当掌握本产品的相关知识和使用说明。

技术咨询热线：

0411-87641685, 87641686

4006518761, 4006518769

TAKARA BIO INC.

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

v201702Da