

Code No. 9194

研究用

Takara

Plant DNA Isolation Reagent

说明书

目 录

内 容	页 码
● 制品说明	1
● 制品内容	1
● 保 存	1
● 试剂盒之外所需准备试剂及器具	1
● 使用注意	1
● 操作方法	1
● 实验例	2
● Troubleshooting	6
● 参考文献	6
● 关联产品	6

● 制品说明

Plant DNA Isolation Reagent 是根据氯化苄法构建的，可以从植物材料中提取基因组 DNA 的 Ready-to-use 试剂盒。氯化苄具有能将含有纤维素等的细胞壁中的羟基苄基化，从而破坏细胞壁的特性。本制品利用了氯化苄的这一特性，将植物样品冻结融解后，再使用 Pipet Tip 的尖端将植物样品在 Microtube 壁上数次按压即可破坏细胞壁。本法与传统方法相比，省去了液氮研磨等烦琐步骤，有利于一次性处理大量样品。而且，本制品经过了改良，热处理时间只需 15 分钟，使用本制品从实验开始至水相回收只需 30 分钟时间。得到的基因组 DNA 可以进行 PCR 扩增及限制酶处理等。

● 制品内容 (100 次量)

Extraction Solution 1	40 ml
Extraction Solution 2	8 ml
Extraction Solution 3 (100% Benzyl chloride)	15 ml

● 保存

室温。

Extraction Solution 2 低温保存可能会有沉淀析出。如果发生析出现象，请于 50°C 溶解后，再于室温保存。

*: 自收到之日起，-20°C 条件下保存，两年内有效。一旦开封或解冻，请于 4°C 保存并尽快使用。

● 试剂盒之外所需准备试剂及器具

- ◆ 异丙醇
- ◆ 70%乙醇
- ◆ TE Buffer
- ◆ RNase A (必要时使用)
- ◆ Micropipet
- ◆ Micropipet 用 Tip
- ◆ 1.5 ml Microtube
- ◆ 离心机 (转速可达 12,000 rpm)
- ◆ 50°C 恒温水浴锅
- ◆ 桌面振荡仪

● 使用注意

Extraction Solution 3 中含有氯化苄，具有刺激性，可能造成眼部和皮肤损伤。吸入可能致命，且吞食有害身体。请按照 Material Safety Data Sheet (MSDS) 列出的保存及处理条件操作。

● 操作方法

1. 将植物组织用剪刀剪至 3 mm 以下角形状，重量在 10~100 mg 范围内，装入 1.5 ml Microtube 中，于 -20°C 冻结。
注：切断植物组织的剪刀要预先使用 70%乙醇擦拭，特别要注意擦拭刀刃部位。
2. 取出冻结的植物组织于室温放置 5 分钟左右，使其融解。
3. 轻微离心，将植物组织收集在 Microtube 底部。
4. 使用 Pipet Tip 尖端将植物组织按压 Microtube 底部 10 次左右，进行物理破碎。

5. 加入 400 μ l 的 Extraction Solution 1, 剧烈振荡 5 秒钟。

如果植物组织仍滞留于 Microtube 底部, 需用手指轻弹 Microtube 使其悬浮。

6. 轻微离心, 加入 80 μ l 的 Extraction Solution 2, 剧烈振荡 5 秒钟。添加 Extraction Solution 2 后产生白色沉淀, 剧烈振荡后溶液呈白浊状态。如果植物组织仍滞留于 Microtube 底部, 需用手指轻弹 Microtube 使其悬浮。

7. 轻微离心, 加入 150 μ l 的 Extraction Solution 3, 剧烈振荡 5 秒钟。如果植物组织仍滞留于 Microtube 底部, 需用手指轻弹 Microtube 使其悬浮。

8. 轻微离心 2 秒钟以内, 于 50 $^{\circ}$ C 温浴 15 分钟。
注: 长时间离心 Extraction Solution 3 将会分层, 务必控制在 2 秒钟以内。

9. 12,000 rpm 4 $^{\circ}$ C 离心 15 分钟, 分离水层 (上层) 和有机层 (下层)。

10. 取上层水相移至新的 1.5 ml Microtube 中, 上层相约 400 μ l。注意尽量不要混入水相以外的物质。

11. 添加等量的异丙醇, 轻柔混匀。
注: 长时间存放可能会有夹杂物沉淀, 尽量迅速进入下一步操作。

12. 12,000 rpm 4 $^{\circ}$ C 离心 10 分钟。

13. 弃上清, 注意不要吸取沉淀。
注: 沉淀有时肉眼看不见。

14. 加入 1 ml 70%乙醇, 清洗沉淀。

15. 12,000 rpm 4 $^{\circ}$ C 离心 3 分钟。

16. 弃上清, 注意不要吸取沉淀。

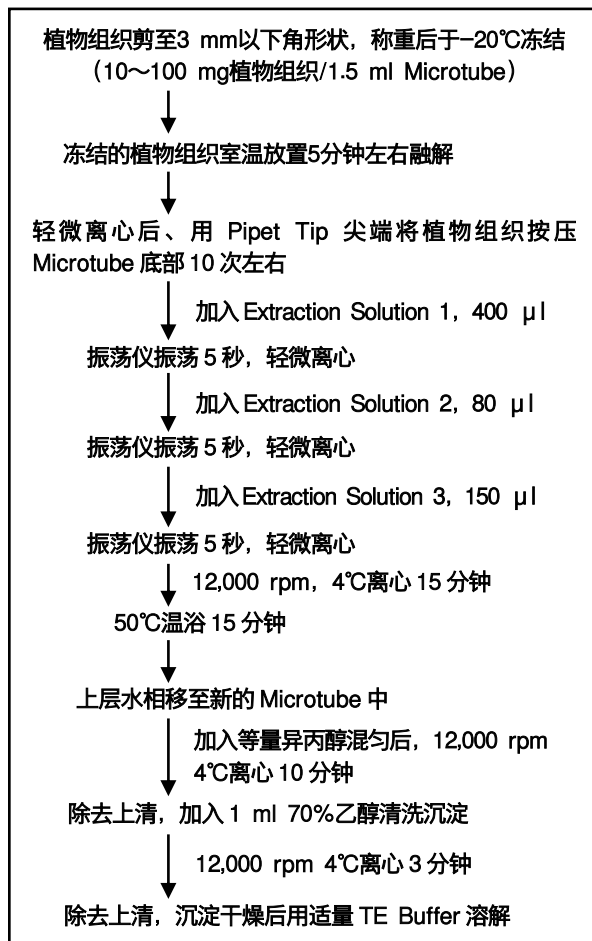
17. 沉淀干燥, 加入适量 TE Buffer (约 20 μ l) 溶解沉淀。

注: 沉淀过度干燥将导致难以溶解, 请注意。

* 1. 回收的基因组 DNA 溶液可直接作为 PCR 反应的模板或直接进行限制酶切断等反应。

使用 20 μ l TE Buffer 溶解基因组 DNA 时, PCR 反应液 (25 μ l 反应体系) 或限制酶酶切反应液 (20 μ l 反应体系) 中添加的 DNA 溶液在 0.5~2 μ l 之间为好。

2. DNA 溶液不立即使用时, 请于 4 $^{\circ}$ C 保存。



实验操作流程简图

● 实验例

实验例 1: 从植物组织中提取基因组 DNA

将拟南芥的幼芽、西红柿的幼芽和菠菜叶用剪刀剪至 3 mm 以下角形状, 分别称取 20 mg 和 50 mg 放入 1.5 ml Microtube 中, 于 -20 $^{\circ}$ C 冻结后按“操作方法”进行基因组 DNA 的提取, 基因组 DNA 使用 20 μ l TE Buffer 溶解后, 进行吸光度测定和电泳确认, 电泳结果如下。每份样品分别平行提取了 2 个。

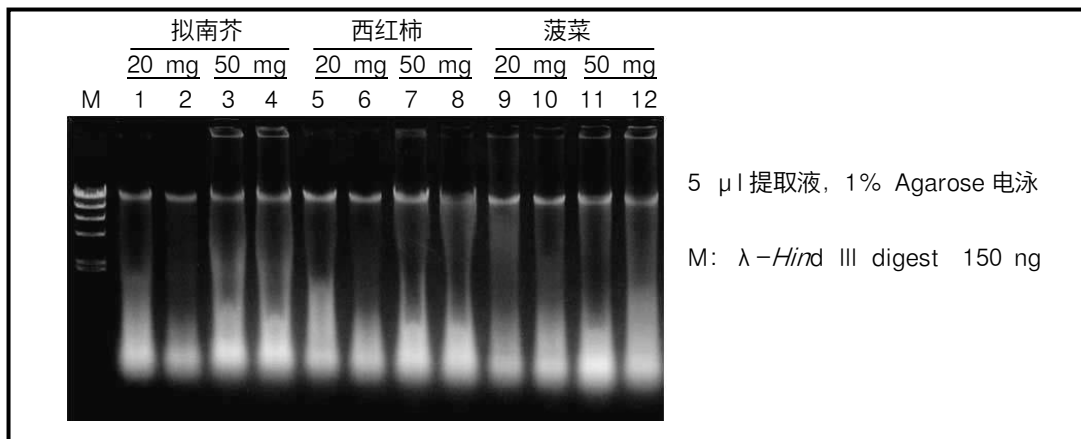


图 1 从植物组织中提取的基因组 DNA 电泳图

表 1 从植物组织中提取的基因组 DNA 纯度

样品名称	样品量	Sample No.	A260/A280	A260/A230
拟南芥幼芽	20 mg	1	2.2	1.4
		2	2.2	1.4
	50 mg	3	2.1	1.7
		4	2.1	1.7
西红柿幼芽	20 mg	5	2.0	1.4
		6	2.0	1.6
	50 mg	7	1.8	1.4
		8	1.7	1.4
菠菜叶	20 mg	9	2.2	1.6
		10	2.2	1.8
	50 mg	11	2.1	1.8
		12	2.0	1.7

实验例 2: 从烟草 BY-2 培养细胞中提取基因组 DNA

将湿重 50 mg 的烟草 BY-2 培养细胞放入 1.5 ml Microtube 中, 使用 PBS Buffer 洗净, 于 -20°C 冻结后省略了用 Pipet Tip 尖端将植物组织按压 Microtube 底部这一步骤, 其余步骤按“操作方法”操作, 沉淀用 20 μ l TE Buffer 溶解后, 进行吸光度测定和电泳确认, 电泳结果如下。每份样品分别平行提取了 2 个。

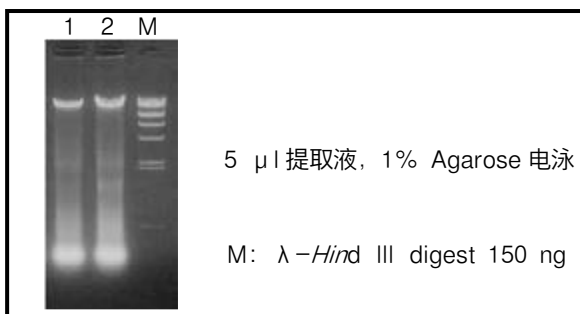


图 2 烟草 BY-2 培养细胞中提取的基因组 DNA 电泳图

表 2 从烟草 BY-2 培养细胞中提取基因组 DNA 的纯度

样品名称	样品量	Sample No.	A260/A280	A260/A230
烟草BY-2培养细胞	50 mg	1	2.2	2.1
		2	2.2	2.2

实验例 3: 以实验例 1、2 中提取的基因组 DNA 溶液为模板进行 PCR 扩增。

Template: 实验例 1、2 提取的基因组 DNA 溶液各 0.5 μ l

PCR Enzyme: *TaKaRa Taq* Hot Start Version (Code No. RR006A)

Total Volume: 25 μ l

目的基因及扩增片段大小

实验材料名称	目的基因	扩增片段大小
拟南芥	MERI-5 基因	约 1.0 kb
西红柿	XET 基因	约 0.6 kb
菠菜	cox1 基因	约 0.5 kb
烟草	EXT 基因	约 2.2 kb

PCR 反应条件:

拟南芥, 菠菜

98°C 10 sec
60°C 30 sec
72°C 1 min/kb } 30 Cycles

西红柿, 烟草

98°C 10 sec
55°C 30 sec
72°C 1 min/kb } 35 Cycles

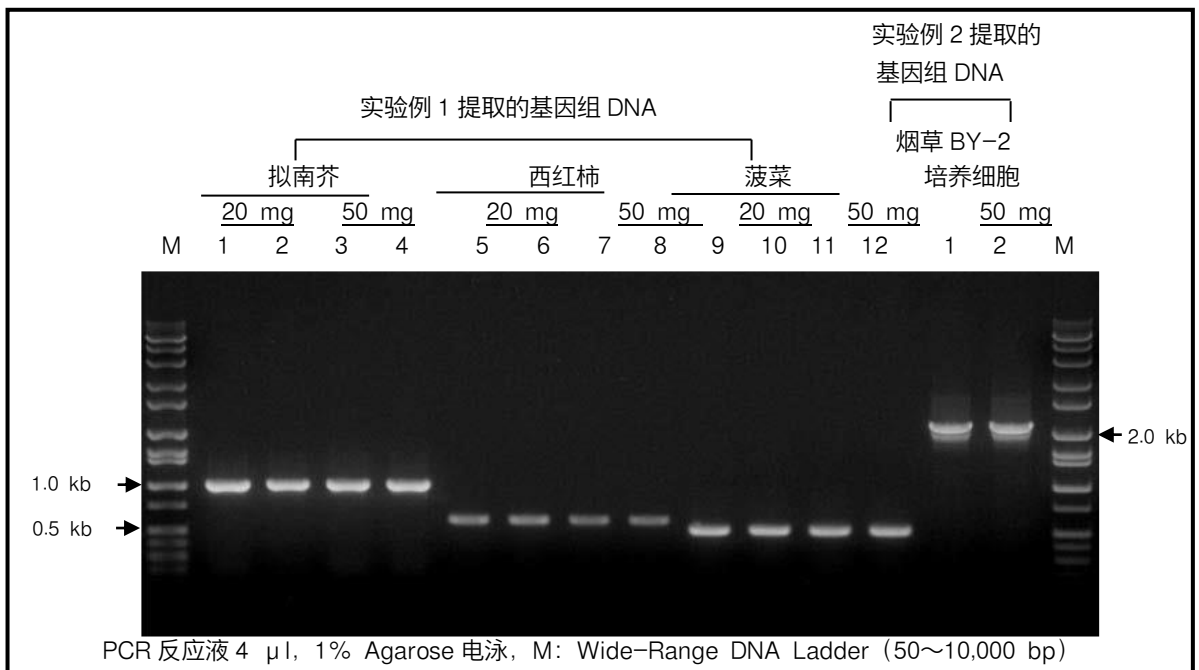


图 3 以提取的基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增的电泳图

实验例4: 从菠菜叶 (10 mg、100 mg) 中提取基因组DNA

将菠菜叶用剪刀剪至3 mm以下角形状, 分别称取10 mg、100 mg放入1.5 ml Microtube中, 于-20°C冻结后按“操作方法”进行基因组DNA的提取, 使用20 μl TE Buffer溶解后, 进行吸光度测定和电泳确认, 电泳结果如下:

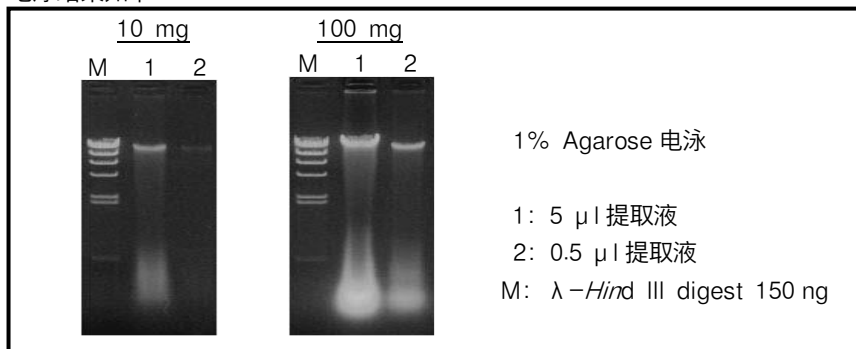


图 4 从菠菜叶 (10 mg、100 mg) 中提取的基因组 DNA 电泳图

表 3 从菠菜 (10 mg、100 mg) 中提取基因组 DNA 的纯度

样品名称	样品量	Sample No.	A260/A280	A260/A230
菠菜叶	10 mg	1	2.2	1.9
	100 mg	2	2.1	2.1

实验例 5: 以实验例 4 中提取的基因组 DNA 溶液为模板进行 PCR 扩增。

Template: 实验例 4 提取的基因组 DNA 溶液原液及稀释液 2 μl

PCR Enzyme: TaKaRa Taq Hot Start Version (Code No. RR006A)

Total Volume: 25 μl

【目的基因及扩增片段大小】

实验材料: 菠菜

目的基因: coxI 基因

片段大小: 约 0.5 kb

PCR 反应条件:

98°C 10 sec
60°C 30 sec
72°C 30 sec

} 30 Cycles

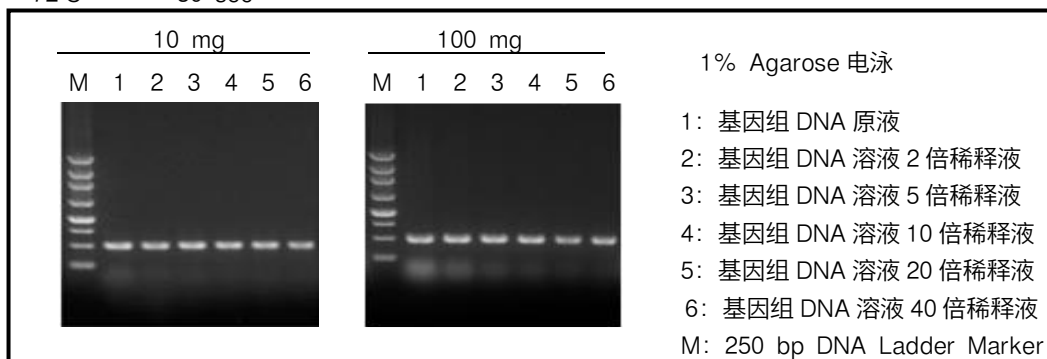


图 5 以提取的基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增的电泳图

● Troubleshooting

1. DNA 收量低、回收不到基因组 DNA，怎么办？

- ① 由于植物组织的不同，基因组 DNA 回收量会有所不同，请增加初始组织量。
- ② 松、山茶等固体叶片可以使用液氮研磨后再提取基因组 DNA。
- ③ 使用 Microtube 用研磨棒代替 Pipet Tip 进行按压处理可能会提高收量。
- ④ 添加异丙醇或者 70%乙醇后的离心时间延长（添加异丙醇后离心 30 分钟、添加 70%乙醇后离心 30 分钟），可能会提高收量。
- ⑤ 根据植物组织的保存时间、保存条件的不同，基因组 DNA 收量会有所不同，请尽量使用新鲜样品。

2. PCR 无扩增产物。

- ① 有时回收的基因组 DNA 溶液中含有 PCR 反应的阻害物质，请将基因组 DNA 溶液进行稀释后再作为 PCR 反应的模板使用。
- ② 初始组织量太多，请减少初始组织量，并重新提取。
- ③ 基因组 DNA 溶液呈茶褐色时，可能混入了明胶类物质，使用 High-Salt Solution for Precipitation (Plant) (Code No. 9193) 处理可能将缓和对 PCR 反应的阻害。使用 High-Salt Solution for Precipitation (Plant) 处理基因组 DNA 样品时，操作方法与处理 RNA 样品相同。但是不含 PCR 反应阻害物质的样品如果使用 High-Salt Solution for Precipitation (Plant) 处理后，相反有可能会引起对 PCR 反应的阻害，请注意！
- ④ PCR 反应用酶选择 *TaKaRa Ex Taq*[®] Hot Start Version (Code No. RR006)。

3. 提取的基因组 DNA 中混入了大量的 RNA。

使用本产品时，有可能存在 RNA 污染，此时推荐使用 RNase 处理。

RNase 处理方法：1、向 DNA 溶液中加入终浓度为 10–20 μg/ml 的 RNase A*

2、37°C 保温 30 分钟

3、如有必要，可用酚/氯仿抽提。

*：RNase A 粉末需用 10 mM Tris-HCl pH7.5 和 15 mM NaCl 配置成 1 mg/ml 的溶液。若含有 DNase，100°C 加热 15 分钟使 DNase 失活（无 DNase 的 RNase A 溶液可购买）。

● 参考文献

Zhu H, Qu F, and Zhu LH. Isolation of genomic DNAs from plants, fungi and bacteria using benzyl chloride. *Nucleic Acids Research* . (1993)21 (22): 5279–5280.

● 关联产品

High-Salt Solution for Precipitation (Plant) (Code No. 9193)

TaKaRa Ex Taq[®] Hot Start Version (Code No. RR006A)

TaKaRa Ex Taq is a registered trademark of Takara Bio Inc.

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.takarabio.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。

本文件由宝日医生物技术（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: <https://www.takarabiomed.com.cn>

v202101Da