

D2485 HP Plant DNA Kit

中文简易说明

√实验前请按说明书正确稀释 DNA Wash Buffer.

➤ 使用【无水乙醇】对 DNA Wash Buffer 进行稀释，稀释后室温保存。

| 货号 | 加入量 |
|----------|------------|
| D2485-00 | 8mL |
| D2485-01 | 80mL |
| D2485-02 | 160mL (每瓶) |

➤ 按照 24:1 制备氯仿：异戊醇混合液备用

E.Z.N.A.[®] HP Plant DNA 方案，用于干燥样品

这是对于总细胞（线粒体，叶绿体，和基因组）DNA 提取最合适的方法。产量通常足够做用于 RFLP 图谱分析的 Southern Blot 的几条道。

干燥可以延长野生样品的储藏时间。样品可在 45°C 的烘箱中干燥过夜，磨成粉末，室温干燥储存。把 > 50mg 干燥组织放在 2.0mL 离心管中，用小型杵研磨组织来制备干燥的样品。用由 Omega Bio-Tek 公司提供的 Disposable Kontes 杵（Cat# SSI-1015-39）可以得到更好的研磨效果。如果样品用于鉴定性的工作，如 PCR，克隆等，研磨杵最好只用一次。

1. 加入 600μl CSPL Buffer 到装有 10-50mg 粉末状干组织的 1.5mL 离心管中，涡旋振荡混匀。确保打散所有组织块。

可选操作：加入 10μl β-巯基乙醇，振荡混匀；如果需要去除 RNA，可在此步骤加入 2μl RNase。

提示：以 4-6 管为一组，研磨，加 CSPL Buffer（可选加入 10μl β-巯基乙醇），进入第 2 步后，再开始下一组操作。

2. 65°C 水浴 30min。水浴期间拿出涡旋混匀样品两次。

3. 加入 600μl 氯仿：异戊醇（24：1），高速涡旋混匀 20 秒，≥10000xg 离心 10min。

4. 小心转移 300μl 上清液到新的 1.5mL 离心管，确保不要弄到沉淀，或转移到任何碎片。

5. 通过加入 150μl CXD Buffer 和 300μl 无水乙醇来调节结合条件，振荡混匀。加入乙醇后可能会形成沉淀，但这不会影响 DNA 的分离。

提示：CXD Buffer 和无水乙醇按 1:2 的比例预先混匀再使用。

6. 把 HiBind[®] DNA 结合柱套在 2.0 mL 收集管中（已提供），把所有裂解液转移到柱子中（包括所有的沉淀物）。10000xg 离心 1min 以结合 DNA 上柱。弃去滤过液。

7. 将 HiBind® DNA 柱子套上同一个收集管, 加入 700µl DNA Wash Buffer (已用无水乙醇稀释) 至柱子中, 室温 10000×g 离心 1min, 弃去滤过液。重复用这收集管。
8. 重复步骤 7。
9. 将 HiBind® DNA 柱子重新套回 2mL 收集管中, 10,000×g 以上离心空柱 2min 以干燥柱子的基质; 这一步主要是用来去除多余的乙醇, 以免影响下游操作。
10. 将柱子置于 1.5mL 灭菌离心管, 加入 50-100µl 65°C 预热的 Elution Buffer (或无菌水) 至柱子的膜中央。10000×g 离心 1min 以洗脱 DNA。
提示: 用较小的体积洗脱的确会提高 DNA 的浓缩度, 但产量低。不推荐用超过 200µl 的洗脱液洗脱 DNA。
11. 重复第 10 步。
提示: 为了提高 DNA 的浓度, 加入缓冲液, 且有洗脱前先 60-65°C 温浴 5min。也可以用第 1 次的洗脱液再洗脱一次。
12. 将 DNA 保存于 -20°C。

E.Z.N.A.® HP Plant DNA 方案, 用于新鲜/冷冻样品。

注意: 用液氮时请格外谨慎。

本方案适用于大多数的新鲜或冷冻组织样品, 可以有效的回收 DNA。尽管如此, 由于在水中的巨大变化和植物多聚糖的含量, 样品的大小不能超过 200mg。用嫩叶或针叶做样品可以得到最好的效果, 此方法分离得到的 DNA 足够用于做几道标准的 Southern 检测。

收集组织于 1.5mL 离心管中, 在液氮条件下把样品研磨碎, 可选择用由 Omega 公司提供的一次性小球研磨杵 (Cat# SSI-1015-39)。或者, 等液氮挥发后把样品存放于 -70°C 备用。如果样品用于鉴定性的工作, 如 PCR, 克隆等, 研磨杵最好只用一次。

1. 收集植物组织 (开始为 100mg) 于 1.5mL 管中, 立即加入 500µl CSPL Buffer, 振荡充分混匀。确保打散所有组织块。组织块里的 DNA 不能得到有效有萃取效果。
(可选操作: 加入 10µl β-巯基乙醇, 充分混匀。)
提示: 以 4-6 管为一组, 加入液氮研磨, 加 CSPL Buffer (加入 10µl 2-巯基乙醇), 进入第 2 步后, 再开始下一组操作。干组织不要超过 50mg。
2. 65°C 水浴 15min。振荡混匀样品几次。
3. 加入 800µl 氯仿-准备氯仿: 异戊醇 (24 : 1), 振荡混匀 20 秒。≥ 10000×g 室温离心 5min。
4. 小心转移 300µl 上清液到新的 1.5mL 离心管, 确保不要弄到沉淀, 或转移到任何碎片。

5. 通过加入 150 μ l CXD Buffer 和 300 μ l 无水乙醇来调节结合条件, 振荡混匀。加入乙醇后可能会形成沉淀, 但这不会影响 DNA 的分离。
提示: CXD Buffer 和 无水乙醇按 1:2 的比例预先混匀再使用。
6. 把 HiBind[®] DNA 结合柱套在 2.0 mL 收集管中 (已提供), 把所有裂解液转移柱子中 (包括所有的沉淀物)。10000 \times g 离心 1min 以结合 DNA 上柱。弃去滤过液。
7. 将 HiBind[®] DNA 柱子套上同一个收集管, 加入 700 μ l DNA Wash Buffer (已用无水乙醇稀释) 至柱子中, 室温 10000 \times g 离心 1min, 弃去滤过液。重复用这收集管。
8. 重复步骤 7。
9. 将 HiBind[®] DNA 柱子重新套回 2mL 收集管中, 10,000 \times g 以上离心空柱 2min 以干燥柱子的基质; 这一步主要是用来去除多余的乙醇, 以免影响下游操作。
10. 将柱子置于 1.5mL 灭菌离心管, 加入 50-100 μ l 65 $^{\circ}$ C 预热的 Elution Buffer (或 10mM Tris buffer, pH9.0 或 8.5, 或灭菌 dH₂O) 至柱子的膜中央。室温静置 3-5min; 10000 \times g 离心 1min 以洗脱 DNA。用较小的体积洗脱的确会提高 DNA 的浓缩度, 但产量低。不推荐用超过 200 μ l 的洗脱液洗脱 DNA。
11. 加入 50-100 μ l Elution Buffer, 重复第 10 步。这里最好使用另一个 1.5mL 管, 以保持第一次的洗脱有较高的 DNA 浓度。
提示: 为了提高 DNA 的浓度, 加入缓冲液, 且有洗脱前先 60-65 $^{\circ}$ C 温浴 5min。也可以用第 1 次的洗脱液再洗脱一次。
12. 将 DNA 保存于 -20 $^{\circ}$ C。

E.Z.N.A.[®] HP Plant DNA Protocol 用于低 DNA 含量样品

这个简单快捷方法可以快速地从新鲜, 冷冻, 干燥的样品分离 DNA, 用于 DNA 含量低的类型或需要较大产量的时候这程序增加了原材料的用量, 但产量还是要根据样品的种类。

按照方案 A 或 B 的大纲所建议的制备干燥的或新鲜的样品。注意以下对样品大小的限制:

- 干燥样品-使用不超过 200mg 研磨过组织;
- 新鲜样品-使用不超过 400mg 的新鲜或冷冻的研磨过的组织。

1. 将 100mg 样品加入到 15mL 聚丙烯管, 加入 9mL CSPL Buffer, 振荡混匀。室温放置 60min, 期间将样品管颠倒两次。

提示: 以 4-6 管为一组, 加入液氮研磨, 加 CSPL Buffer, 进入第 2 步后, 再开始

下一组操作。

可选择加入 10 μ l β -巯基乙醇，涡旋混匀。

2. 加 4.5mL 氯仿 : 异戊醇 (24 : 1)，振荡混匀。3000xg 离心 10min。
3. 转移最上层水相到新的 15mL 管，不要吸到沉淀或碎片。
4. 加 0.7 倍体积异丙醇，振荡，释出 DNA。
5. 马上 3000xg 离心 20min，沉淀 DNA。加长离心时间不会提高产量。
6. 小心吸取或倒掉上清，把离心管倒扣在吸水纸上 1min，等液体流干。没必要干燥 DNA 沉淀。
7. 每一管加入 400 μ l 灭菌的去离子水，加入预热至 65 $^{\circ}$ C，振荡重悬沉淀。
8. 加入 20 μ l RNase A (20mg/mL)，涡旋混匀。
9. 通过加入 200 μ l CXD Buffer 和 400 μ l 无水乙醇来调节结合条件，振荡混匀，得到均一的混合物。加入乙醇后可能会形成沉淀，但这不会影响 DNA 的分离。加入乙醇后可能会形成沉淀，但这不会影响 DNA 的分离。
10. 把 HiBind[®] DNA 结合柱套在 2.0 mL 收集管中 (已提供)，把 700 μ l 混合物转入 HiBind[®] DNA 结合柱中。10000xg 离心 1min 以结合 DNA 上柱。弃去滤过液，保留收集管。
11. 把剩下的混合物转入 HiBind[®] DNA 结合柱中。10000xg 离心 1min 以结合 DNA 上柱。弃去滤过液和收集管。
12. 将 HiBind[®] DNA 结合柱套上另一个收集管，加入 700 μ l DNA Wash Buffer (已用无水乙醇稀释) 至柱子中，室温 10000 \times g 离心 1min，弃去滤过液。重复用这收集管。
13. 重复步骤 12。
14. 将 HiBind[®] DNA 结合柱重新套回 2mL 收集管中，10,000 \times g 以上离心空柱 2min 以干燥柱子的基质；这一步主要是用来去除多余的乙醇，以免影响下游操作。
15. 将 HiBind[®] DNA 结合柱置于新的 1.5mL 灭菌离心管，加入 100 μ l 65 $^{\circ}$ C 预热的 Elution Buffer (或 10mM Tris buffer, pH 9.0 或 8.5, 或灭菌 dH₂O) 至柱子的膜中央。室温静置 3-5min；10000 \times g 离心 1min 以洗脱 DNA。
16. 加入 100 μ l Elution Buffer，重复第 14 步。这里最好使用另一个 1.5mL 管，以保持第一次的洗脱有较高的 DNA 浓度。
提示: 为了提高 DNA 的浓度，加入缓冲液，且有洗脱前先 60-65 $^{\circ}$ C 温浴 5min。也可以用第 1 次的洗脱液再洗脱一次。
17. 将 DNA 保存于 -20 $^{\circ}$ C。

中文翻译仅供辅助阅读，详情请以英文说明书为准