

D3485 Plant DNA Kit

简易中文步骤

√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
D3485-00	8mL
D3485-01	80mL
D3485-02	80mL (每瓶)

提取步骤:

A. 干燥植物样品 DNA 提取方案

1. 称量 10-50mg 的干燥植物组织，加入 800μl Buffer P1，充分涡旋混匀，确保将组织块打散；

TIP: 将样品研磨后再加入 Buffer P1 充分混匀，如果有多个样品一起做，加完一个样品后应立即进行步骤 2，再做下一个样品。

2. 在 65°C 孵育 10min，期间取出涡旋混匀 2 次；

3. 加入 140μl Buffer P2，涡旋混匀，≥10,000xg 离心 10min，小心转移上清液至新的离心管中，注意不要碰到沉淀；

4. 加入 0.7 倍体积的异丙醇，涡旋混匀，加入异丙醇后无需孵育。

TIP: 该步骤能轻松转移到 700μl 上清液，则需加入 490μl 异丙醇。注意需要根据转出上清液的体积调整异丙醇的加入量，转移到新的离心管后，需要测量上清液体积，再加入正确体积的异丙醇。

5. 10,000xg 离心 2min 沉淀 DNA，延长离心时间不会提高产量。

6. 小心吸除上清液，注意不要吸掉 DNA 沉淀，将离心管倒置在吸水纸上 1min，等残留的液体流出，但没必要干燥 DNA 沉淀；

7. 加入 300μl 在 65°C 预热的无菌去离子水，涡旋重悬沉淀，为有效溶解 DNA，可在 65°C 短暂孵育。加入 4μl RNase A 混匀，RNase A 处理不需要额外的孵育；

TIPS: 1. 在 65°C 孵育溶解 DNA 时，标记并将所需数量的 DNA 柱子放入到 2mL 收集管中。2. RNase A 可按比例加入到去离子水中，RNase A 在孵化时将保持稳定。

8. 加入 150μl Buffer P3 和 300μl 无水乙醇，涡旋混匀调节 DNA 与柱子的结合条件。加入乙醇后可能会形成沉淀，但不会影响 DNA 的提取。

Note: 在加入试剂之前，可将 Buffer P3/无水乙醇按照 1:2 的比例混匀后再加入，在保存时，注意将试剂的瓶盖拧紧。

9. 将 HiBind[®] DNA Mini column 套入到 2mL 收集管中, 转移步骤 8 中混合液 (包括形成的沉淀物) 至柱子中, 10,000xg 离心 1min, 弃滤液。

10. 将 HiBind[®] DNA Mini column 套回到 2mL 收集管中, 加入 650 μ l DNA Wash Buffer, 10,000xg 离心 1min, 弃滤液。

Note: DNA Wash Buffer 在使用前必须按照说明书加入无水乙醇稀释。

11. 将 HiBind[®] DNA Mini column 套回到 2mL 收集管中, 加入 650 μ l DNA Wash Buffer, 10,000xg 离心 1min, 弃滤液。

12. 将 HiBind[®] DNA Mini column 套回到 2mL 收集管中, 最大速度 (不超过 20,000xg) 空柱子离心干燥柱子基质。注意不要省略该步骤, 该步骤能除去残留的乙醇, 否则可能影响下游实验。

13. 将 HiBind[®] DNA Mini column 套入到 1.5mL 新的离心管中, 加入 100 μ l 在 65 $^{\circ}$ C 预热的 Elution Buffer (或 10mM Tris Buffer, pH8.5/9.0 或无菌去离子水), 室温静置 3-5min, 10,000xg 离心 1min, 洗脱 DNA; 过低的洗脱体积会导致产量降低, 不建议使用超过 200 μ l 的体积来洗脱。

14. 重复步骤 13, 再加入 100 μ l Elution Buffer, 可换用新的 1.5mL 离心管以确保第一次洗脱的高浓度。

TIP: 为了增加洗脱浓度, 加入洗脱液后可在 65 $^{\circ}$ C 孵育 5min 再洗脱, 也可将第一次的洗脱液吸回到柱子中进行第二次洗脱。

总 DNA 的产量与样品的数量和类型有关, 一般情况, 50mg 干燥组织能提取到 10-50 μ g 的 DNA, 其 A_{260}/A_{280} 在 1.7-1.9 之间。

B. 新鲜/冻存植物样品 DNA 提取方案

1. 称量 100mg 的植物组织, 加入到离心管中, 并加入 600 μ l Buffer P1, 最大速度涡旋将组织块打散, 否则 DNA 将无法提取;

TIP: 进行 4-6 个样品重复, 建议先用液氮将植物组织充分研磨, 加入 Buffer P1。如果有多个样品一起做, 加完一个样品后应立即进行步骤 2, 再做下一个样品。

2. 65 $^{\circ}$ C 孵育 10min, 孵育期间取出涡旋混匀 2 次;

3. 加入 140 μ l Buffer P2, 涡旋混匀, $\geq 10,000xg$ 离心 10min, 小心转移上清液至新的离心管中, 注意不要转移到沉淀物;

4. 加入 0.7 倍体积的异丙醇, 涡旋混匀, 加入异丙醇后无需孵育。

TIP: 该步骤能轻松转移到 600 μ l 上清液, 则需加入 420 μ l 异丙醇。注意需要根据转出上清液的体积调整异丙醇的加入量, 转移到新的离心管后, 需要测量上清液体积,

再加入正确体积的异丙醇。

5. 10,000xg 离心 2min 沉淀 DNA，延长离心时间不会提高产量。
6. 小心吸除上清液，注意不要吸掉 DNA 沉淀，将离心管倒置在吸水纸上 1min，等残留的液体流出，但没必要干燥 DNA 沉淀；
7. 加入 300 μ l 在 65 $^{\circ}$ C 预热的无菌去离子水，涡旋重悬沉淀，为有效溶解 DNA，可在 65 $^{\circ}$ C 短暂孵育。加入 4 μ l RNase A 混匀，RNase A 处理不需要额外的孵育；

TIPS: 1. 在 65 $^{\circ}$ C 孵育溶解 DNA 时，标记并将所需数量的 DNA 柱子放入到 2mL 收集管中。2. RNase A 可按比例加入到去离子水中，RNase A 在孵化时将保持稳定。

8. 加入 150 μ l Buffer P3 和 300 μ l 无水乙醇，涡旋混匀调节 DNA 与柱子的结合条件。加入乙醇后可能会形成沉淀，但不会影响 DNA 的提取。

Note: 在加入试剂之前，可将 Buffer P3/无水乙醇按照 1:2 的比例混匀后再加入，在保存时，注意将试剂的瓶盖拧紧。

9. 将 HiBind[®] DNA Mini column 套入到 2mL 收集管中，转移步骤 8 中混合液（包括形成的沉淀物）至柱子中，10,000xg 离心 1min，弃滤液。

10. 将 HiBind[®] DNA Mini column 套回到 2mL 收集管中，加入 650 μ l DNA Wash Buffer，10,000xg 离心 1min，弃滤液。

Note: DNA Wash Buffer 在使用前必须按照说明书加入无水乙醇稀释。

11. 将 HiBind[®] DNA Mini column 套回到 2mL 收集管中，加入 650 μ l DNA Wash Buffer，10,000xg 离心 1min，弃滤液。

12. 将 HiBind[®] DNA Mini column 套回到 2mL 收集管中，最大速度（不超过 20,000xg）空柱子离心干燥柱子基质。注意不要省略该步骤，该步骤能除去残留的乙醇，否则可能影响下游实验。

13. 将 HiBind[®] DNA Mini column 套入到 1.5mL 新的离心管中，加入 100 μ l 在 65 $^{\circ}$ C 预热的 Elution Buffer（或 10mM Tris Buffer，pH8.5/9.0 或无菌去离子水），室温静置 3-5min，10,000xg 离心 1min，洗脱 DNA；过低的洗脱体积会导致产量降低，不建议使用超过 200 μ l 的体积来洗脱。

14. 重复步骤 13，再加入 100 μ l Elution Buffer，可换用新的 1.5mL 离心管以确保第一次洗脱的高浓度。

TIP: 为了增加洗脱浓度，加入洗脱液后可在 65 $^{\circ}$ C 孵育 5min 再洗脱，也可将第一次的洗脱液吸回到柱子中进行第二次洗脱。

总 DNA 的产量与样品的数量和类型有关，一般情况，200mg 新鲜的植物组织能提取到 20-50 μ g 的 DNA，其 A_{260}/A_{280} 在 1.7-1.9 之间。

C. 植物 DNA 简短提取方案

1. 将样品转移到离心管中，加入 600 μ l Buffer P1 和 4 μ l RNase A，涡旋混匀，室温静置 1min;

干燥样品：最多使用 10mg，研磨后加入裂解液。

新鲜样品：最多使用 40mg 新鲜或冻存的组织，研磨后加入裂解液。

2. 在 65 $^{\circ}$ C 孵育 5min，期间取出涡旋混匀 1 次；

3. 加入 140 μ l Buffer P2，涡旋混匀， $\geq 10,000\times g$ 离心 10min；

4. 小心转移 600 μ l 上清液至新的离心管中，注意不要转移到沉淀。加入 0.5 倍体积的 Buffer P3 和等体积的无水乙醇，涡旋混匀，可能会形成沉淀，但不会影响到 DNA 的提取；

TIP：每个样品转移上清的体积可能有所不同，干燥的样品通常会更少。如转移出 600 μ l 上清液，则需加入 300 μ l Buffer P3 和 600 μ l 无水乙醇。

5. 将 HiBind[®] DNA Mini column 套入到 2mL 收集管中，转移 750 μ l 步骤 4 中混合液至柱子中，10,000 $\times g$ 离心 1min，弃滤液；

6. 重复步骤 5，直至将所有混合液转移过柱；

7. 将 HiBind[®] DNA Mini column 套入到 2mL 收集管中，加入 650 μ l DNA Wash Buffer，10,000 $\times g$ 离心 1min，弃滤液；

Note：DNA Wash Buffer 在使用前必须按照说明书加入无水乙醇稀释。

8. 重复步骤 7，再次加入 650 μ l DNA Wash Buffer 洗涤；

9. 将 HiBind[®] DNA Mini column 套回到 2mL 收集管中，最大速度空柱子离心 2min 干燥柱子基质。注意不要省略该步骤，该步骤能除去残留的乙醇，否则可能影响下游实验。

10. 将 HiBind[®] DNA Mini column 套入到 1.5mL 新的离心管中，加入 100 μ l 在 65 $^{\circ}$ C 预热的 Elution Buffer（或 10mM Tris Buffer，pH8.5/9.0 或无菌去离子水），室温静置 3-5min，10,000 $\times g$ 离心 1min，洗脱 DNA；过低的洗脱体积会导致产量降低，不建议使用超过 200 μ l 的体积来洗脱。

11. 重复步骤 10，再加入 100 μ l Elution Buffer，可换用新的 1.5mL 离心管以确保第一次洗脱的高浓度。

TIP：为了增加洗脱浓度，加入洗脱液后可在 65 $^{\circ}$ C 孵育 5min 再洗脱，也可将第一次的洗脱液吸回到柱子中进行第二次洗脱。

总 DNA 的产量与样品的数量和类型有关，一般情况该方案能提到 2-10 μ g 的 DNA。

真空抽滤方案:

Note: 实验前须仔细阅读前面的步骤说明。

1. 按照说明书前面的步骤处理干燥或新鲜的样品, 至将 DNA、Buffer P3 和乙醇混匀转移到柱子之前;
2. 按照说明书, 将真空抽滤盒和真空泵连接, 将柱子插入到真空抽滤盒上;
3. 将 DNA、Buffer P3 和乙醇混合液转移到柱子中, 打开真空泵, 直至所有混合液通过柱子, 关闭真空泵;
4. 加入 650 μ l DNA Wash Buffer, 打开真空泵, 直至所有混合液通过柱子, 关闭真空泵, 重复一遍该步骤;
5. 将 HiBind[®] DNA Mini column 从真空抽滤盒上取下, 套入到 1.5mL 新的离心管中, 加入 30-50 μ l 在 65 $^{\circ}$ C 预热的 Elution Buffer, 静置 1-2min, 离心洗脱 DNA。

中文翻译仅供辅助阅读, 详情请以英文说明书为准