

D5511 SP Plant DNA Kit

简易中文步骤

√实验前请按英文说明书正确稀释 SPW Wash Buffer 和 SP3 Buffer。

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

货号	加入量
D5511-00	20mL
D5511-01	80mL
D5511-02	80mL (每瓶)

➤ 使用【无水乙醇】对 SP3 Buffer 进行稀释，稀释后室温保存

货号	加入量
D5511-00	4mL
D5511-01	80mL
D5511-02	100mL (每瓶)

提取步骤：（干燥样品）

1. 准备干燥的样本组织，方法参考英文说明书第 7-8 页；
2. 将 10-30mg 的组织粉末转移到新的 1.5mL 离心管中；
3. 加入 600μl SP1 Buffer 和 5μl RNase A，最大速度涡旋混匀，使用 SP1 Buffer 和 RNase A 之前不要混匀；

Note: 确保样品完全悬浮，且溶液中没有结块，否则将影响提取产量。

4. 将离心管放入到 65°C 孵育 10min，期间取出离心管进行颠倒混匀两次；
5. 加入 210μl SP2 Buffer，最大速度涡旋混匀；
6. 冰浴 5min，最大速度 ($\geq 10,000 \times g$) 离心 10min；
7. 将 Homogenizer Column 放入到 2mL 收集管中，小心转移上清至 Homogenizer Column 中，注意不要转移到沉淀，最大速度离心 2min；

Note: 延长离心时间不能提高产量。Homogenizer Column 可以去除大部分残留的沉淀物和细胞碎片，但仍然有少量杂质可以通过 Homogenizer Column 并在收集管中形成沉淀，在步骤 8 中请勿转移沉淀。

8. 转移澄清的裂解液到新的 1.5mL 离心管，注意不要转移到沉淀，测量转移的体积；
9. 加入裂解液 1.5 倍体积的 SP3 Buffer，涡旋混匀，此时可能形成沉淀物，但不会影响到 DNA 的分离，可以使用注射器吹打将其打散混匀；

Note: SP3 Buffer 在使用前必须使用无水乙醇稀释备用。

10. 将 HiBind® DNA Mini Column 套入到 2mL 收集管中, 转移 650µl 混合裂解液到 HiBind® DNA Mini Column 中, 最大速度离心 1min, 弃滤液;

11. 重复步骤 10, 直到将混合裂解液全部转移过柱;

12. 将 HiBind® DNA Mini Column 套入到 2mL 收集管中, 加入 650µl SPW Wash Buffer 到 HiBind® DNA Mini Column 中, 最大速度离心 1min, 弃滤液;

Note: SPW Wash Buffer 在使用前必须使用无水乙醇稀释备用。

13. 重复步骤 12 用 SPW Wash Buffer 进行第二次洗涤;

14. 将 HiBind® DNA Mini Column 套入到 2mL 收集管中, 最大速度空柱子离心 2min 干燥;

Note: 对柱子的干燥很重要, 否则残留的乙醇可能影响下游实验。

15. 将 HiBind® DNA Mini Column 套入到新的 1.5mL 离心管中, 加入 50-100µl 65°C 预热的 Elution Buffer, 室温放置 3-5min, 最大速度离心 1min;

16. 将 Elution Buffer 重新加回到柱子中, 重复步骤 15;

Note: 每次洗脱可以与其中 60-70% 的 DNA 结合, 两次洗脱可结合 90% 的 DNA。

但是, 增大洗脱体积会降低最终产量的浓度, 在一些情况下, 在加入洗脱液后, 可以在 65°C 孵育以提高产量。

17. 保存含有 DNA 的洗脱液到 -20°C 中。

提取步骤: (新鲜/冻存样品)

1. 准备新鲜/冷冻样品, 方法参考英文说明书第 7-8 页;

2. 转移 50mg 样品到新的 1.5mL 离心管中, 加入 400µl SP1 Buffer 和 5µl RNase A, 最大速度涡旋混匀;

Note: 先从提取 50mg 组织开始, 如果效果良好, 再将样品量增加至 100mg; SP1 Buffer 和 RNase A 在使用之前请勿混匀; 涡旋要确保样品完全悬浮且溶液中无菌团, 菌团的存在将降低产量。

3. 在 65°C 孵育 10min, 孵育期间取出颠倒混匀 2 次;

4. 加入 140µl SP2 Buffer, 最大速度涡旋混匀;

5. 冰浴 5min, 最大速度 ($\geq 10,000 \times g$) 离心 10min;

6. 将 Homogenizer Column 套入到 2mL 收集管中, 小心转移上清液至 Homogenizer Column, 注意不要转移到沉淀, 最大速度离心 2min;

Note: 延长离心时间不能提高产量, Homogenizer Column 可以去除大部分残留的沉淀物和细胞碎片, 但仍然有少量杂质可以通过 Homogenizer Column 并在收集管

中形成沉淀，请勿转移沉淀。

7. 转移澄清的裂解液到新的 1.5mL 离心管，注意不要转移到沉淀，测量转移的体积；
8. 加入裂解液 1.5 倍体积的 SP3 Buffer，涡旋混匀，此时可能形成沉淀物，但不会影响到 DNA 的分离，可以使用注射器吹打将其打散混匀；

Note: SP3 Buffer 在使用前必须使用无水乙醇稀释备用。

9. 将 HiBind® DNA Mini Column 套入到 2mL 收集管中，转移 650µl 混合裂解液到 HiBind® DNA Mini Column 中，最大速度离心 1min，弃滤液；

10. 重复步骤 9，直到将混合裂解液全部转移过柱；

11. 将 HiBind® DNA Mini Column 套入到 2mL 收集管中，加入 650µl SPW Wash Buffer 到 HiBind® DNA Mini Column 中，最大速度离心 1min，弃滤液；

Note: SPW Wash Buffer 在使用前必须使用无水乙醇稀释备用。

12. 重复步骤 11 用 SPW Wash Buffer 进行第二次洗涤；

13. 将 HiBind® DNA Mini Column 套入到 2mL 收集管中，最大速度空柱子离心 2min 干燥；

Note: 对柱子的干燥很重要，否则残留的乙醇可能影响下游实验。

14. 将 HiBind® DNA Mini Column 套入到新的 1.5mL 离心管中，加入 50-100µl 65°C 预热的 Elution Buffer，室温放置 3-5min，最大速度离心 1min；

15. 将 Elution Buffer 重新加回到柱子中，重复步骤 14；

Note: 每次洗脱可以与其中 60-70% 的 DNA 结合，两次洗脱可结合 90% 的 DNA。

但是，增大洗脱体积会降低最终产量的浓度，在一些情况下，在加入洗脱液后，可以在 65°C 孵育以提高产量。

16. 保存含有 DNA 的洗脱液到 -20°C 中。

中文翻译仅供辅助阅读，详情请以英文说明书为准