

目 录

简 介-----	2
原 理-----	2
试剂盒组成-----	3
准备工作-----	5
方案 1:植物组织DNA 中量抽提-----	8
方案 2:植物组织 DNA 大量抽提-----	10
方案 3:植物组织 DNA 高通量抽-----	12
方案 4:植物 DNA 高通量负压抽滤操作-----	14
常见问题回答-----	16

版本: 2018-01

简介

HiPure SF Plant DNA Kits 为植物组织 DNA 小量，中量，大量以及高通量抽提提供一种安全快速的解决方案。试剂盒基于硅胶柱纯化技术和 SDS/KAC 预处理方式，提取过程中无需使用有毒的酚氯仿抽提，也无需进行耗时的醇类沉淀，整个提取过程只需 30-50 分钟。得到的 DNA 可直接用于 PCR, SSR, AFLP, RAPD, 以及 Southern blot 等实验。

试剂盒	Mini Kit	Midi Kit	Maxi Kit	96 Kit
编号	D3164	D3165	D3165	D3167
新鲜组织	100mg	0.5-1g	2-5g	50mg
干燥组织	20mg	200mg	1g	10mg
结合能力	100 μ g	500 μ g	2mg	50 μ g
柱型	1.5ml 柱	15ml 柱	50ml 柱	96 孔板
样品类型	经济型植物的叶片、茎、根块和种子，草本类植物和部分木本类植物样品的叶片、茎、根块和种子，以及真菌类样品。			

注：处理富含多糖多酚类样品，请使用 HiPure Plant DNA Kit。

原理

HiPure 硅胶柱是采用高结合力的玻璃纤维滤膜为基质。滤膜在高浓度离子化剂(如盐酸胍或异硫氰酸胍)条件下，可通过氢键和静电吸附核酸，而蛋白质或其它杂质不被吸附而去除，吸附了核酸的滤膜经洗涤液去除蛋白质和盐，最后可以用低盐缓冲液(如 Buffer TE)洗脱出滤膜上吸附核酸。得到的核酸纯度高，可直接用于各种下游各种实验。

HiPure SF Plant DNA Kits 基于硅胶柱纯化方式。样品经液氮或研磨仪匀浆后，在含 SDS 裂解液中裂解，DNA 释放到裂解液中。经高盐溶液沉淀去除多糖等杂质后，加入乙醇，转移至柱子中过滤，DNA 被吸附到柱子的膜上，而蛋白质则不被吸附而去除。柱子经 Buffer GW2 洗涤去除盐分，最后 DNA 经 Buffer AE 洗脱。得到的 DNA 可直接用于 PCR, SSR, AFLP, RAPD, 以及 Southern blot 等实验。

组 成

HiPure SF Plant DNA Midi Kit

产品编号	D3165-01	D3165-02	D3165-03
纯化次数	2 次	10 次	50 次
HiPure gDNA Midi Columns	2	10	50
1.5ml Collection Tubes	2	10	50
Buffer SPL	15 ml	60 ml	270 ml
Buffer PS	5 ml	20 ml	90 ml
Buffer PBD*	10 ml	40 ml	200 ml
Buffer GW2*	6 ml	20 ml	50 ml
RNase A	5 mg	10 mg	45 mg
Protease Dissolve Buffer	1.8 ml	1.8 ml	5 ml
Buffer AE	5 ml	15 ml	60 ml
说明书	1	1	1

HiPure SF Plant DNA Maxi Kit

产品编号	D3166-01	D3166-02	D3166-03
纯化次数	2 次	10 次	50 次
HiPure gDNA Maxi Columns	2	10	50
50ml Collection Tubes	2	10	50
Buffer SPL	40 ml	180 ml	2x400 ml
Buffer PS	10 ml	60 ml	280 ml
Buffer PBD*	20 ml	100 ml	6 x 100 ml
Buffer GW2*	20 ml	50 ml	3 x 100 ml
RNase A	5 mg	20 mg	90 mg
Protease Dissolve Buffer	1.8 ml	1.8 ml	5 ml
Buffer AE	5 ml	15 ml	60 ml

HiPure SF Plant DNA 96 Kit

产品编号	D3167-01	D3167-02	D3167-03
纯化次数	1 x 96	4 x 96	20 x 96
HiPure gDNA Plate	1	4	20
2ml Collection Plate	1	4	20
Buffer SPL	60 ml	210 ml	2 x 550 ml
Buffer PS	20 ml	70 ml	400 ml
Buffer PBD*	40 ml	200 ml	3 x 200 ml
Buffer GW2*	2 x 20 ml	3 x 50 ml	5 x 100 ml
RNase A	20 mg	75 mg	340 mg
Protease Dissolve Buffer	5 ml	15 ml	30 ml
Buffer AE	30 ml	120 ml	2 x 250 ml
说明书	1	1	1

*: Buffer GW2 使用前，须按瓶子标签所示或加入 4 倍体积的无水乙醇进行稀释。

保质期

本产品室温(15~25℃)可保存 18 个月。低温下，Buffer SPL 可能会有沉淀形成，需 65℃ 水浴让沉淀完全溶解。RNase A 室温运输和保存，长期贮藏(>3 个月)建议保存于 -20~8℃。

需要准备材料和工具

- 无水乙醇(96-100%)
- 灭菌 2ml 离心管(Mini), 15ml 离心管(Midi)或 50ml 离心管(Mixi) 和移液枪头
- Mini:小型离心机(<12,000xg) ; Midi,Maxi: 中型离心机(4000xg), 96 孔板: 3000xg 96 孔离心机
- 65℃水浴锅
- 研钵或其它匀浆工具
- 用无水乙醇稀释 Buffer GW2, 并于室温保存。
- (可选)PVP-40
- 按瓶子标签所示, 加入 2 倍体积的无水乙醇至 Buffer PBD 中, 于室温保存。
- 溶解 RNase A (15mg/ml): 加入适量的 Buffer AE 溶解 RNase A 至终浓度为 15mg/ml, 颠倒混匀让 RNase A 充分溶解。RNase A 干粉可在室温下, 但溶解的 RNase A 须保存于-20~8℃。

方案 1. 植物 DNA 中量提取(D3165)

该方案适合于从各种 1g 新鲜/冻藏植物样品或 0.2g 干燥的植物样品，种子样品提取纯度的总 DNA。纯化的 DNA 包括基因组 DNA、线粒体和叶绿体 DNA。以下离心都在室下进行。

1. 用液氮把植物样品研磨成细小的粉末。**转移 0.5-1g 新鲜样品或 125-250mg 干燥样品至 15ml 离心管中。**

正确使用组织用量，才能获得理想结果。过量样品会造成柱子堵塞，而引起产量和纯度下降。由于植物样品 DNA 和其它代谢物质含量差异很大。初次实验时，我们推荐使用 500mg 新鲜样品或 125mg 干燥样品，根据实验结果再调整组织用量。

2. **立即加入 5ml Buffer SPL 至样品中。**剧烈涡旋使样品充分分散。65°C 处理 15-30 分钟，期间涡旋混匀 2-3 次。

使用前按 1ml Buffer SPL 加入 20 μ l 2-巯基乙醇，以提高裂解液抗氧化的能力，防止多酚类氧化。

3. **加入 1.7ml Buffer PS 至样品中。**涡旋混匀 15 秒，冰上放置 10 分钟。

4. 3,000-5,000 \times g 离心 15 分钟。

5. 小心转移 5ml 上清液至新的离心管中，加入 50 μ l RNase A 至上清液中。颠倒混匀，室温静置 15 分钟。

6. **加入 7.5ml Buffer PBD 至上清液，**涡旋混匀 15 秒，若出现明显的絮状沉淀，用移液枪吸打尽量打散沉淀。

Buffer PBD 在使用前须加入 2 倍的无水乙醇进行稀释。按瓶子标签指示进行稀释。

7. 把 HiPure DNA 中量柱装在 15ml 收集管中。**转移 3.5ml 混合液至柱子中。**4,000 \times g 离心 3 分钟。

8. 倒弃滤液把柱子装回收集管中。把剩余混合液转移至柱子。4,000 \times g 离心 3 分钟。重复此步直到所有混合液都转移至柱子中并过滤。

9. 倒弃滤液把柱子装回收集管。**加入 3ml Buffer GW2(已用无水乙醇稀释)至柱子中，**4,000 \times g 离心 3 分钟。

Buffer GW2 在使用之前须用无水乙醇进行稀释。按瓶子标签指示进行稀释。

10. 倒弃滤液把柱子装回收集管。**加入 3ml Buffer GW2(已用无水乙醇稀释)至柱子中，**

4,000 x g 离心 3 分钟。

11. 倒弃滤液把柱子装回收集管。4,000 x g 离心 15 分钟去除柱子中残留的乙醇。
12. 将柱子转移至新的 15ml 离心管中。**加入 500 μ l 预热到 65 $^{\circ}$ C Buffer AE 至柱子的膜中央。**室温静置 3 分钟。4,000 x g 离心 3 分钟。
13. **再加入 250 μ l 预热到 65 $^{\circ}$ C Buffer AE 至柱子的膜中央。**室温静置 3 分钟。4,000 x g 离心 3 分钟。
14. 丢弃 DNA 结合柱，把 DNA 保存于-20 $^{\circ}$ C 或-80 $^{\circ}$ C。

方案 3. 植物 DNA 大量提取(D3166)

该方案适合于从各种 5g 新鲜/冻藏植物样品、或 1g 干燥的植物样品，种子提取高纯度的总 DNA。纯化的 DNA 包括基因组 DNA 和叶绿体 DNA。以下离心都在室温下进行。

1. 用液氮把植物样品研磨成细小的粉末。**转移 2.5-5g 新鲜样品或 0.3-1g 干燥样品至 50ml 离心管中。**

正确使用组织用量，才能获得理想结果。过量样品会造成柱子堵塞，而引起产量和纯度下降。由于植物样品 DNA 和其它代谢物质含量差异很大。初次实验时，我们推荐使用 2.5g 新鲜样品或 500mg 干燥样品，根据实验结果再调整组织用量。

2. **立即加入 12 ml Buffer SPL 至样品中。**剧烈涡旋使样品充分分散，65 $^{\circ}$ C 处理 15-30 分钟，期间涡旋混匀 2-3 次。

使用前，按 1ml Buffer SPL 加入 20 μ l 2-巯基乙醇，以提高裂解液抗氧化的能力，防止多酚类氧化。

3. **加入 4 ml Buffer PS 至样品中。**高速涡旋混匀 15 秒。冰上放置 10 分钟。

4. 室温下，3,000-5,000 x g 离心 20 分钟。

5. 小心转移上清液至新的离心管中，加入 100 μ l RNase A 至上清液中。颠倒混匀，室温静置 15 分钟。

6. **加入 1.5 倍体积 Buffer PBD(已加无水乙醇)至上清液中。**涡旋 15 秒混匀，若出现明显的絮状沉淀，使移液枪吸打打散沉淀。

Buffer PBD 在使用前须加入 2 倍的无水乙醇进行稀释。按瓶子标签指示进行稀释。

7. 把 HiPure gDNA Maxi Column 装在收集管中。**转移混合液(<20ml)至柱子中。**4,000 x g 离心 5 分钟。
8. 倒弃滤液把柱子装回收集管。把剩余混合液转移至柱子。4,000 x g 离心 5 分钟。重复此步直到把所有混合液都转移至柱子中过滤完毕。
9. 倒弃滤液把柱子装回收集管。加入 10ml Buffer GW2 至柱子中。4,000 x g 离心 5 分钟。
Buffer GW2 在使用之前须用无水乙醇进行稀释。按瓶子标签指示进行稀释。
10. 倒弃滤液把柱子装回收集管。加入 10ml Buffer GW2 至柱子中。4,000 x g 离心 5 分钟。
11. 倒弃滤液把柱子装回收集管。4,000 x g 离心 10 分钟去除柱子中残留的乙醇。
HiPure DNA Maxi Column 柱子底部采用封闭的抽滤设计，第 11~14 步的离心操作必须在水平/桶式离心机中进行操作，并将离心力调至最大。
12. 取出吸附柱，室温干燥 10 分钟。
13. 将柱子转移至新的 50ml 离心管中。**加入 800 μ l 预热到 65 $^{\circ}$ C Buffer AE 至柱子的膜中央。**室温静置 3 分钟。4,000 x g 离心 5 分钟。
14. **再加入 600 μ l 预热到 65 $^{\circ}$ C Buffer AE 至柱子的膜中央。**室温静置 3 分钟。4,000 x g 离心 5 分钟。
15. 丢弃 DNA 结合柱，把 DNA 保存于-20 $^{\circ}$ C。

方案 4. 植物 DNA 96 提取(D3167)

该方案适合于从 50mg 新鲜/冻藏植物样品，或 10mg 干燥的植物样品，种子提取高纯度的总 DNA。纯化的 DNA 包括基因组 DNA 和叶绿体 DNA。

1. 转移 \leq 50mg 新鲜样品或 \leq 10mg 干燥样品至 1.2 ml 96 板中。
2. 采用高通量珠磨仪对样品进行匀浆。推荐使用 Gene Grinder 2010，或 Bead Mixer 300 等。

3. **立即加入 400 μ l Buffer SPL 和 10 μ l RNase A 至样品中。**剧烈振荡使样品充分分散。使用前按 1ml Buffer SPL 加入 20 μ l 2-巯基乙醇，提高裂解液抗氧化的能力，防止多酚氧化而降低 DNA 产量。
4. 65°C 处理 15 分钟，期间涡旋混匀 1 次。
5. **加入 140 μ l Buffer PS 至样品中。**涡旋 60 秒混匀。 -20°C 放置 10 分钟。
6. 4,000 \times g 离心 15 分钟。小心转移上清液至新的 96 孔板中。
7. **加入 1.5 倍体积的 Buffer PBD，立即涡旋混匀 15 秒。**
Buffer PBD 在使用前须加入 2 倍的无水乙醇进行稀释。按瓶子标签指示进行稀释。
8. 把 HiPure DNA Plate 装在 2ml 收集板中。**转移混合液至 96 孔板中。**4,000 \times g 离心 5 分钟。
9. 倒弃滤液把 96 孔板装回收集板中。把剩余混合液转移至 96 孔板中。4,000 \times g 离心 5 分钟。
10. 倒弃滤液把 96 孔板装回收集板中。**加入 650 μ l Buffer GW2 至 96 孔板的每个孔中。**4,000 \times g 离心 5 分钟。
Buffer GW2 在使用之前，必须用无水乙醇进行稀释。按瓶子标签或说明书第 4 页进行稀释。
11. 倒弃滤液把 96 孔板装回收集板中**加入 650 μ l Buffer GW2 至 96 孔板的每个孔中。**4,000 \times g 离心 5 分钟。
12. 倒弃滤液把 96 孔板装回收集板中。 4,000 \times g 离心 10 分钟去除 96 孔板中残留的乙醇。
13. **将 96 孔板转移至 DNA 收集板中。加入 75 μ l 预热到 65°C Buffer AE 至柱子的膜中央。**室温静置 5 分钟。4,000 \times g 离心 5 分钟。
14. **再加入 75 μ l 预热到 65°C Buffer AE 至柱子的膜中央。**室温静置 5 分钟。4,000 \times g 离心 5 分钟。

方案 5. 植物 DNA 96 负压抽滤操作(D3167)

该方案适合于从 50mg 新鲜/冻藏植物样品，或 10mg 干燥的植物样品，种子提取高纯度的总 DNA。纯化的 DNA 包括基因组 DNA 和叶绿体 DNA。

1. 转移 $\leq 50\text{mg}$ 新鲜样品或 $\leq 10\text{mg}$ 干燥样品至 1.2 ml 96 板中；
2. 采用高通量珠磨仪对样品进行匀浆。推荐使用 Gene Grinder 2010，或 Bead Mixer 300 等。
3. **立即加入 400 μl Buffer SPL 和 5 μl RNase A，盖上盖子。剧烈振荡使样品充分分散。**
使用前按 1ml Buffer SPL 加入 20 μl 2-巯基乙醇，提高裂解液抗氧化的能力，防止多酚氧化而降低 DNA 产量。Buffer SPL 和 RNase A 可预合。
4. 65°C 处理 10 分钟。期间涡旋混匀 1 次。
5. **加入 140 μl Buffer PS，涡旋 15 秒混匀。-20°C 放置 10 分钟。**
6. 4,000 \times g 离心 10 分钟。小心转移 400 μl 上清液至新的 96 孔板中。
若上清液体积不够 400 μl ，按比例调整 Buffer PBD 的用量。
7. **加入 1.5 倍体积的 Buffer PBD(已加无水乙醇)，立即涡旋混匀 15 秒。**
Buffer PBD 在使用前须加入 2 倍的无水乙醇进行稀释。按瓶子标签指示进行稀释。
8. 连接好 96 孔真空抽滤盒与真空泵；把废液收集槽放置在真空抽滤盒的底盒中；
9. 盖上真空抽滤盒上盖，把 96 孔结合板放置真空抽滤盒的上盖中；
10. 把第六步获得的混合液转移至 96 孔板中；打开真空泵，用手用力压住 96 孔板，当真空泵压力上升后，轻开手。抽滤 3-5 分钟让裂解液完全过滤。
11. 关闭真空泵。每孔中**加入 800 μl Buffer GW2(已用乙醇稀释)**。打开真空泵，用手用力压住 96 孔板，当真空泵压力上升后，轻开手。抽滤 3-5 分钟让裂解液完全过滤。
Buffer GW2 在使用之前，必须用无水乙醇进行稀释。按瓶子标签或说明书第 4 页进行稀释。
12. 关闭真空泵。每孔中**加入 800 μl Buffer GW2(已用乙醇稀释)**。打开真空泵，用手用力压住 96 孔板，当真空泵压力上升后，轻开手。抽滤 3-5 分钟让裂解液完全过滤。
13. 不要关闭真空泵，以最大的压力抽滤 15 分钟以干燥 96 孔板。
14. 关闭真空泵，打开真空抽滤盒，取出废液收集槽，把 2ml 收集板放在抽滤盒底部，

盖回上盖。

15. **每孔加入 75 μ l 预热至 65 $^{\circ}$ C Buffer AE 至膜中央。**室温放置 5 分钟。打开真空泵，用手用力压住 96 孔板，当真空泵压力上升后，轻开手。抽滤 3-5 分钟让裂解液完全过滤。
16. **关闭真空泵。每孔再加入 75 μ l 预热至 65 $^{\circ}$ C Buffer AE 至膜中央。**室温放置 5 分钟。打开真空泵，用手用力压住 96 孔板，当真空泵压力上升后，轻开手。抽滤 3-5 分钟让裂解液完全过滤。
17. 关闭真空泵。打开真空抽滤盒。取出收集板，贴上封口膜。把 DNA 保存 2-8 $^{\circ}$ C，长期保存需保存于-20 $^{\circ}$ C 或-80 $^{\circ}$ C。

常见问题解答

该列表可能有利于解决提取过程所碰到的问题。Magen 技术人员可以随时为您提供服务，若您对试剂盒存在问题或建议，或您在分子生物学碰到问题，都请您联系我们。我们将竭尽全力为您排忧解难。

现象	原因及解决方法
柱子堵塞	
转移上清液时带有太多沉淀	在下一次提取过程中，转移上清液时不要吸到沉淀物。若吸到沉淀物，可把上清液再离心一次。
裂解液非常粘稠	某些植物样品中含有丰富的粘液和高分子多糖，会让裂解液变得非常粘稠。减少样品用量或加入 Buffer PTL 的用量。
离心速度太低	提高离心速度
加入氯仿后，混匀不够	在下次制备时，加入氯仿时一定要剧烈振荡混匀。充分混匀时，溶液变成均一的乳白状。
DNA 产量低	
样品匀浆不充分	用液氮将样品研磨细小的粉末状。或延长珠磨仪的研磨时间和速度。
样品裂解不充分	加入 Buffer PTL 后，没有让植物样品充分分散。而涡旋无法让样品充分分散，可用移液枪吸打几次。
不正确的结合条件	计算上清液的体积，加入正确的 Buffer PL 和无水乙醇。
洗脱效率不够	洗脱时 Buffer AE 预热至 65°C，并加到膜中央，室温放置 3 分钟。Buffer AE 的洗脱体积不够。
Buffer GW2 中乙醇没有加入或加入量不够	按说明书或瓶子标签所示，加入正确的乙醇。
柱子没有空甩	柱子必须空甩 2-3 分钟以去除膜上残留的乙醇。