

## AmPure DNA Plus Kit

(快速从各种生物样品中制备 DNA 用于 PCR)

### 简介

Magen 公司的 AmPure 产品系列采用独特的溶液系统，可快速地从各种生物样品中快速制备 DNA，用于 PCR。该系统只需对样品进行简单的处理，无需抽提纯化，得到的裂解液可直接用于各种 PCR，对 Taq 酶和反应液无特别要求。AmPure DNA Kit 适合于从各种生物样品中，包括动物组织、植物叶片、种子、细菌培养液、血液、唾液等样品中快速制备 DNA，用于 PCR。

### 组成

#### ● AmPure DNA Plus Kit

产品成分	D7115-01	D7115-02	D7115-03
制备次数	100 次	200 次	2000 次
Buffer AD	10 ml	22 ml	220 ml
2 x PCR Mixture	1 ml	2 x 1 ml	20 x 1 ml

### 保存条件

Buffer AD 可在 2~8°C 度保存 18 个月，每次使用完毕后，尽快盖紧瓶盖，以防止空气中的 CO<sub>2</sub> 与 Buffer AD 中的成分反应。

### 注意事项

- 样品体积不能超过 PCR 反应体积的 10%。若样品体积超过 PCR 反应体积的 10%。
- 细菌、动物组织或拭子样品可能会释放出大量的核酸和杂质。过量的核酸和杂质会抑制 PCR，用灭菌水稀释样品，或下一次提取时，加大 Buffer AD 的用量。
- 组织/细菌的裂解产物可以在室温存放 1 个月，不影响扩增结果。
- 处理动物组织/植物组织/阴性细菌等样品，室温放置 15 分钟就可以得到足量的 DNA，用于 PCR 检测。
- 处理难裂解的病毒或微生物，加温有利于释放更多的 DNA。

### DNA 快速制备步骤

#### 方案 A: 动物组织

1. 转移 1~10mg 组织块或 10 $\mu$ l 组织匀浆液至 1.5ml 离心管中。  
可选：把组织块剪成小碎片，有利于 DNA 释放提高 DNA 得率。
2. 加入 100 $\mu$ l Buffer AD 至样品中，混匀。室温或 80°C 温育 15 分钟。
3. 转移 1~2 $\mu$ l 产物至 PCR 反应液。  
样品体积不要超过 PCR 反应液的 10 倍体积。由于组织含有大量的 DNA，过量的 DNA 会抑制 PCR，可以用灭菌水将样品稀释 3~1 倍。

#### 方案 B: 植物组织

1. 转移 5~20mg 植物样品至 1.5ml 离心管中。  
可选：把植物块剪成小碎片，有利于 DNA 释放提高 DNA 得率。
2. 加入 100 $\mu$ l Buffer AD 至样品，涡旋混匀。室温或 80°C 温育 15 分钟。
3. 涡旋混匀，转移 1~2 $\mu$ l 产物至 PCR 反应液。  
样品体积不要超过 PCR 反应液的 10 倍体积。由于组织含有大量的 DNA，过量的 DNA 会抑制 PCR，可以用灭菌水将样品稀释 3~10 倍。

#### 方案 C: 细菌/真菌类样品

1. 10,000 x g 离心 1~3 分钟收集适量细菌沉淀，去除液体。
2. 加入 0.1ml Buffer AD 至样品中，涡旋打散沉淀。80~90°C 温育 10 分钟。
3. 转移 1~2 $\mu$ l 反应液至 PCR 反应液。  
样品体积不要超过 PCR 反应液的 10 倍体积。

#### 方案 D: 血液/血清/血浆/唾液样品

1. 加入 10 $\mu$ l 血液、拭子浸泡液、唾液等液体样品至 1.5ml 离心管中。加入 0.1ml Buffer AD，混匀。室温放置 10~15 分钟。
2. 转移 1~2 $\mu$ l 反应液至 PCR 反应液。  
样品体积不要超过 PCR 反应液的 10 倍体积。

## Section B. PCR 扩增

### 1. 按下表在冰上配制 PCR 反应液:

试剂	体积
灭菌水	~ $\mu\text{l}$
2 x Taq MasterMix	10 $\mu\text{l}$
上游引物(10 $\mu\text{m}$ )	0.5 $\mu\text{l}$
下游引物(10 $\mu\text{m}$ )	0.5 $\mu\text{l}$
DNA 抽提液	1-2 $\mu\text{l}$
总体积	20 $\mu\text{l}$

### 2. 混匀;

### 3. 按下表设定 PCR 仪的程序:

步骤	温度	时间	循环数
初始变性	94°C	3 分钟	1
变性	94°C	0.5-1 分钟	30-35 循环
退火	45-68°C	0.5-1 分钟	
延伸	72°C	1-2 分钟	
最后延伸	72°C	10 分钟	1
保存	4°C	For ever	

### 4. 当 PCR 预热上 94°C 时, 暂停 PCR 仪, 把样品放入 PCR 仪中, 立即进行扩增。

### 5. 反应结束后, 取 3-5 $\mu\text{l}$ PCR 产物上样于 1.5-2%琼脂糖凝胶上电泳分析结果。

## Section C. 常见问题回答

### ● 扩增条带很弱或没有?

1. 样品中含有大量的抑制因子: 用 1:1 DLB Buffer/IRB Buffer 稀释 DNA。若需验证是否存在抑制因子, 可 DNA 粗制液加入 100-500 个拷贝的已知的基因模块, 再进行 PCR。
2. 裂解不够: 使用研磨杵对样品进行匀浆, 延长 55°C 的水浴时间;
3. PCR 参数设计不够合理; 改变退火温度, 延伸时间, 延长循环数等;

### ● 组织样品没有被消化?

该方法并不要求消化所有的样品。但若需要提高 DNA 的产量, 可对样品进行匀浆和延长 55°C 的水浴时间来提高消化效果, 提高 DNA 的得率。

### ● 口腔拭子吸掉了所有的消化液

由于该方法反应液较少, 采用棉质或涤纶的拭子可能会吸掉很多消化液。我们建议尽量采用发泡质的拭子以减少裂解液的损失。处理棉质或涤纶拭子, 可加入 DLB Buffer 至 300 $\mu\text{l}$ 。

### ● 扩增条带不特异?

1. 采用热启动 Taq 酶, 以提高特异性;
2. 若使用 Taq MasterMix, 必须在冰上配制反应液, 并待 PCR 仪升温至 94°C 后, 再把 PCR 反应液转移至 PCR 仪中, 以减少非特异性的扩增。
3. 用 Touchdown PCR 技术, 减少非特异性的扩增。