

## 植物/真菌基因组 DNA 小量提取试剂盒

### 一、产品简介

本试剂盒不使用氯化苯、苯酚、氯仿等有害有机溶剂。

研磨破碎细胞后 Buffer PFG1 释放 DNA, RNase A1 降解 RNA, 加入 Buffer PFG2 离心沉淀去除组织碎片、大部分多糖、多酚和色素; 离心上清加入 Buffer PFG3 分相进一步去除多糖、多酚和色素; 加异丙醇调整结合条件后, 通过 DNA 吸附柱(硅胶材料)选择性吸附 DNA 的方法回收 DNA。

本试剂盒适合从 ≤100mg 新鲜植物、真菌组织, 或者 ≤25mg 干燥的植物、真菌组织, 或者 ≤5×10<sup>7</sup> 真菌细胞中提取 DNA。获得的 DNA 去除大部分多糖、多酚和色素等杂质, 适用于 PCR 等常规实验。

### 二、试剂盒组成和储存

组成内容	DK711-01	DK711-02
RNase A1*	0.25 ml	1 ml
Buffer PFG1	60 ml	240 ml
Buffer PFG2	8 ml	30 ml
Buffer PFG3	8 ml	30 ml
Buffer WAG	30 ml	120 ml
Buffer WB1 <sup>§</sup>	16 ml	65 ml
DNA 吸附柱-C30	50 个	200 个
收集管	50 个×3	200 个×3
1.5 ml 离心管(用于洗脱)	50 个	200 个
TE <sup>**</sup>	30 ml	120 ml
说明书	1 份	1 份

\*RNase A1: 50 mg/ml, -20℃长期保存。

<sup>§</sup> Buffer WB1: 第一次使用前按试剂瓶所示体积加入无水乙醇或者95%乙醇, 混合均匀。

\*\*TE: 10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, 0.25%NaN<sub>3</sub>, pH 8.0(25℃)。

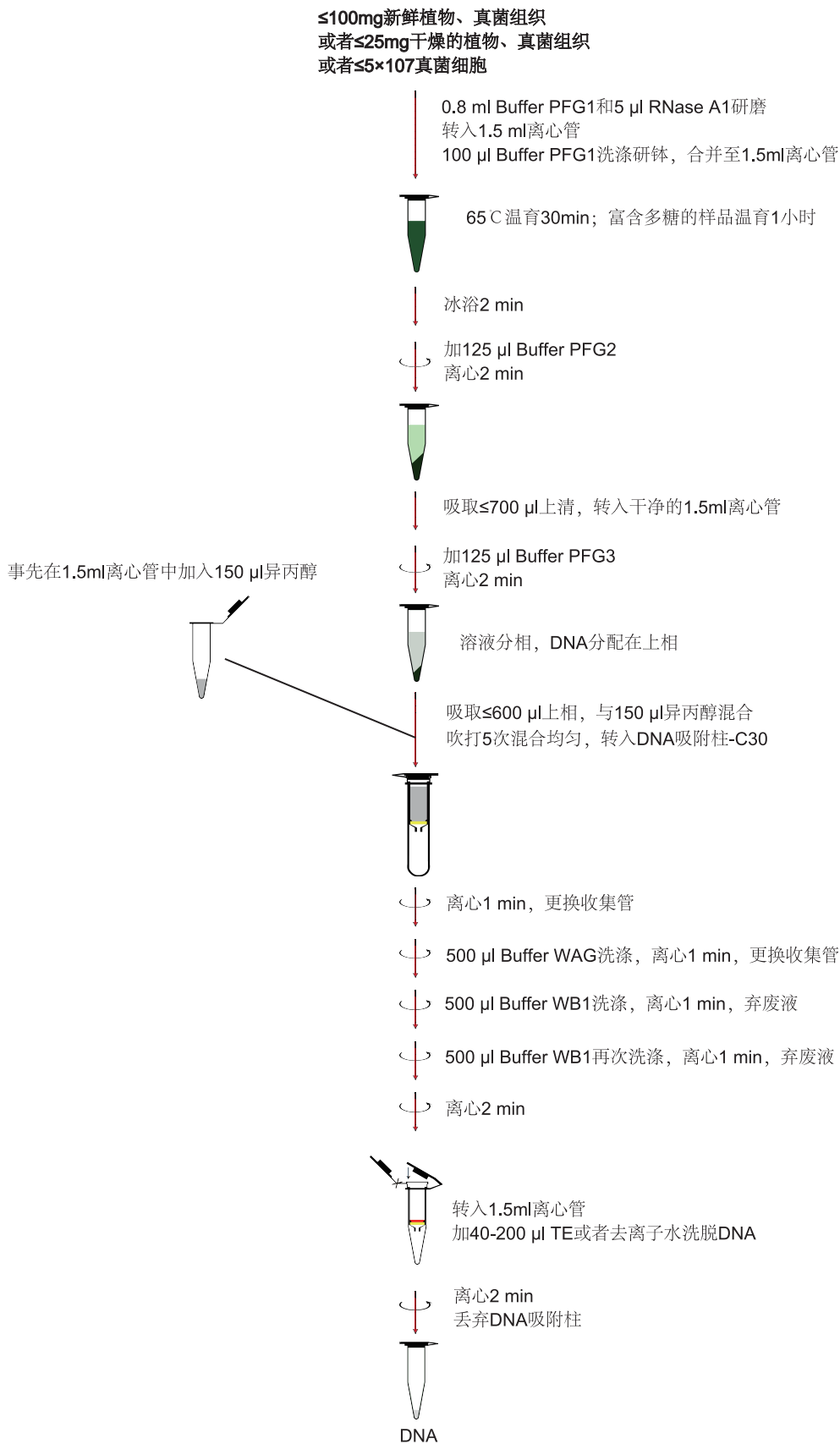
### 三、安全注意事项

1. Buffer PFG1、Buffer PFG2、Buffer PFG3 和 Buffer WAG 含刺激性化合物, 避免沾染皮肤、眼睛和衣服、谨防吸入口鼻。若沾染皮肤、眼睛, 立即使用大量水或生理盐水冲洗沾染处, 必要时寻求医疗咨询。
2. 操作步骤 14, 如果离心机转子没有盖子或者使用气密型盖子, 在将 2 ml 离心管盖子扣在 DNA 吸附柱上后, 务必去除 DNA 吸附柱的盖子(剪掉或者拧断, 见 Page3-3 图示): 因为高速离心时未扣在 DNA 吸附柱上的盖子容易脱落, 造成安全隐患。

### 四、实验准备

1. 65℃水浴或者温箱。
2. Buffer WB1: 第一次使用前按试剂瓶所示体积加入无水乙醇或者 95%乙醇, 混合均匀。
3. 可选: 65℃水浴; 预热 TE 或者去离子水 (pH≥7)。

## 五、操作流程示意图



## 六、操作步骤

所有离心操作均为室温 12,000×g 或者计速为 rpm 的台式离心机使用最高转速减 1000 rpm。

1. 称取≤100mg 新鲜植物、真菌组织或者≤25mg 干燥的植物、真菌组织，或者离心收集≤5×10<sup>7</sup> 真菌细胞。
2. 根据样品种类和实验条件选择如下方法研磨破碎样品：

### A 使用液氮和研钵研磨 □ (处理幼嫩植物组织和菌丝最佳方法)

- A1. 将样品转入研钵中，加液氮浸没样品，用研磨杵轻轻敲打样品使样品成为小碎块，等大部分液氮挥发后快速研磨至样品成粉末状；再加入少量液氮，等大部分液氮挥发后，再快速研磨 10-20 次；
- A2. 立即加入 **0.8 ml Buffer PFG1** 和 **5 μl RNase A1**，快速研磨使 Buffer PFG1 完全覆盖在样品上；
- A3. 室温放置或者水浴加热，样品开始融化后立即快速研磨至样品完全融化；
- A4. 将 1ml 枪头剪掉 1-2 mm，吸取溶液转入 1.5ml 离心管中；或者直接将溶液倒入 1.5ml 离心管中；
- A5. 在研钵中加入 **100 μl Buffer PFG1**，研磨数次，将溶液合并到步骤 A4 中的离心管中，剧烈摇晃混合均匀；继续操作步骤 3；

### B 研钵直接研磨 □ (处理幼嫩植物组织和菌丝，此方法不能充分破碎细胞壁，产量会比你加液氮后研磨的方法低)

- B1. 剪碎样品放入研钵中，加入 **0.8 ml Buffer PFG1** 和 **5 μl RNase A1**，快速研磨至无明显的块状组织；
- B2. 将 1ml 枪头剪掉 1-2 mm，吸取溶液转入 1.5ml 离心管中；或者直接将溶液倒入 1.5ml 离心管中；
- B3. 在研钵中加入 **100 μl Buffer PFG1**，研磨数次，将溶液合并到步骤 B2 中的离心管中，剧烈摇晃混合均匀；继续操作步骤 3；

### C 使用 1-2mm 玻璃珠和研钵研磨 □ (推荐处理老化的植物、藻类、真菌组织，培养的真菌细胞)

- C1. 植物、藻类和真菌组织：剪碎后放入研钵中，加入 **0.8 ml Buffer PFG1** 和 **5 μl RNase A1** 和 1-2mm 玻璃珠，研磨至无明显的块状组织；  
培养的真菌细胞：离心收集细胞去除培养基，加 **0.8 ml Buffer PFG1** 和 **5 μl RNase A1** 悬浮细胞转入研钵中，加 1-2mm 玻璃珠，快速研磨；
- C2. 将 1ml 枪头剪掉 1-2 mm，吸取溶液转入 1.5ml 离心管中；或者直接将溶液倒入 1.5ml 离心管中；
- C3. 在研钵中加入 **100 μl Buffer PFG1**，研磨数次，将溶液合并到步骤 C2 中的离心管中，剧烈摇晃混合均匀；继续操作步骤 3；

3. 65℃温育 30min，富含多糖的样品(此时非常粘稠)温育 1 小时，温育期间剧烈摇晃混合 1-2 次。

4. 冰浴 2 min，加入 **125 μl Buffer PFG2** 混合均匀。

5. 离心 2 min，仔细吸取≤700 μl 上清，转入干净的 1.5 ml 离心管中。

6. 加入 **125 μl Buffer PFG3** 混合均匀，离心 2 min。

▲离心后溶液分相，DNA 分配在上相，残留的多糖、多酚和色素等杂质分配在油脂状下相。

7. 实验准备：将 DNA 吸附柱-C30 置于收集管中并做好标记；

在干净的 1.5ml 离心管中加入 **150 μl 异丙醇**。

8. 吸取步骤 6 中≤650 μl 上相，转入步骤 7 准备的已加入异丙醇的 1.5ml 离心管中，缓慢吹打 5 次混合均匀，转入 DNA 吸附柱-C30。

9. 离心 1 min，弃收集管，将 DNA 吸附柱-C30 放入另外一个干净的收集管中。

10. 在 DNA 吸附柱-C30 中加入 **500 μl Buffer WAG**，离心 1 min，弃收集管，将 DNA 吸附柱-C30 放入另外一个干净的收集管中。

11. 在 DNA 吸附柱-C30 中加入 **500 μl Buffer WB1**，离心 1 min，弃废液，将 DNA 吸附柱-C30 放回收集管中。

12. 重复步骤 11。

13. 离心 2 min。

14. 将 DNA 吸附柱-C30 转入试剂盒携带的 1.5 ml 离心管中，向硅胶膜的中央加 40-200 μl TE 或者去离子水(pH≥7.0)，

将 1.5 ml 离心管的盖子扣在 DNA 吸附柱上，做好标记，去除 DNA 吸附柱的盖子(剪掉或者拧断，见右图)。室温放置 1-2min 或者更长时间，12,000×g 离心 1 min。

▲56-70℃预热 TE 或者去离子水(pH≥7.0)，可以提高洗脱效率。

▲如果使用去离子水洗脱，需用 NaOH 将去离子水 pH 调整至≥7.0。

▲离心结束后将 1.5 ml 离心管中的洗脱液加到硅胶膜的中央，或者再加入≥40 μl TE 或者去离子水，重复此步骤，可以提高洗脱效率。

