



Plant Seed Direct PCR Kit

Plant Seed Direct PCR Kit

For plant seeds containing low polysaccharide and polyphenol components

Plant Seed Direct PCR Plus Kit

For plant seeds containing high polysaccharide and polyphenol components

For performing PCR directly from plant seeds without prior DNA purification.

Research use only.



目 录

产品介绍	3
产品特点	4
试剂盒应用	4
产品质量控制	4
试剂盒内容	5
试剂盒组分信息	8
储存条件	8
注意事项	9
直接 PCR 实例电泳图	9
操作前准备事项	11
实验材料和设备	11
安全性	11
操作指南	12
● 植物种子直接 PCR 操作步骤	13
● 多糖多酚植物种子直接 PCR 操作步骤	16
对照反应	19
操作示意图	20
植物种子直接 PCR 操作示意图	20
多糖多酚植物种子直接 PCR 操作示意图	21
问题分析指南	22

产品介绍

本产品采用独特的裂解反应体系，能够快速地从植物（如：水稻、小麦、烟草、玉米、大豆、油菜、棉花等）的种子样本中释放出基因组 DNA，用于 PCR 反应，因此特别适合大规模基因检测。为了满足不同检测试验的需要，本试剂盒可以使用多种类型的样本（如完整种子、微量组织切块或多颗种子的磨碎样本）进行实验。其中，对于还需要进行萌发的种子样本，可以选择切取种胚以外的微量组织切块(1-5mg)进行实验；对于需要在大量样本中进行抽样检测的实验，可以选择将多个样本混合并磨碎成直径 0.5mm 左右的颗粒后再进行实验（最低可以检测出 0.1%的目的样本）。

裂解反应体系释放基因组 DNA 过程可以在 5-10min 内完成，不需要其他去蛋白、RNA 或者次生代谢产物的过程，即可将释放出的微量 DNA 作为模板进行 PCR 反应。

2x Seed PCR Easy™ Mix 具有很强的 PCR 反应抑制物耐受性，能直接以植物材料的裂解混合液为模板，进行高效特异性扩增。该试剂包含公司专门针对直接 PCR 改造的 D-Taq DNA Polymerase、dNTPs、MgCl₂、反应缓冲液、PCR 反应增强剂、优化剂和稳定剂。与裂解反应体系配合使用能够快速简便地对样品进行检测，并具有灵敏度高、特异性强、稳定性好等特点。

2x Seed PCR Easy™ Mix(UNG)在 2x Seed PCR Easy™ Mix 的基础上用 dUTP 替代了 dTTP，并同时加入能够降解含有 dUTP 模板的 UNG 酶(Uracil-N-glycosylase)。在 PCR 反应前，利用 UNG 酶降解含有尿嘧啶的 PCR 产物，UNG 酶对不含有尿嘧啶的模板不会造成任何影响，从而保证扩增的特异性和准确性，防止了大规模基因检测时可能出现的 PCR 产物污染问题。

D-Taq DNA polymerase 是 Foregene 为直接 PCR 反应专门研制出的 DNA polymerase。D-Taq DNA polymerase 对多种 PCR 反应抑制剂具有极强的耐受性、在各种复杂反应体系中均能高效扩增痕量的 DNA，扩增速度可达 2Kb/min，特别适合进行直接 PCR 反应。

根据植物样本差异，该产品分为两个大类：植物种子直接 PCR 试剂盒(Plant Seed Direct PCR Kit)和多糖多酚植物种子直接 PCR 试剂盒(Plant Seed Direct PCR Plus Kit)。在裂解阶段，考虑到不同类型的种子或组织材料在裂解过程中试剂用量差异较大，客户可根据自己实验材料的大小选择相应的植物种子（中小型）直接 PCR 试剂盒或植物种子（大型）直接 PCR 试剂盒；在 PCR 检测阶段，客户也可以根据实验需求，选用普通的 2x Seed PCR Easy™ Mix 或是具有防 PCR 扩增产物污染作用的 2x Seed PCR Easy™ Mix(UNG)。

产品特点

- ◆ 无需进行费时而昂贵的 DNA 纯化。
- ◆ 样品需求量小，只需取单粒种子即可。
- ◆ 无需研磨、破碎等特殊处理，操作简便。
- ◆ 优化的 PCR 体系，使 PCR 具有更高的特异性、更强的 PCR 反应抑制物耐受性。
- ◆ 防污染 PCR 体系 **2x Seed PCR Easy™ Mix(UNG)**，有效消除由 PCR 产物所引起的污染，保证扩增的特异性和准确性。

试剂盒应用

- ◆ 适用范围：多种植物种子。
- ◆ 裂解混合液：仅用作 PCR 模板。
- ◆ 试剂盒可用于以下用途：转基因种子鉴定、植物基因分型等。

产品质量控制

按照福际生物试剂盒质量检测体系标准(FOREGENE's Total Quality Management System)，每一批次的植物种子直接 PCR 系列试剂盒都严格进行多次测试，确保每一批次试剂盒质量的可靠性和稳定性。

试剂盒内容

Plant Seed Direct PCR Kit I					
植物种子（中小型）直接 PCR 试剂盒					
试剂盒组成		TP-0311T	TP-03111	TP-03112	TP-03113
		50 次	200 次	500 次	2000 次
Part I	Buffer SP1	10ml	40ml	100ml	400ml
	Buffer SP2	3ml	10ml	25ml	100ml
	6x DNA Loading Buffer	1.5ml	1.5ml	1.5ml	1.5mlx4
Part II	2x Seed PCR Easy™ Mix	500µl	1mlx2	1.7mlx3	1.7mlx12
说明书		1 份	1 份	1 份	1 份

Plant Seed Direct PCR Kit I-UNG					
植物种子（中小型）直接 PCR 试剂盒（UNG）					
试剂盒组成		TP-0312T	TP-03121	TP-03122	TP-03123
		50 次	200 次	500 次	2000 次
Part I	Buffer SP1	10ml	40ml	100ml	400ml
	Buffer SP2	3ml	10ml	25ml	100ml
	6x DNA Loading Buffer	1.5ml	1.5ml	1.5ml	1.5mlx4
Part II	2x Seed PCR Easy™ Mix(UNG)	500µl	1mlx2	1.7mlx3	1.7mlx12
说明书		1 份	1 份	1 份	1 份

Plant Seed Direct PCR Kit II					
植物种子（大型）直接 PCR 试剂盒					
试剂盒组成		TP-0313T	TP-03131	TP-03132	TP-03133
		50 次	200 次	500 次	2000 次
Part I	Buffer SP1	30ml	120ml	100mlx3	400mlx3
	Buffer SP2	3ml	10ml	25ml	100ml
	6x DNA Loading Buffer	1.5ml	1.5ml	1.5ml	1.5mlx4
Part II	2x Seed PCR Easy™ Mix	500µl	1mlx2	1.7mlx3	1.7mlx12
说明书		1 份	1 份	1 份	1 份

Plant Seed Direct PCR Kit II-UNG

植物种子（大型）直接 PCR 试剂盒（UNG）

试剂盒组成		TP-0314T	TP-03141	TP-03142	TP-03143
		50 次	200 次	500 次	2000 次
Part I	Buffer SP1	30ml	120ml	100mlx3	400mlx3
	Buffer SP2	3ml	10ml	25ml	100ml
	6x DNA Loading Buffer	1.5ml	1.5ml	1.5ml	1.5mlx4
Part II	2x Seed PCR Easy™ Mix(UNG)	500µl	1mlx2	1.7mlx3	1.7mlx12
说明书		1 份	1 份	1 份	1 份

Plant Seed Direct PCR Plus Kit I

多糖多酚植物种子（小型）直接 PCR 试剂盒

试剂盒组成		TP-0315T	TP-03151	TP-03152	TP-03153
		50 次	200 次	500 次	2000 次
Part I	Buffer SSP1	4.5ml	18ml	45ml	90mlx2
	Buffer SP2	3ml	10ml	25ml	100ml
	6x DNA Loading Buffer	1.5ml	1.5ml	1.5ml	1.5mlx4
Part II	Buffer SSP2	1.5ml	6ml	15ml	60ml
	2x Seed PCR Easy™ Mix	500µl	1mlx2	1.7mlx3	1.7mlx12
说明书		1 份	1 份	1 份	1 份

Plant Seed Direct PCR Plus Kit I-UNG

多糖多酚植物种子（小型）直接 PCR 试剂盒（UNG）

试剂盒组成		TP-0316T	TP-03161	TP-03162	TP-03163
		50 次	200 次	500 次	2000 次
Part I	Buffer SSP1	4.5ml	18ml	45ml	90mlx2
	Buffer SP2	3ml	10ml	25ml	100ml
	6x DNA Loading Buffer	1.5ml	1.5ml	1.5ml	1.5mlx4
Part II	Buffer SSP2	1.5ml	6ml	15ml	60ml
	2x Seed PCR Easy™ Mix(UNG)	500µl	1mlx2	1.7mlx3	1.7mlx12
说明书		1 份	1 份	1 份	1 份

Plant Seed Direct PCR Plus Kit II

多糖多酚植物种子（大中型）直接 PCR 试剂盒

试剂盒组成		TP-0317T	TP-03171	TP-03172	TP-03173
		50 次	200 次	500 次	2000 次
Part I	Buffer SSP1	24ml	96ml	120mlx2	480mlx2
	Buffer SP2	3ml	10ml	25ml	100ml
	6x DNA Loading Buffer	1.5ml	1.5ml	1.5ml	1.5mlx4
Part II	Buffer SSP2	8ml	32ml	80ml	80mlx4
	2x Seed PCR Easy™ Mix	500µl	1mlx2	1.7mlx3	1.7mlx12
说明书		1 份	1 份	1 份	1 份

Plant Seed Direct PCR Plus Kit II-UNG

多糖多酚植物种子（大中型）直接 PCR 试剂盒（UNG）

试剂盒组成		TP-0318T	TP-03181	TP-03182	TP-03183
		50 次	200 次	500 次	2000 次
Part I	Buffer SSP1	24ml	96ml	120mlx2	480mlx2
	Buffer SP2	3ml	10ml	25ml	100ml
	6x DNA Loading Buffer	1.5ml	1.5ml	1.5ml	1.5mlx4
Part II	Buffer SSP2	8ml	32ml	80ml	80mlx4
	2x Seed PCR Easy™ Mix(UNG)	500µl	1mlx2	1.7mlx3	1.7mlx12
说明书		1 份	1 份	1 份	1 份

试剂盒组分信息

- ◆ Buffer SP1、Buffer SSP1：提供植物种子裂解反应所需的环境。
- ◆ Buffer SSP2：补充提供多糖多酚植物种子裂解反应所需的环境。
- ◆ Buffer SP2：中和裂解产物，使其不影响后续 PCR 反应。
- ◆ 2× Seed PCR Easy™ Mix：包括福际生物特别改造的热启动 Taq DNA Polymerase、dNTPs、MgCl₂、反应缓冲液、PCR 反应增强剂、优化剂以及稳定剂等。PCR 反应时，只需将适当的裂解混合液、引物、ddH₂O 添加到 2× Seed PCR Easy™ Mix 中即可用于 PCR 反应。
- ◆ 2× Seed PCR Easy™ Mix(UNG)：在 2× Seed PCR Easy™ Mix 的基础上用 dUTP 替代了 dTTP，并同时加入能够降解含有 dUTP 模板的 UNG 酶，从而能够有效防止 PCR 扩增产物污染。
- ◆ 6× DNA Loading Buffer：该 Loading Buffer 中不含有 SDS。建议在进行琼脂糖凝胶电泳时，配搭使用试剂盒附赠的 6× DNA Loading Buffer，以便取得好的电泳结果。切勿使用含有 SDS 的 Loading Buffer，否则在电泳时会在泳道中有一大团拖尾亮光，影响实验结果。

储存条件

1. 运输条件

- ◆ 全程低温冰盒运输，保证试剂盒 Part II 处于 < 4°C 状态。

2. 保存条件

- ◆ 本试剂盒 Part I 保存在常温或 2-8°C。
 - ❖ 试剂 Buffer SP1&Buffer SP2（或 Buffer SSP1&Buffer SP2，在干燥条件下，可保存 12 个月；如需保存更长时间可置于 2-8°C。

注意：若低温保存，Buffer SP1（或 Buffer SSP1）溶液容易产生沉淀。在使用前务必将试剂盒内的溶液在室温中放置一段时间，必要时可在 37°C 水浴中预热 10min，待沉淀消失，并摇匀溶液后再使用。

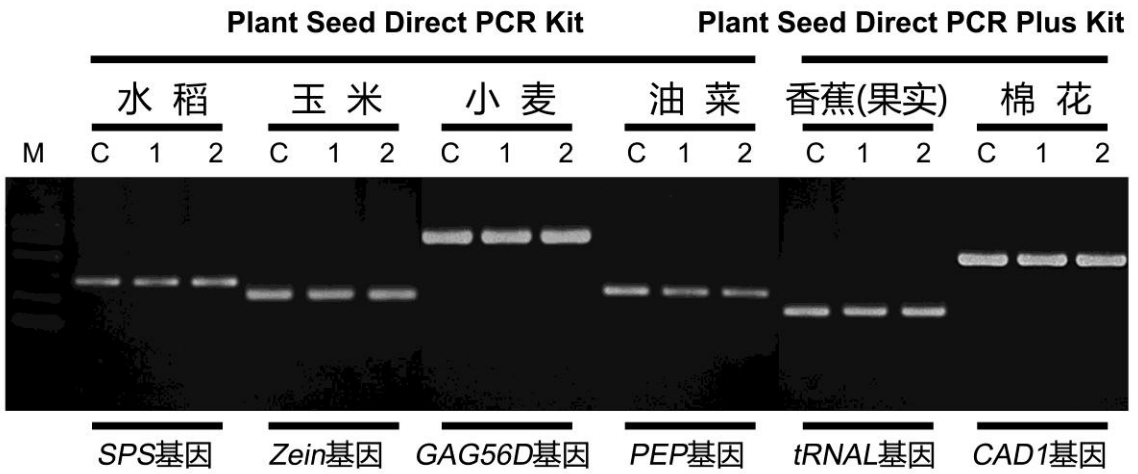
- ❖ 试剂 6x DNA Loading Buffer 在干燥条件下，可保存 12 个月；如需保存更长时间可置于 2-8°C。
- ◆ 本试剂盒 Part II 保存在-20°C。
 - ❖ 试剂 2x Seed PCR Easy™ Mix(或 2x Seed PCR Easy™ Mix(UNG))置于-20°C 保存；若频繁使用，也可置于 4°C短期保存（限 10 天内用完）。
 - ❖ 试剂 Buffer SSP2（仅限多糖多酚系列），置于-20°C 保存。

注意事项：(请务必在使用试剂盒前仔细阅读注意事项)

- ◆ 注意实验用具的清洁以及实验的操作手法，避免样本间的交叉污染。
- ◆ 请尽量使用 1 年以内的种子进行实验.若种子保存时间超过 1 年或种子特别干燥，在裂解时，请先挑破种皮或使用敲碎的种子。
- ◆ 若 Buffer SP1 或 Buffer SSP1 有沉淀析出，可放置于 37°C待沉淀消失，并摇匀溶液后再使用。
- ◆ Buffer SSP2 应避免长时间暴露在空气中，使用后需置于-20°C保存。若频繁使用，也可置于 4°C短期保存（限 10 天内用完）。
- ◆ 2x Seed PCR Mix 应避免反复冻融，否则会影响 PCR 效率。
- ◆ 如果环境温度过高，2x Seed PCR Mix 可能会变浑浊，可置于冰上放置 1-2min，待溶液澄清，上下颠倒混匀 3-5 次后再使用。
- ◆ 电泳检测时，切勿使用含有 SDS 的 Loading Buffer，否则在电泳时会在泳道中出现一大团拖尾亮带，影响实验结果。

直接 PCR 实例电泳图

植物种子直接 PCR 系列试剂盒可以处理多种植物种子，提供的 2x Seed PCR Mix 有很强的 PCR 反应抑制物耐受性和检测灵敏度高、扩增特异性强。使用试剂盒裂解混合液作为模板扩增相关基因，1.5%琼脂糖凝胶电泳分析，见下图：



M: 100bp Marker C: 相应植物纯化基因组DNA为模板PCR

1/2: 种子或果实裂解产物为模板直接PCR

操作前准备事项

使用本试剂盒前，请务必仔细阅读说明书。植物种子直接 PCR 系列试剂盒操作简单、方便、快速，说明书提供了整个试剂盒的完整信息和正确使用方法。请在使用前准备好必要的实验材料和设备。

实验材料和设备

- ◆ 各种来源的植物种子（新鲜的、冷冻保存的）。
- ◆ 2ml 无菌离心管、0.2ml 无菌 PCR 管。
- ◆ 台式离心机（ $\geq 13,400\times g$ ）、PCR 仪、95°C 水浴或金属浴、移液器等。

安全性

- ◆ 本产品仅供科研使用，请勿用于医药、临床医学、食品及化妆品等用途。
- ◆ 使用化学品时，穿戴合适的实验服，手套，防护眼镜等。
- ◆ Buffer SP1、Buffer SSP1 含 SDS：刺激性、致敏性。
- ◆ Buffer SP1、Buffer SSP1 含 NaOH：刺激性、致敏性。

操作指南

本说明书根据实验材料差异，分别提供了植物种子和多糖多酚种子快速释放 DNA，并进行 PCR 检测的方法。客户可根据自己的实验材料，按照相应的实验说明进行操作。

材料取用说明

- ◆ 完整种子：如果是保存时间较短（一年以内）的种子，取 1 粒（拟南芥、烟草或类似大小的种子可以取 10-30 粒）直接置于裂解液中裂解；若材料保存时间超过 1 年且特别干燥的种子，需要将种皮挑开或将种子敲碎，才能用于裂解反应。
- ◆ 种子组织切块：对需要进行萌发的种子，可使用手术刀（或剪刀）切取微量组织置于裂解液中裂解。若切取过程未损伤种胚，该种子仍可发芽种植。
- ◆ 磨碎样本：如果需要在大量样本中进行抽样检测，可以将多个样本混合并研磨成直径 0.5mm 左右的颗粒后，称取 100mg 样本置于裂解液中裂解。

预防样本间交叉污染

为了避免样本间交叉污染，每次取样后都需要将取样器材的刃口或与样本直接接触的部位浸入 2%次氯酸钠溶液中，反复洗刷数次进行清洗，然后用干净的纸巾擦干残余液体后再进行使用。为了试验方便，也可准备多个取样器材，在使用完后进行统一清洗，确保每一单独样本均使用的是无污染取样器材。

植物种子直接 PCR 操作步骤

针对多糖多酚含量低的植物种子或组织材料，如：烟草种子、小麦种子、水稻种子等。

A：样本 DNA 释放 (PCR 模板预制)

1. 取适量组织加入置于 200 μ l 或 2ml 离心管中。

注意：若材料为保存时间超过 1 年且特别干燥的种子，需将种皮挑开或将种子敲碎，才能进行裂解反应。

2. 根据种子或组织块大小加入适量 Buffer SP1 (试剂用量见下表 1)。

注意：中小型种子每次裂解最多加入 200 μ l Buffer SP1，大型种子每次裂解最多加入 600 μ l Buffer SP1。

3. 将其放置于 PCR 仪或金属浴中，95 $^{\circ}$ C 裂解 10-30min。

注意：多数样本裂解 10min 即可，对于较难裂解或保存时间过长的样本，可以延长裂解时间至 30min。

4. 13,400 \times g 常温离心 2min，取 50 μ l 裂解产物的上清液至新离心管中，加入 50 μ l Buffer SP2，用微量移液器吹打混匀。针对 1-5mg 范围内微量种子切块，可以在裂解完成后，直接向反应管中加入 50 μ l Buffer SP2 进行中和即可。

5. 所得裂解混合液可 4 $^{\circ}$ C 保存 (5 天以内) 或直接作为模板进行 PCR 反应。若需要长期保存，可以将裂解混合液置于 -20 $^{\circ}$ C 进行保存。

表 1：多糖多酚含量低样本的裂解相关参数

样本类型	样本量 (mg)	Buffer SP1 (μ l)	裂解产物 (μ l)	Buffer SP2 (μ l)
油菜或类似大小种子 ^{1*}	~6	100	50	50
水稻或类似大小单粒种子	~30	200	50	50
玉米或类似大小单粒种子	~250	600	50	50
组织切块	1-5	50	- ^{2*}	50
	5-30	200	50	50
磨碎样品 ^{3*}	100	600	50	50

1*：以烟草或类似大小的种子进行试验时，需要使用 10-30 粒 (约 1-6mg) 种子进行裂解。

2*：针对 1-5mg 范围内微量组织裂解，可以在裂解完成后，直接向反应管中加入 50 μ l 中和液进行中和即可。

3*：为了保证裂解的强度和均一性，磨碎样品颗粒直径控制在 0.5mm 以内为宜。

B : PCR 反应鉴定

1. 取适量的 A 步骤处理好的裂解混合液添加到 2× Seed PCR Easy™ Mix 或 2× Seed PCR Easy™ Mix(UNG)，再添加相应的引物，并用 ddH₂O 使其稀释为 1×（PCR 体系配制见下表 2）。

注意：模板量占 PCR 体系的 10-20%之间最佳，不宜超过 30%（如 20μl 的 PCR 体系中，加入 2-4μl 裂解混合液即可，不宜超过 6μl）。

2. 将 PCR 体系混匀，根据优化好的 PCR 条件（退火温度等）进行 PCR 反应，2× Seed PCR Easy™ Mix 反应条件见下表 3-1；2× Seed PCR Easy™ Mix(UNG)反应条件见下表 3-2。

注意：尽量使用优化的 PCR 条件进行 PCR 反应，可以得到更好的结果。

3. 琼脂糖凝胶电泳检测结果。

注意：建议使用随试剂盒提供的 6× DNA Loading Buffer，切勿使用含有 SDS 的 Loading Buffer 进行电泳。

表 2 : PCR 反应体系配制

PCR 体系添加内容	用 量		终 浓 度
2× Seed PCR Mix ^{1*}	10μl	25ul	1x
Forward Primer (10μM)	0.5μl	1μl	0.2-0.25μM ^{2*}
Reverse Primer (10μM)	0.5μl	1μl	0.2-0.25μM ^{2*}
裂解混合液(DNA模板)	4μl	10μl	
ddH ₂ O (灭菌蒸馏水)	5μl	13μl	
Total Volume	20μl	50μl	

1*：根据试剂盒的不同，2× Seed PCR Mix 分别为：2× Seed PCR Easy™ Mix 或 2× Seed PCR Easy™ Mix(UNG)。

2*：通常引物终浓度为 0.2μM 可以得到较好结果。反应性能较差时，可以在 0.1-0.5μM 范围内调整引物浓度。

注意：此体系配制仅作参考，实验室可根据需要调整 PCR 体系大小，添加合适比列的裂解混合液即可。配制好 PCR 反应体系，置于涡旋仪上涡旋混匀，瞬时离心将反应液集于管底。

表 3-1 : 2x Seed PCR Easy™ Mix 的 PCR 反应条件

步骤	温度	时间	循环数	内容
1	94°C	3min	1	预变性
2	94°C	10sec	35-40	变性
3	50-65°C	20sec		引物退火
4	72°C	Xmin (2kb/min) ^{1*}		延伸
5	72°C	5min	1	终延伸

表 3-2 : 2x Seed PCR Easy™ Mix(UNG)的 PCR 反应条件

步骤	温度	时间	循环数	内容
1	50°C	5min	1	UNG酶处理
2	94°C	5min	1	灭活UNG酶&预变性
3	94°C	10sec	35-40	变性
4	50-65°C	20sec		引物退火
5	72°C	Xmin (2kb/min) ^{1*}		延伸
6	72°C	5min	1	终延伸

1*: 1kb 以内的 DNA 片段，建议延伸时间为 30sec。

注意：此表 PCR 条件仅供参考。PCR 反应条件视模板、引物等的结构条件不同而各异。在具体操作中需要根据模板类型、目的片段大小、扩增片段的碱基序列和引物的 GC 含量及长短等具体情况来设计最佳的反应条件，包括退火温度，延伸时间等。

多糖多酚植物种子直接 PCR 操作步骤

针对多糖多酚含量高的植物种子或组织材料，如：拟南芥种子、棉花种子。

A：样本 DNA 释放（PCR 模板预制）

1. 根据准备取用的种子或组织块大小，将适量裂解液（Buffer SSP1 和 Buffer SSP2）加入 200 μ l 或 2ml 离心管中（见下表 4）。

注意：由 Buffer SSP1 和 Buffer SSP2 配制成的裂解液最好现配现用；若需短时间保存，可以将混合液置于 4 $^{\circ}$ C 保存，保存时间不宜超过 6h。

2. 取适量组织加入含有裂解液的离心管中。

注意：若材料为保存时间超过 1 年且特别干燥的种子，需将种皮挑开或将种子敲碎，才能得到较完整的基因组 DNA。

3. 将其放置于 PCR 仪或金属浴中，95 $^{\circ}$ C 裂解 5-10min。

注意：若材料多酚含量非常高（裂解 10min，裂解液颜色呈棕黄色或棕红色），可以缩短裂解时间至 5min。

4. 13,400 \times g 常温离心 2min。取 80 μ l 裂解产物的上清液至新离心管中，加入 50 μ l Buffer SP2，用微量移液器吹打混匀。针对 1-5mg 范围内微量种子切块，可以在裂解完成后，直接向反应管中加入 50 μ l Buffer SP2 进行中和即可。

5. 所得裂解混合液可 4 $^{\circ}$ C 保存（5 天以内）或直接作为模板进行 PCR 反应。若需要长期保存，可以将裂解混合液置于 -20 $^{\circ}$ C 进行保存。

表 4：多糖多酚含量高样本的裂解相关参数

样本类型	样本量 (mg)	裂解液(μ l)		裂解产物 (μ l)	Buffer SP2 (μ l)
		Buffer SSP1	Buffer SSP2		
拟南芥或类似大小种子 ^{1*}	~6	90	30	80	50
棉花或类似大小单粒种子	~200	480	160	80	50
组织切块	1-5	60	20	- ^{2*}	50
	5-30	180	60	80	50
磨碎样品 ^{3*}	100	480	160	80	50

1*：以拟南芥或类似大小的种子进行试验时，需要使用 10-30 粒（约 1-6mg）种子进行裂解。

2*：针对 1-5mg 范围内微量组织裂解，可以在裂解完成后，直接向反应管中加入 50 μ l Buffer SP2 进行中和即可。

3*：为了保证裂解的强度和均一性，磨碎样品颗粒直径控制在 0.5mm 以内为宜。

B : PCR 反应鉴定

1. 取适量的 A 步骤处理好的裂解混合液添加到 2× Seed PCR Easy™ Mix 或 2× Seed PCR Easy™ Mix(UNG)，再添加相应的引物，并用 ddH₂O 使其稀释为 1×（PCR 体系配制见下表 5）。

注意：模板量占 PCR 体系的 5-10%之间最佳，不宜超过 20%（如 20μl 的 PCR 体系中，加入 1-2μl 裂解混合液即可，不宜超过 4μl）。

2. 将 PCR 体系混匀，根据优化好的 PCR 条件（退火温度等）进行 PCR 反应，2× Seed PCR Easy™ Mix 反应条件见下表 6-1，2× Seed PCR Easy™ Mix(UNG)反应条件见下表 6-2。

注意：尽量使用优化的 PCR 条件进行 PCR 反应，可以得到更好的结果。

3. 琼脂糖凝胶电泳检测结果。

注意：建议使用随试剂盒提供的 6× DNA Loading Buffer，切勿使用含有 SDS 的 Loading Buffer 进行电泳。

表 5 : PCR 反应体系配制

PCR 体系添加内容	用 量		终 浓 度
2× Seed PCR Mix ^{1*}	10μl	25ul	1×
Forward Primer (10μM)	0.5μl	1μl	0.2-0.25μM ^{2*}
Reverse Primer (10μM)	0.5μl	1μl	0.2-0.25μM ^{2*}
裂解混合液（DNA模板）	2μl	5μl	
ddH ₂ O (灭菌蒸馏水)	7μl	18μl	
Total Volume	20μl	50μl	

1*: 根据试剂盒的不同，2× Seed PCR Mix 分别为：2× Seed PCR Easy™ Mix 或 2× Seed PCR Easy™ Mix(UNG)。

2*: 通常引物终浓度为 0.2μM 可以得到较好结果。反应性能较差时，可以在 0.1-0.5μM 范围内调整引物浓度。

注意：此体系配制仅作参考，实验室可根据需要调整 PCR 体系大小，添加适当比例的裂解混合液即可。配制好 PCR 反应体系，置于涡旋仪上涡旋混匀，瞬时离心将反应液集于管底。

表 6-1 : 2x Seed PCR Easy™ Mix 的 PCR 反应条件

步骤	温度	时间	循环数	内容
1	94°C	3min	1	预变性
2	94°C	10sec	35-40	变性
3	50-65°C	20sec		引物退火
4	72°C	Xmin (2kb/min) ^{1*}		延伸
5	72°C	5min	1	终延伸

表 6-2 : 2x Seed PCR Easy™ Mix(UNG)的 PCR 反应条件

步骤	温度	时间	循环数	内容
1	50°C	5min	1	UNG酶处理
2	94°C	5min	1	灭活UNG酶&预变性
3	94°C	10sec	35-40	变性
4	50-65°C	20sec		引物退火
5	72°C	Xmin (2kb/min) ^{1*}		延伸
6	72°C	5min	1	终延伸

1*: 1kb 以内的 DNA 片段，建议延伸时间为 30sec。

注意：此表 PCR 条件仅供参考。PCR 反应条件视模板、引物等的结构条件不同而各异。在具体操作中需要根据模板类型、目的片段大小、扩增片段的碱基序列和引物的 GC 含量及长短等具体情况来设计最佳的反应条件，包括退火温度，延伸时间等。

PCR 对照反应

在PCR结果分析时，不管是阳性结果或阴性结果，如果没有对照反应，我们都不能确定结果是否可靠。为了便于后续实验结果的分析，我们建议在进行PCR时，设置阳性和阴性PCR对照反应以便于排除假阳性或假阴性的干扰。

A：阳性对照

选用容易扩增的样本保守基因的引物和采用纯化的样本DNA作为模板进行阳性对照反应以确定PCR反应体系和条件的正确性以及2x Seed PCR Mix有效性。其反应体系的配制见下表7。

表 7：对照 PCR 反应体系配制

PCR 体系添加内容	用 量		终 浓 度
2x Seed PCR Mix ^{1*}	10μl	25ul	1x
Forward Primer (10μM) ^{2*}	0.5μl	1μl	0.2-0.25μM
Reverse Primer (10μM) ^{2*}	0.5μl	1μl	0.2-0.25μM
DNA模板 ^{3*}	Xμl	Xμl	100-200ng
ddH ₂ O (灭菌蒸馏水)	(9-X)μl	(23-X)μl	
Total Volume	20μl	50μl	

1*：根据试剂盒的不同，2x Seed PCR Mix 分别为：2x Seed PCR Easy™ Mix 或 2x Seed PCR Easy™ Mix(UNG)。

2*：引物可选用该样本比较容易扩增的保守基因的引物，如 β-Actin 基因、叶绿体基因组上的保守序列等（请确保这些引物的可用性）。

3*：可选用样本纯化的 DNA，也可根据实验需要，自行选择。

B：阴性对照

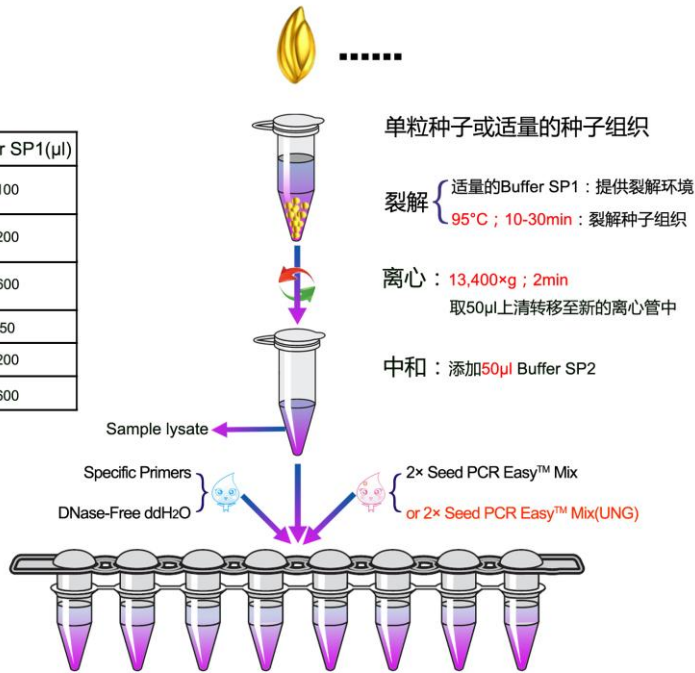
PCR反应体系被污染会导致PCR结果出现假阳性，需要设置阴性对照来排除。取ddH₂O作为模板，用目的基因引物进行PCR扩增，以排除PCR体系是否被污染或实验是否有其他污染源。

操作示意图

普通植物种子直接PCR操作示意图

裂解液添加量(Buffer SP1)

样本类型	样本量(mg)	Buffer SP1(μl)
油菜或类似大小种子	~6	100
水稻或类似大小单粒种子	~30	200
玉米或类似大小单粒种子	~250	600
组织切片	1-5	50
	5-30	200
磨碎样本	100	600



PCR 反应体系

组分	体积
(for 20μl PCR reaction)	
2x Seed PCR Easy™ Mix	10μl
Specific Primers	1μl
Sample lysate	4μl
DNase-Free ddH ₂ O	5μl

PCR 反应条件

Step	Temp	Time	Cycles
1	94°C	3min	1
2	94°C	10sec	35-40
2	50-65°C	20sec	
4	72°C	Xmin(2kb/min)	
5	72°C	5min	1

PCR 反应体系(UNG)

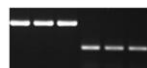
组分	体积
(for 20μl PCR reaction)	
2x Seed PCR Easy™ Mix (UNG)	10μl
Specific Primers	1μl
Sample lysate	4μl
DNase-Free ddH ₂ O	5μl

PCR 反应条件(UNG)

Step	Temp	Time	Cycles
1	50°C	5min	1
2	94°C	5min	1
2	94°C	10sec	35-40
2	50-65°C	20sec	
4	72°C	Xmin(2kb/min)	
5	72°C	5min	1



PCR扩增



琼脂糖凝胶电泳检测结果

多糖多酚植物种子直接PCR操作示意图

裂解液添加量(Buffer SSP1和Buffer SSP2)

样本类型	样本量(mg)	Buffer SSP1(μl)	Buffer SSP2(μl)
拟南芥或类似大小种子	~6	90	30
棉花或类似大小单粒种子	~200	480	160
组织切片	1-5	60	20
	5-30	180	60
磨碎样本	100	480	160

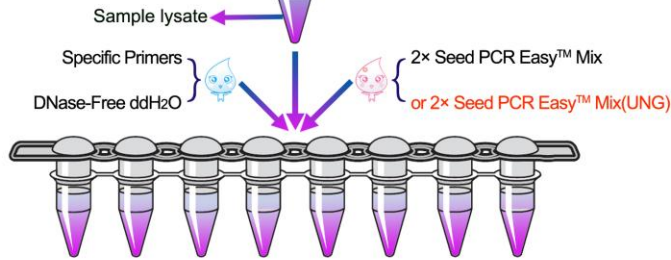


单粒种子或适量的种子组织

裂解 { 适量的Buffer SSP1和Buffer SSP2 : 提供裂解环境
95°C ; 5-10min : 裂解种子组织

离心 : 13,400×g ; 2min
取80μl上清转移至新的离心管中

中和 : 添加50μl Buffer SP2



PCR 反应体系

组分	体积
(for 20μl PCR reaction)	
2× Seed PCR Easy™ Mix	10μl
Specific Primers	1μl
Sample lysate	2μl
DNase-Free ddH ₂ O	7μl

PCR 反应条件

Step	Temp	Time	Cycles
1	94°C	3min	1
2	94°C	10sec	} 35-40
2	50-65°C	20sec	
4	72°C	Xmin(2kb/min)	
5	72°C	5min	1

PCR 反应体系(UNG)

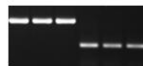
组分	体积
(for 20μl PCR reaction)	
2× Seed PCR Easy™ Mix (UNG)	10μl
Specific Primers	1μl
Sample lysate	2μl
DNase-Free ddH ₂ O	7μl

PCR 反应条件(UNG)

Step	Temp	Time	Cycles
1	50°C	5min	1
2	94°C	5min	1
2	94°C	10sec	} 35-40
2	50-65°C	20sec	
4	72°C	Xmin(2kb/min)	
5	72°C	5min	1



PCR扩增



琼脂糖凝胶电泳检测结果

问题分析指南

以下针对植物种子直接 PCR 系列试剂盒在实验中可能遇到的问题进行分析，希望能对您的实验有所帮助。另外，对于在操作说明和问题以外的其他实验或技术上的问题，我们设有专门的技术支持帮助您。如有任何需要可联系我们：028-66070618 或 E-mail: Tech@foregene.com。

在试剂盒的使用过程中往往会遇到许多问题，比如：没有 PCR 扩增产物、PCR 特异性差等，下面就分别对使用植物种子直接 PCR 系列试剂盒可能会遇到的问题进行分析。建议在进行直接 PCR 的同时设置阳性对照或阴性对照以便后续分析实验结果。

正对照、待测样本均无条带

1. PCR 反应体系或反应条件不合适。

建议：使用梯度 PCR 摸索 PCR 最佳反应条件。

2. PCR 试剂保存不当失去活性。

建议：2× Seed PCR Mix 应保存于-20℃，使用时避免反复冻融。若使用频繁，可在 4℃短时间存放。

3. 引物设计问题。

建议：尝试重新设计引物进行检查。

正对照有目的条带，待测样本无条带或条带弱

1. 种子中多糖多酚含量较高，裂解混合液呈棕黄色甚至棕红色。

建议：使用多糖多酚植物种子直接 PCR 试剂盒(Plant Seed Direct PCR Plus Kit)。

2. 裂解液、中和液加入比例不当，裂解混合液影响 PCR 体系的 pH 值。

建议：正常条件下，中和后的裂解混合液的 pH 应该在 7-8 左右（普通植物种子直接 PCR 试剂盒，裂解产物和 Buffer SP2 严格按照 1:1 的量进行中和；多糖多酚植物种子直接 PCR 试剂盒，裂解产物和 Buffer SP2 严格按照 8:5 的量进行中和）。

3. 样本裂解混合液保存不当或保存时间过久，DNA 基因组已经降解。

建议：裂解混合液可在 4℃保存 5 天，尽量使用新制备的裂解液混合液进行 PCR。

4. 裂解混合液中抑制物过多。

建议：在 PCR 反应体系 5-20%范围内优化模板加入量。

5. PCR 循环数不足。

建议：适当增加 PCR 的循环数，推荐在 35-40 循环为佳。因为模板复杂，一般 PCR 反应要比用纯化的 DNA 模板多 5-10 个循环为佳。

非特异性扩增

1. 退火温度偏低。

建议：适当提高退火温度。

2. PCR 循环数过多。

建议：适当降低循环次数，推荐在 35-40 循环为佳。

3. 引物浓度偏高。

建议：适量降低引物用量。通常引物终浓度为 0.2 μ M 可以得到较好结果。反应性能较差时，可以在 0.1-0.5 μ M 范围内调整引物浓度。

4. PCR 模板加入量过多。

建议：配制 PCR 反应体系时，适量减少模板加入量。

空白对照出现目的条带

1. 操作工具或试剂污染。

建议：实验所有试剂或器材均应高压灭菌。实验时应规范操作，避免在加样操作中溶液倒吸或飞溅。

2. 样本间交叉污染。

建议：每个取样器只对一个样本使用；或取完一个样本后，将取样器刃口或与样本直接接触的部位浸入 2%的次氯酸钠溶液中，反复涮洗数次进行清洗，然后用干净的纸巾擦干残液后再进行使用。

3. PCR 产物污染。

建议：如果实验室检测同类型样本多，最好使用 UNG 防 PCR 产物污染系统的试剂盒进行实验。

中国·福际 World's Foregene

成都福际生物技术有限公司

电话: 028-83360257, 028-83361257

传真: 028-83361257

E-mail: info@foregene.com

[Http://www.foregene.com](http://www.foregene.com)

