



Plant Direct PCR Kit Series Supplementary Information

For performing PCR directly from plant tissue without prior DNA purification

Research use only



试剂盒类型的选择

1. 根据材料多糖多酚含量选择试剂盒

植物组织中或多或少的含有多糖多酚。其中，多糖含量差异对后续直接 PCR 反应影响较小，多酚含量差异对 PCR 反应影响较大。

- ◆ 对于多糖含量较高而多酚含量较低的材料，根据需要可以选用植物种子(或叶片)直接 PCR 试剂盒(Plant Seed(or Leaf) Direct PCR Kit)，但选用多糖多酚植物种子(或叶片)直接 PCR 试剂盒(Plant Seed(or Leaf) Direct PCR Plus Kit)能够获得更好的结果。
- ◆ 多酚含量高的材料对后续直接 PCR 反应影响较大，需要选用多糖多酚植物种子(或叶片)直接 PCR 试剂盒(Plant Seed(or Leaf) Direct PCR Plus Kit)才能够获得结果。目前，我公司已对常见的植物组织材料进行了测试，具体分类情况如下(见表 1)：

表 1：植物组织材料分类

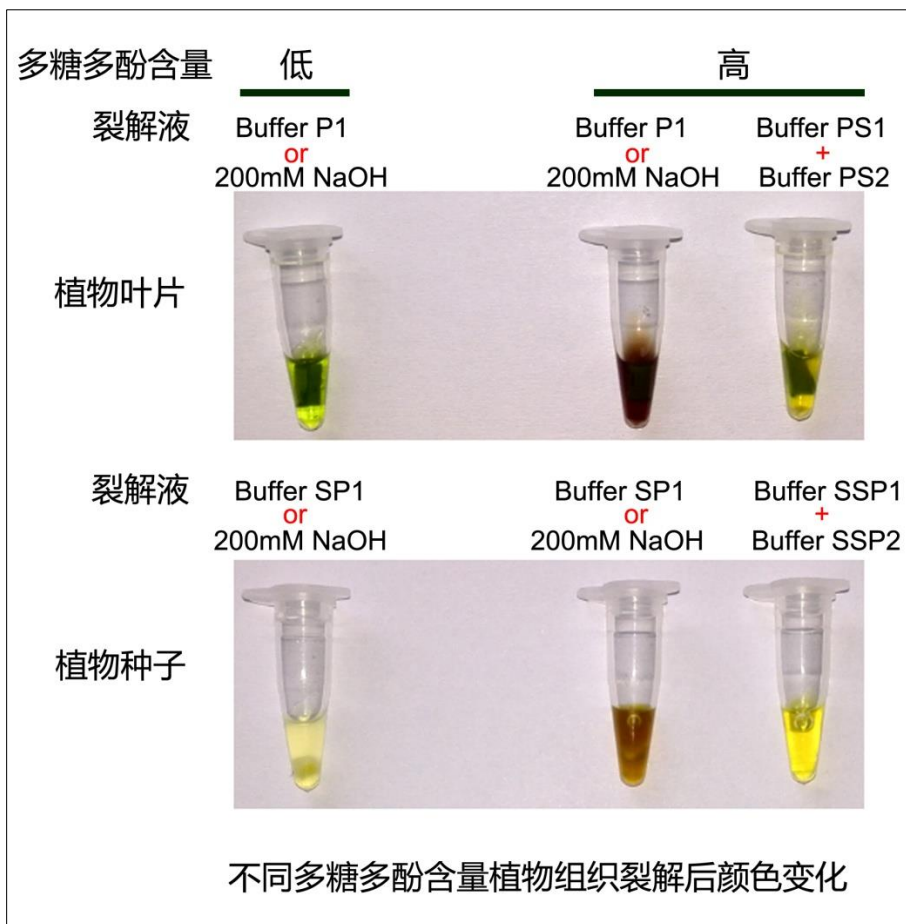
| 多糖多酚含量低的植物组织材料 | 多糖多酚含量高的植物组织材料 |
|---|---|
| 油菜(种子、叶片)、水稻(种子、叶片)、小麦(种子、叶片)、玉米(种子、叶片)、大豆(种子、叶片) | 拟南芥(种子)、棉花(叶片、种子)、香蕉(叶片、果肉)、桔子(果皮)、马铃薯(块根)、洋葱(鳞叶)、苹果(果实)、芦荟(叶片)、番茄(果实)、花生(叶片) |

如果您的样本不在上述列表中，请按下述方法进行材料多酚含量的鉴定：

若不确定待测样品是否属于多酚含高的植物组织，可以取 20mg 左右组织块(或 2 片直径 7mm 的叶片组织)放入干净的 1.5ml 离心管中，加入 200 μ l 200mM NaOH 溶液，置于 95 $^{\circ}$ C 10min。裂解完后观察其颜色变化，参照以下两种情况选取相应的试剂盒进行实验。

1. 如果裂解产物颜色呈绿色或淡黄色，说明该组织多酚含量较低，不影响直接 PCR 反应，可以使用植物种子(或叶片)直接 PCR 试剂盒(Plant Seed(or Leaf) Direct PCR Kit)。
2. 如果裂解产物呈棕黄色或棕红色，说明该组织多酚含量较高，推荐使用多糖多酚植物种子(或叶片)直接 PCR 试剂盒(Plant Seed(or Leaf) Direct PCR Plus Kit)。具

体的颜色变化可以参照下面图片(实际操作中裂解后根据组织用量不同或材料差异, 颜色变化可能会有些许出入, 但变化不大, 可参考下图选择相应试剂盒):



2. 根据种子大小选择试剂盒

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, 为节约实验成本, 客户可根据自己实验材料的大小选择相应的种子(中小型)直接 PCR 试剂盒或种子(大型)直接 PCR 试剂盒(表 2)。

表 2 : 不同类型样本所适用的试剂盒

| 推荐试剂盒 | 材料类型 | 材料重量(mg) | 样本举例 |
|---------------------|--------|----------|-----------------|
| 种子(中小型)直接 PCR 系列试剂盒 | 组织切块 | 1-30 | 边长 1-5mm 的植物组织块 |
| | 小型单粒种子 | 1-10 | 拟南芥、烟草、油菜种子 |
| | 中型单粒种子 | 10-50 | 小麦、水稻种子 |
| 种子(大型)直接 PCR 系列试剂盒 | 大型单粒种子 | >50 | 棉花、玉米、大豆种子 |
| | 磨碎样本 | 100 | 直径 0.5mm 左右的颗粒 |

3. 根据实验是否需要防 PCR 产物污染选择试剂盒

- ◆ 小量不同样本 PCR 实验，不需要防 PCR 产物污染的可选择普通种子(或叶片)直接 PCR 试剂盒系列(Plant Seed(or Leaf) Direct PCR Kit)。
- ◆ 大量重复相同样本 PCR 实验，需要防 PCR 产物污染的可选择防 PCR 污染全血直接 PCR 试剂盒系列(Plant Seed(or Leaf) Direct PCR Kit(UNG))

注意：结合材料多酚多糖含量及大小，并根据实验是否需要防 PCR 产物污染，客户可自行选择所需要的试剂盒类型，以达到提高实验效率和节约成本的目的。

叶片直接 PCR 取样说明

- ◆ 直接法：可使用打孔器(或剪刀)剪取直径 2-3mm 叶片组织置于 PCR 反应体系即可。若选用成熟的叶片，请避免使用叶片主脉部位组织。
- ◆ 裂解法：可使用打孔器(或剪刀)剪取直径 5-7mm 叶片组织置于裂解液中裂解。若选用成熟的叶片，请避免使用叶片主脉部位组织。

请务必按下图取样，请勿超过下图所示的取样大小

直接法



比例尺=1:1

裂解法



比例尺=1:1

第一次使用注意事项

对于第一次使用植物种子(叶片)直接 PCR 系列试剂盒的用户,我们建议先进行条件摸索,再进行大规模的检测使用,这样可以优化实验条件、提高检测效率、避免样本和试剂的浪费。我们建议用户可以按照以下方案进行直接 PCR 的条件优化:

1. 确认样本类型

通过 PAGE 1 的方法确认样本是否为多糖多酚,选用正确的植物种子(或叶片)直接 PCR 试剂盒进行相关实验。

2. 优化样本裂解时间

- ◆ 使用植物种子(或叶片)直接 PCR 试剂盒时,在样本添加了 Buffer SP1(或 Buffer P1)后,95°C 温浴时间在 10-30min 内调整,对于保存时间长的干燥种子或较难裂解的组织样本可以延长时间至 30min。
- ◆ 使用多糖多酚植物种子(或叶片)直接 PCR 试剂盒时,在样本添加了 Buffer SSP1&Buffer SSP2(或 Buffer PS1&Buffer PS2)后,95°C 温浴时间在 5-10min 内调整。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。

3. 优化模板添加量

使用植物种子(或叶片)直接 PCR 试剂盒时,PCR 体系中模板(裂解混合液)的加入量建议从 5%-20% 做一个梯度;使用多糖多酚植物种子(或叶片)直接 PCR 试剂盒时,PCR 体系中模板(裂解混合液)的加入量建议从 5%-10% 做一个梯度,以便于选择最合适的加入量。在 PCR 性能不高时,尽量降低模板的用量以便取得较好的效果。

4. PCR 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 2* | 变性 |
| 3 | 50-70°C 1* | 20sec | | 引物退火 |
| 4 | 72°C | Xmin (1kb/min) | | 延伸 |

| | | | | |
|---|------|------|---|-----|
| 5 | 72°C | 5min | 1 | 终延伸 |
|---|------|------|---|-----|

1*: 退火温度和延伸时间根据引物及扩增基因的长度进行修改。

2*: 在以裂解产物为模板进行 PCR 时, 建议循环数比以纯化的 DNA 为模板时增加 5 个循环。

5. 质控设置

为了便于后续实验结果的分析, 我们建议在进行了 PCR 时, 设置以下对照组以便于排除假阳性和假阴性的干扰。

- ◆ 空白对照: 以去离子水代替 PCR 模板, 进行后续 PCR 检测, 以验证 PCR Mix 有没有被污染。
- ◆ 阳性对照: 以纯化的样本 DNA 为 PCR 反应模板, 进行后续 PCR 检测, 以验证 PCR mix 的有效性。

6. 电泳检测

由于本公司所用 PCR Mix 会与 SDS 反应, 在使用某些公司提供的 DNA Loading Buffer 后, 在凝胶成像仪检测时泳道中会形成亮团, 影响用户对实验结果的观测。因此, 建议客户在电泳检测时使用不含有 SDS 的 Loading Buffer 进行上样。建议用户使用随试剂盒提供的 6x DNA Loading Buffer。

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)

