

GF-1 植物 DNA 提取试剂盒说明书

版本 2.2

产品简介:

GF-1 植物 DNA 提取试剂盒专业快速、高效纯化各类植物组织中的基因组 DNA，不需要进行沉淀或有机提取法。本试剂盒采用一个经特殊处理的玻璃滤膜固定到柱子中，在高盐下有效地结合 DNA。试剂盒应用核酸纯化柱技术，使用最佳缓冲液，以确保只有 DNA 被分离，在随后的洗涤步骤中除去蛋白质，其他杂质、添加剂、防腐剂。高纯度的基因组 DNA 在水或低盐缓冲液中被洗脱，其 A260/280 比值为 1.7-1.9，可用于许多常规的分子生物学实验，如酶切，Southern 印迹杂交，DNA 指纹分析，PCR 和其他操作。

试剂盒组成成份

	5 次	25 次	100 次	200 次
产品目录号	样品	CN/GF-PT-025	CN/GF-PT-100	CN/GF-PT-200
组份				
GF-1 亲和柱(GF-1 columns)	5	25	100	200
收集管 (Collection tubes)	5	25	100	200
缓冲液 PL (Buffer PL)	2ml	9ml	36ml	72ml
缓冲液 PB (Buffer PB)	4ml	17ml	70ml	2 x 70ml
洗涤液 (浓缩液) *	2.4ml	12ml	2 x 24ml	3 x 34ml
Wash Buffer(concentrate)*				
洗脱液 (Elution Buffer)	1.5ml	5ml	20ml	40ml
蛋白酶 K* (Proteinase K*)	0.11ml	0.55ml	2 x 1.05ml	4 x 1.05ml
使用说明 (Handbook)	1	1	1	1

注意：标*的请参照配制方案以及其储存条件和稳定性。

GF-1 植物 DNA 提取试剂盒有 25 次、100 次、200 次包装。本试剂盒仅供研究使用。

注：GF-1 植物 DNA 提取试剂盒可以从 10-30mg 植物组织中优化分离高达 20µg DNA。植物组织样本细胞数的不同取决于组织的年龄、类型和起源。处理样本时，起始样本数量不要超过推荐的数量，过度的细胞数量将使管子超载。这将导致得率和纯度的降低。建议使用前称量组织样本，以确保获得最佳的产量和纯度。

自备材料

无水乙醇 (>95%)

RNase A (无 DNA 酶) (20mg/ml)

配制方案

贴有洗涤液标签的浓缩液，在使用前需用无水乙醇 (>95%) 稀释。

样品 (5 次):

在洗涤液中加入 7ml 无水乙醇。

CN/GF-PT-025(25 次)

在洗涤液中加入 28ml 无水乙醇。

CN/GF-PT-100(100 次)

在洗涤液中加入 56ml 无水乙醇。使用完后再以同样的方法稀释第二瓶洗涤液。

CN/GF-PT-200(200 次)

在洗涤液中加入 56ml 无水乙醇。使用完后再以同样的方法稀释第二瓶洗涤液。

洗涤液使用后拧紧瓶盖，室温保存。

储存及稳定性

- 溶液 20°C-30°C 保存。
- 蛋白酶 K -20°C 保存。
- 试剂盒各组份自生产之日起可稳定保存 12 个月。缓冲液 PB 在室温过低时易出现结晶，使用前请置于 55°C-65°C 环境中至晶体完全溶解。

化学危害

缓冲液 PB 含有胍盐，当接触皮肤或吞服时可能造成危害。使用时一定要戴上手套并做好安全防护措施。不能将含有漂白剂或任何形式的酸性溶液加入到含有胍盐的提取废料中来进行消毒。清洁沾染试剂的物品，不需要用漂白剂和酸性溶液清洗，只需浸泡在洗涤剂和水中来即可除去胍盐。

操作步骤

提示

- 所有操作均在室温环境下操作，除非另有说明。
- 洗涤液 (浓缩液) 在使用前务必用无水乙醇稀释，请参照配制方案。
- 如果缓冲液 PB 出现沉淀或结晶，请置于 55°C-65°C 环境中至晶体完全溶解。
- 预先设定 65°C 水浴锅。
- 65°C 预热洗脱液 (可选)。

1、样品均质化

取 10-30mg 组织，用一干净刀片切成小块。用研钵和研棒将冷冻的样品在液氮中磨成细粉。

注：组织样本应磨成细粉，确保在下一步骤中能完全裂解。

2、组织裂解

在磨碎的样本中加入 280µl 缓冲液 PL，漩涡振荡 30 秒，充分混匀，获得一份均匀溶液。然后加入 20µl 蛋白酶 K，上下颠倒，充分混匀，放入摇床，65°C 温育 1-2 小时 (如果组织混合物出现不清晰，需要温育过夜)，也可在温育过程中混匀数次，确保样本彻底消化。

注：如果组织没有绞碎，将样品在缓冲液 PL 中同质化，用管杵捣碎。不同类型的组织在溶解程度上也不尽相同。如果仍有不溶解的组织存在，延长温育时间，或者增加蛋白酶 K 的数量，确保组织细胞彻底裂解。

3、离心

14,000-16,000 x g (13,000-14,000rpm) 离心 5 分钟，离心任何不溶性沉淀和未经消化的物料。转移含有 DNA 的上层液体至一干净的微量离心管中。

注：如果固体没有被完全离心下来，请延长离心时间。

RNA 的去除 (可选)

如果要求 DNA 中无 RNA 污染，则加入 20µl RNA 酶 A (无 DNA 酶，20mg/ml)，混匀，37°C 温育 5 分钟。

注：柱子洗涤期间会将残留的 RNA 片段去除。

4、溶液均质化

加入 2 倍体积的缓冲液PB（若无RNA酶A处理，则加入 600μl；若经RNA酶处理，则加入 640μl），上下颠倒数次，充分混匀，直到获得一份均匀的溶液。温育 10 分钟。

注：DNA含量高可能出现沉淀。混合并 65℃温育后裂解产物应变得清澈。

5、加入乙醇

加入 200μl无水乙醇，立即充分混匀。

注：立即混匀以防止任何由于局部高浓度乙醇引起的不均匀核酸沉淀。

6、装载到亲和柱

将最大不要超过 650μl 的样品转移到一帶有干净收集管的亲和柱中，10,000 x g (11,000 rpm)离心 1 分钟，丢弃废液。

重复操作剩余样本。

注：若柱子堵塞，加入 200μl 缓冲液 PB，10,000 x g (11,000 rpm) 离心 1 分钟，丢弃废液。

7、亲和柱洗涤

加入 650μl 洗涤液于亲和柱中，10,000 x g (11,000 rpm) 离心 1 分钟，丢弃废液。如果仍有色渍留在柱子膜上，则重复洗涤。

注：使用前确保洗涤液已用无水乙醇稀释（参照配制方案）。

8、亲和柱干燥

10,000 x g (11,000 rpm) 离心柱子 1 分钟，除去残留乙醇。

注：这个步骤是为了完全除去所有残留乙醇，因为残留乙醇会影响DNA质量，还可能抑制后续的酶反应。

9、DNA洗脱

将亲和柱放入一干净的微量离心管中，取 50-100μl 预热洗脱液，TE 缓冲液或无菌水直接加到亲和柱的膜中央，室温静置 2 分钟，10,000 x g (11,000 rpm) 离心 1 分钟，以洗脱 DNA。DNA 4℃或 -20℃保存。

注：确保洗脱液被直接加入到膜中央以完全洗脱 DNA。TE 缓冲液中的 EDTA 可能抑制后续的酶反应，但仍可洗脱 DNA，如果用水洗脱 DNA，PH7.0-8.5 时洗脱效果最好。当没有缓冲剂存在的情况下，DNA 可能降解，此时 DNA -20℃保存。

故障排除

不按照给定的说明进行操作将会出现不符合标准的结果，将影响 DNA 的得率和质量，如果出现此类问题，请参照以下内容处理：

问题	可能的原因	建议
DNA 得率低	样本没有完全均质化	确保组织在缓冲液PL中完全均质化。
	样本不新鲜或保存不当	-70℃可长期保存。
	样本裂解不完全	确保组织在缓冲液PL中完全均质化，温育期间若不使用有摇床，应经常手动摇晃混合。
	洗脱效果差	洗脱液 65℃-70℃预热。
纯度低	亲和柱堵塞	参照问题“亲和柱堵塞”。
	蛋白质变性不完全	延长温育时间直到裂解产物变得清澈。

问题	可能的原因	建议
纯度低	RNA 污染	将RNase A加入指定步骤中的样品中，确保RNase A没有反复冻融。如有必要准备新鲜的材料。
DNA 没有被洗脱	洗脱液不正确	确保所用洗脱液为低盐缓冲液或pH为 7.0-8.5 的水。
亲和柱堵塞	柱子装量超载或样品材料过多	样本材料不要超过 30mg。如果有任何未消化的物质遗留，离心去除组织裂解产物，转移上清到一个新的微量离心管。
	样本没有完全均质化	加入蛋白酶K前，在缓冲液PL中漩涡振荡样品。
DNA 降解或污染	纯化过程中，DNA 碎裂	在加入缓冲液PL和蛋白酶K后，避免剧烈混合并吹打，应轻轻地颠倒混匀。
	核酸酶污染	使用经消毒的玻璃器皿和塑料制品并戴手套。 确保组织在缓冲液PL和蛋白酶K中完全均质化。
洗脱的 RNA 在下游应用中性能差	洗脱下来的DNA含有残留乙醇	确保在洗脱之前柱子已进行离心干燥。

上海凯斯泰尔生物科技有限公司

地址：上海市浦东新区康新公路 3377 号 2 号楼 604 室

电话：021-68060114

传真：021-68060114

邮箱：info@kestrel-china.com

网址：www.kestrel-china.com

Vivantis Technologies Sdn Bhd

1012 S.Coast Highway Suite 1,Oceanside CA 92054, USA.

Tel: +6 03 8025 1603

Fax: +6 03 8025 1637

Email: info@vivantechnologies.com

international@vivantechnologies.com

Web: www.vivantechnologies.com