

(PDF压缩器 - 未注册版)

**Plant Direct PCR Kit**

**PD105**



[www.vazyme.com](http://www.vazyme.com)  
Vazyme Biotech Co., Ltd.

---

**使用说明书**  
Version 7.1

## 目录 Contents

01/产品概述	02
02/产品组分	02
03/保存条件	02
04/质量控制	02
05/实验流程	03
06/应用实例	04
07/注意事项	05
08/常见问题与解决方案	08

## 01/产品概述

本产品适用于对植物叶片、种子等进行直接扩增，可用于非多糖、多酚类植物样品高通量筛选。经过定向进化改造的直接DNA聚合酶，对植物中的PCR抑制物具有极强的耐受性，同时保持了极高的扩增性能，适用于5 kb以内DNA片段的扩增；试剂盒中的独特裂解缓冲液A可用于裂解新鲜或冻存的植物组织，操作简单，所得裂解物无需转化即可作为扩增模板。裂解液中加入的保护剂使得样品多次冻融后仍可有效扩增。预先配置的2 × Plant Direct Master Mix只需加入引物和模板即可进行扩增反应，减少了移液操作，提高了检测通量和结果的重现性。扩增产物为平末端，适用于ClonExpress®快速克隆试剂盒(C112/C113/C114)。

## 02/产品组分

组分	PD105-01	PD105-02
	50 rxn (50 µl/rxn)	200 rxn (50 µl/rxn)
2 × Plant Direct Master Mix	1.25 ml	4 × 1.25 ml
Plant Direct Lysis Buffer A	5 ml	20 ml
Plant Direct Lysis Buffer B*	5 ml	20 ml

\* Plant Direct Lysis Buffer B为可选试剂，用于中和Plant direct Lysis Buffer A，延长样本保存时间，可根据实际情况选择使用。

## 03/保存条件

2 × Plant Direct Master Mix请置于-20°C保存，避免反复冻融；

Plant Direct Lysis Buffer可置于-20°C或2-8°C保存。

## 04/质量控制

核酸内切酶残留检测：20 µl本品和0.3 µg pBR322 DNA在37°C下孵育4 h，经琼脂糖凝胶电泳，质粒的电泳谱带不发生变化。

大肠杆菌DNA残留检测：20 µl本品中残留的核酸经*E. coli* gDNA特异性的TaqMan qPCR检测，*E. coli*基因组残留低于10拷贝。

功能检测：50 µl PCR体系中，分别以1 µl玉米种子裂解液、1 µl小麦叶片裂解液和直径0.5 mm水稻叶片为模板，扩增长度分别为300 bp-2.3 Kb的4个不同目的片段，延伸时间设置为1 min/kb。35个循环后取1/10 PCR产物进行1%琼脂糖凝胶电泳，EB染色，可见有单一的相应条带。

## 05/实验流程

### 样品处理

#### 植物叶片

**直接法:** 推荐使用幼嫩叶片。为了获得小且统一的样品, 推荐使用固定直径0.5-3 mm的打孔器打取样本<sup>a</sup>, 并将所取的样本直接加入到PCR反应体系中(推荐使用50  $\mu$ l体系)。请注意, 确保样品处于PCR溶液中, 而非贴在管壁上。如果用直接PCR法进行较长片段和复杂样本的扩增, 取直径较小(0.5-1 mm)的样本作模板有助于获得更好的结果。

**研磨裂解法:** 推荐使用幼嫩叶片。取一小块叶片(直径约1-3 mm), 将其置于20  $\mu$ l Plant Direct Lysis Buffer A中<sup>b</sup>, 并将其尽量磨碎(此步骤可使用100  $\mu$ l枪头挤压叶片以捣碎样本)。如果叶片组织的使用量较大(请勿超过7 mm), 请将稀释缓冲液的体积增加至50  $\mu$ l。叶片磨碎后, 溶液应该呈现绿色。短暂离心后, 取1  $\mu$ l上清加入PCR反应体系中作为反应模板<sup>c</sup>。

**加热裂解法:** 推荐使用幼嫩叶片。取一小块叶片(直径约1-3 mm), 将其置于20  $\mu$ l Plant Direct Lysis Buffer A中, 95°C加热5-10 min, 针对较难裂解的叶片可适当延长裂解时间(不超过20 min)。如果叶片组织的使用量较大(请勿超过7 mm), 请将裂解缓冲液的体积增加至50  $\mu$ l。加热结束后短暂离心, 取1  $\mu$ l上清加入PCR反应体系中作为反应模板<sup>c</sup>。

#### 植物种子

**研磨裂解法:** 使用解剖刀切取直径约5 mm大小的种子, 将其加入到100  $\mu$ l Plant Direct Lysis Buffer A中, 用枪头或其他方式磨碎样本。简短涡旋振荡后于室温放置3-5 min。确保种子样本浸没在稀释缓冲液中。短暂离心后, 取1  $\mu$ l上清加入PCR反应体系中作为反应模板<sup>c</sup>。

**加热裂解法:** 用解剖刀切取直径约5 mm大小的种子, 将其加入到100  $\mu$ l Plant Direct Lysis Buffer A中, 85°C加热5-10 min, 针对较难裂解的样本可适当延长裂解时间(不超过30 min)。加热结束后短暂离心, 取1  $\mu$ l上清加入PCR反应体系中作为反应模板<sup>c</sup>。

- 取样时也可使用剪刀或其他工具剪取适宜大小的样本; 如果打孔器或剪刀重复使用, 应在每次使用前用2%的次氯酸钠清洗清洁, 防止样品之间交叉污染。
- 使用前须确保Plant Direct Lysis Buffer已充分融化, 如粘稠或有沉淀, 可于37°C加热使其完全融化后再使用。
- 根据植物材料和所加稀释液体积的不同, 可适当调整反应体系中的模板体积。

### Plant Direct Lysis Buffer

本品中包含的Plant Direct Lysis Buffer A经过严格的优化, 可释放大部分植物组织的基因组, 并适于在4°C短期储存植物粗品。若需将样品储存较长时间(如1-2个月), 建议将上清转移到新的EP管中, 存于-20°C。为更稳定地保存样品, 可在转出来的上清中加入等体积附赠的Plant Direct Lysis Buffer B, 混匀后置于-20°C保存, 稳定保存时间随植物样本和状态不同而有所不同。

**反应体系**

ddH <sub>2</sub> O	To 20.0 µl	To 50.0 µl
2 × Plant Direct Master Mix <sup>a</sup>	10.0 µl	25.0 µl
Primer1 (10 µM) <sup>b</sup>	0.8 µl	2.0 µl
Primer2 (10 µM) <sup>b</sup>	0.8 µl	2.0 µl
植物叶片/粗提样品(见样品处理) <sup>c</sup>	0.5-3mm 叶圆片/x µl	0.5-3mm 叶圆片/x µl

a. 包含终浓度为2 mM的 Mg<sup>2+</sup>。

b. 推荐每条引物使用浓度为0.4 µM，引物使用量过多会导致非特异性扩增增加。

c. 样品使用量可根据实际情况调整；裂解法粗品单个反应使用量可在反应总体积的2%-20%之间调整，使用过多易导致扩增失败。

**反应程序**

循环步骤	温度	时间	循环数
预变性 <sup>a</sup>	98°C	5 min	} 35 cycles <sup>d</sup>
变性	95°C	10 sec	
退火 <sup>b</sup>	58-72°C	15 sec	
延伸 <sup>c</sup>	72°C	30 sec/kb	
彻底延伸	72°C	5 min	

a. 预变性(98°C, 5 min)可促进植物组织裂解，释放可用于PCR扩增的基因组DNA。请勿缩短时间或降低温度。

b. 一般设置成等于引物Tm值或高于Tm值2-4°C。本产品中使用的直扩DNA聚合酶不同于普通Taq酶，对于反应退火温度有特殊要求，使用高的退火温度可以有效减少非特异性扩增，提高扩增效率。对于复杂模板，需要调节退火温度和延长延伸时间来实现高效扩增。

c. 若扩增产物长度≤ 1 kb，延伸时间按30 sec/kb 设定；若扩增产物长度> 1 kb，延伸时间按60 sec/kb 设定。

d. 对于复杂样本或扩增产量较低的样品可适当提高循环数至40-50个循环。

**06/应用实例**

使用本试剂盒对实验室常见的五种植物进行直接扩增。使用研磨裂解法对烟草叶片、拟南芥叶片、小麦叶片、水稻叶片和玉米种子进行处理，所得粗品作为模板，同时以CTAB法提取的上述五种植物基因组DNA为对照，使用2 × Plant Direct Master Mix分别扩增长度为0.5 kb、2.0 kb、0.3 kb、1.5 kb、2.3 kb、0.8 kb、0.3 kb的7个不同目的片段，引物Tm值在60-88°C之间(使用Primer Premier 5计算)。反应体系配制及反应程序如下：

**反应体系**

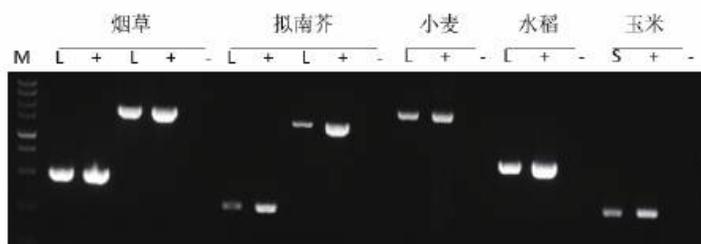
ddH <sub>2</sub> O	To 20.0 µl
2 × Plant Direct Master Mix	10.0 µl
Primer1 (10 µM)	0.8 µl
Primer2 (10 µM)	0.8 µl
植物粗提样品	1.0 µl

## 反应程序

循环步骤	温度	时间	循环数
预变性	98°C	5 min	} 35 cycles
变性	95°C	10 sec	
退火	60°C/64°C/68°C*	16 sec	
延伸	72°C	30 sec-2 min	
彻底延伸	72°C	5 min	

\* 扩增小麦2.3 kb目的片段和玉米0.3 kb目的片段时，退火温度分别设为68°C和64°C；其余体系引物退火温度设为60°C。

## 扩增产物电泳检测结果



由图可知，使用本试剂盒可以对五种植物粗品进行有效扩增。

L, 叶片粗品; S, 种子粗品; +, 基因组DNA; -, 无模板对照; M, DL5,000 DNA Marker.

## 07/注意事项

1. 对于植物粗品扩增或直扩，建议实验开始前以纯化的基因组DNA作为阳性对照，确保体系、引物及操作无误。

2. 本试剂盒使用的直扩DNA聚合酶具有较强的校对活性。因此，如扩增产物需要进行TA克隆，加A之前必须进行DNA纯化。

### 3. 引物设计:

引物3'端最后一个碱基最好为G或者C;

引物3'端最后8个碱基应避免出现连续错配;

引物3'端应避免出现发夹结构;

正向引物和反向引物的Tm值相差不超过1°C为佳，Tm值调整至60-72°C为佳(引物Tm值推荐使用Primer Premier 5进行计算);

引物额外附加序列，即与模板非配对序列，不应参与引物Tm值计算;

引物的GC含量控制在40%-60%之间;

引物A、G、C、T整体分布要尽量均匀，避免使用GC或者AT含量高的区域;

引物内部或者两条引物之间避免有5个碱基以上的互补序列，两条引物的3'端避免有3个碱基以上的互补序列;

引物设计完毕请使用NCBI BLAST功能检索引物特异性，以避免非特异性扩增产生。

## 06/常见问题与解决方案

### ◇样本处理

①使用植物叶片直扩时，推荐使用50  $\mu$ l反应体系并使用直径大小为0.5-3 mm的幼嫩叶片。较小反应体系和过多的叶片使用量易导致扩增失败。

②使用植物粗品作为模板扩增时，可通过调整粗品处理方式和使用量来获得更优扩增效果。可尝试将Plant Direct Lysis Buffer A中的样本捣碎后于室温孵育3 min；将加入的模板在0.5-5  $\mu$ l之间调整，或将粗品按1:1-1:10的比例稀释后，取1  $\mu$ l作为模板；需注意的是，植物样本和粗品中存在PCR反应的抑制成分，加入过多模板容易抑制反应导致扩增失败。对于难以扩增的样本，可尝试在Plant Direct Lysis Buffer A中加入终浓度为2%的 $\beta$ -巯基乙醇或10 mM的DTT。

### ◇其他常见问题

#### 无产物或产物量少

重复实验	确认反应体系配制、反应程序设置无误
引物	优化引物设计，确认引物浓度和纯度
退火温度	设置退火温度梯度，找到合适的退火温度
反应体系	提高 $Mg^{2+}$ 浓度
反应程序	增加循环数，或延长延伸时间
模板使用量	尝试不同的模板用量，增大反应体积或尝试使用BME/DTT

#### 有杂带或弥散条带

引物	优化引物设计，降低引物浓度
退火温度	尝试提高退火温度或设置退火温度梯度，减少退火时间
反应程序	减少总循环数，延伸时间不超过60 sec/kb
模板使用量	尝试不同的模板用量，增大反应体积或尝试使用BME/DTT

(PDF压缩器 - 未注册版)



**Vazyme Biotech Co., Ltd**

**Web: [www.vazyme.com](http://www.vazyme.com)**

**Tel: 400-600-9335**

**Sales: [sales@vazyme.com](mailto:sales@vazyme.com)**

**Support: [support@vazyme.com](mailto:support@vazyme.com)**

**Service: [service@vazyme.com](mailto:service@vazyme.com)**



企业已通过 ISO 9001:2015  
国际质量管理体系认证

