

(核酸直接释放)

Nu-P0101

试剂盒应用

本试剂盒适用于烟草、拟南芥、水稻、大豆、油菜、玉米、小麦等常见物种叶片和种子的 PCR、荧光定量 PCR 检测。使用该试剂盒无需液氮研磨，无需使用氯仿，无需重复离心、无需区分多糖多酚含量便可获得用于 PCR 反应的基因组模板。

依托 Nu-Smart®平台 PL-DNA Lysis 采用专利配方，5 分钟内获得花瓣、花蕊、种子、叶片、根、茎等样本的基因组 DNA。叶片仅需取材 1-4mm，取样量小，减少对样品的损耗。

预制的 2× Plant SuperTaqMix 只需要加入引物和模板 DNA 即可进行 PCR 反应，减少移液次数，实现高通量扩增。该体系中添加有染料，PCR 结束后直接进行琼脂糖凝胶电泳，使用方便快捷。

本试剂盒仅供研究使用，不可用于临床、食品、化妆品等领域。

试剂盒组成

组分	Nu-P0101 (50T)	Nu-P0102 (250T)
PL-DNA Lysis	1 mL	5 mL
2× Plant SuperTaqMix	500 μL	2×1.25mL

保存条件

-20°C 保存。

PL-DNA Lysis 和 2× Plant SuperTaqMix 经常使用可 4°C 保存，避免反复冻融。

需要准备

水浴锅或金属恒温浴、PCR 仪

使用方法

一、不同样品的处理方法

1. 叶片的处理

- (1) 用眼科剪或叶片取样器剪取 1-4mm 的叶片。
- (2) 加入 20 μL PL-DNA Lysis。
- (3) 充分混匀，确保叶片在液面下。
- (4) 置于 55°C 作用 5 分钟。溶液即为 DNA 模板。

2. 种子和果实的处理

- (1) 研磨后种子或 1-2mm 果肉放入离心管中。
- (2) 加入 20 μL PL-DNA Lysis。
- (3) 充分混匀。
- (4) 置于 55°C 作用 5 分钟。

(5) 10,000rpm 离心 1 分钟，上清即为 DNA 模板。

二、推荐 PCR 反应体系

	20 μ L 体系 (推荐)	50 μ L 体系
2 \times Plant SuperTaqMix	10 μ L	25 μ L
引物 1 (10 μ M)*	1 μ L	2 μ L
引物 2 (10 μ M)*	1 μ L	2 μ L
DNA 模板	0.5-2 μ L	0.5-3 μ L
ddH ₂ O	补足至 20 μ L	补足至 50 μ L

※：引物浓度可以在 0.1-0.5 μ M 范围内进行调节。

三、按照以下方法设定 PCR 反应

步骤	温度	时间	循环数
预变性	95 $^{\circ}$ C	5 min	1
变性	95 $^{\circ}$ C	15-30 s	} 35-40
退火	50~72 $^{\circ}$ C	30 s	
延伸	72 $^{\circ}$ C	1 kb/min	
彻底延伸	72 $^{\circ}$ C	5 min	1
	4 $^{\circ}$ C	Hold	1

注意事项

一、试剂盒使用前注意事项

- (1) 所有试剂应按照指定温度储存。请勿反复冻融。
- (2) 使用前均需要对操作区进行消毒，消毒方式可以采用 75%乙醇或核酸消除剂等。耗材均需使用商品化的无酶耗材。
- (3) PL-DNA Lysis 频繁使用，可在 4 $^{\circ}$ C 保存。长期不使用可放 -20 $^{\circ}$ C 保存。

二、样本注意事项

- (1) 不同叶片使用不同的取样器进行处理，防止交叉污染导致检测结果偏差。
- (2) 叶片剪取不宜过大，以 1-4mm 为宜。
- (3) 种子样本大小不一，建议研磨后使用。

三、试剂盒使用过程中注意事项

- (1) PCR 过程中推荐使用阴性对照和阳性对照。
- (2) 整个过程中使用的吸头、离心管等耗材应丢弃在含有 75%乙醇或核酸消除剂的容器中，减少环境污染。
- (3) 2 \times Plant SuperTaqMix 包含染料，可在反应结束后直接进行琼脂糖凝胶电泳。

四、试剂盒使用后注意事项

- (1) PL-DNA Lysis 处理后的 DNA 模板可在 -20 $^{\circ}$ C 保存至少 1 个月，如需长期保存，可离心后取上清置 -80 $^{\circ}$ C 保存。避免反复冻融，防止基因组断裂。
- (2) PCR 反应完成后，严禁在实验区开盖。应在污染区进行琼脂糖凝胶电泳，防止气溶胶污染。
- (3) 为防止试剂盒污染，请勿将不同批号试剂盒混用。

检测实例

叶片			
烟草	拟南芥	水稻	大豆
玉米	油菜	小麦	棉花
百脉根	西红柿	茄子	香蕉
西瓜	荔枝	龙眼	铁皮石斛
果实和种子			
水稻	油菜	玉米	大豆
小麦	棉花	西红柿	茄子
胡萝卜	香蕉	荔枝	龙眼
苹果	草莓	土豆	西瓜
中草药			
白木耳	灵芝	丹参	益母草
红花	紫草	苦参	艾草

常见问题解析

问题	可能原因	推荐解决方案
阳性对照和样本都未出现扩增条带	(1) PCR 条件并非最优 (2) 2× Plant SuperTaqMix 保存不当 (3) 引物并非最优	(1) 推荐使用梯度 PCR 摸索最佳 PCR 反应条件。 (2) 2× Plant SuperTaqMix 应在-20℃保存，使用过程中置于冰浴中。避免反复冻融。
阳性对照有条带，但是样本无条带或者条带比较弱	(1) PCR 条件并非最优 (2) DNA 模板量太大 (3) 基因组断裂或者降解 (4) PCR 循环数不合适 (5) 样本过大 (6) 扩增片段太大 (7) 引物浓度不合适	(1) 推荐使用梯度 PCR 摸索最佳 PCR 反应条件。 (2) 增大 PCR 反应体系，过多使用 DNA 模板会导致扩增效率下降，推荐使用模板量为 0.5-2μL。 (3) 推荐使用 35-40 个循环，但是模板复杂，可适当增加 5 个循环。 (4) 叶片大小为 1-4mm，样本比较大可适当增加 PL-DNA Lysis 用量。 (5) 种子样本大小差异比较大，推荐磨碎取小量进行检测。 (6) 推荐扩增 5kb 以内基因。
非特异性条带多	(1) 退火温度偏低 (2) PCR 循环数过多 (3) 引物浓度过高 (4) 引物并非最优	(1) 推荐使用梯度 PCR 对退火温度进行摸索。 (2) 推荐使用 35-40 个循环进行扩增。 (3) 降低引物浓度，使引物终浓度在 0.1-0.5μM。 (4) 重新设计引物。
阴性对照出现条带	(1) 引物污染 (2) 无菌水污染 (3) 操作工具污染 (4) 样本间交叉污染 (5) PCR 产物间污染	(1) 使用耗材需要经过无酶处理。 (2) 使用移液器时防止液体飞溅。 (3) 减少开盖次数，防止气溶胶污染。 (4) 使用的吸头、离心管等耗材应丢弃在含有 75%乙醇或核酸消除剂的容器中，防止形成环境污染。 (5) 定期对样本处理区域进行消毒。