

高质量植物/真菌 DNA 提取试剂盒

一、产品简介

本试剂盒不使用氯化苯、苯酚、氯仿等有害有机溶剂。

研磨破碎细胞后 Buffer PFHG1 释放 DNA, RNase A1 降解 RNA, 离心沉淀去除组织碎片和大部分多糖; Buffer PFHG2 选择性沉淀 DNA, 进一步使用 Buffer PFHG2 洗涤去除大部分多酚和色素等代谢物; Buffer PFHG3 配合 Proteinase K 释放 DNA; Buffer PFHG4 促使溶液分相彻底去除多糖、多酚和色素等杂质; 通过异丙醇沉淀的方法回收基因组 DNA。

大多数新鲜植物叶片或者真菌菌丝每 200 mg 样品可获得不少于 100 µg DNA, DNA 长度可达 150 kb(DNA 得率和完整性与样品种类、取材部位和新鲜程度有关), 彻底去除多糖、多酚和色素等杂质, 特别适用于酶切、Southern 杂交与三代测序。

二、试剂盒组成和储存

组成内容	DK701-01	DK701-02
	(可从 10g 植物或真菌中提取基因组 DNA)	(可从 40g 植物或真菌中提取基因组 DNA)
Proteinase K*	0.5 ml	1 ml ×2
RNase A1 [§]	0.25 ml	1 ml
Buffer PFHG1	60 ml	240 ml
Buffer PFHG2	120 ml	240 ml ×2
Buffer PFHG3	30 ml	120 ml
Buffer PFHG4 [†]	6 ml	24 ml
TE**	30 ml	120 ml
1 ml 塑料滴管	100 个	800 个
说明书	1 份	1 份

*Proteinase K: 20 mg/ml, 室温保存。可能会析出白色粉末状、絮状或者晶体状不溶物, 不影响使用效果, 使用前混合均匀。

§RNase A1: 50 mg/ml, -20℃长期保存。

†Buffer PFHG4: 使用前需2-8℃预冷, 为方便使用可以长期放于2-8℃。

**TE: 10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, 0.25%NaN₃, pH 8.0(25℃)。

三、安全注意事项

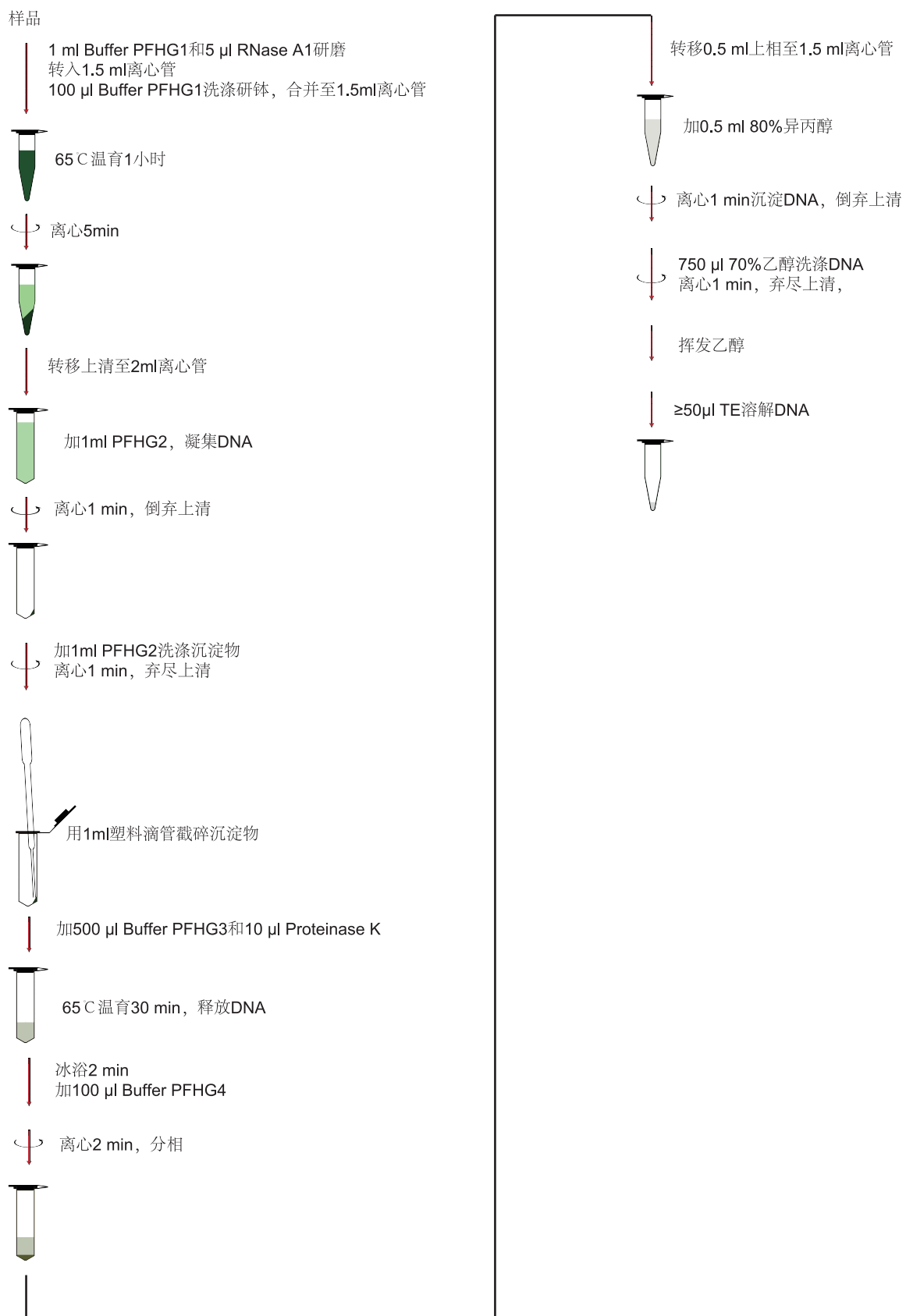
Buffer PFHG1、Buffer PFHG3 和 Buffer PFHG4 含刺激性化合物, 避免沾染皮肤、眼睛和衣服、谨防吸入口鼻。若沾染皮肤、眼睛, 立即使用大量水或生理盐水冲洗沾染处, 必要时寻求医疗咨询。

四、实验准备

- 65℃水浴或者温箱。
- 80%异丙醇, 70%乙醇。
- 2-8℃预冷 Buffer PFHG4, 为方便操作可将 Buffer PFHG4 长期放于 2-8℃。

五、操作流程示意图

以200 mg组织或者 1×10^8 细胞为例



六、操作步骤

所有离心操作均为室温 12,000×g 或者计速为 rpm 的台式离心机使用最高转速减 1000 rpm。

以下操作步骤以起始样品量为 200 mg 组织或者 1×10^8 细胞为例，其他起始样品量参考表 1 计算需使用试剂的体积。

表 1. 不同起始量的样品需使用试剂的体积

植物或者真菌组织	100 mg	200 mg	400 mg*
真菌细胞	5×10^7	1×10^8	2×10^8 *
Buffer PFHG1	0.5 ml	1 ml	2 ml
RNase A1	2.5 μ l	5 μ l	10 μ l
Buffer PFHG1(洗涤研钵)	100 μ l		
Buffer PFHG2(步骤 5)	0.5 ml	1 ml	2 ml
Buffer PFHG2(步骤 6)	0.5 ml	1 ml	2 ml
Buffer PFHG3(步骤 8)	250 μ l	500 μ l	1 ml
Proteinase K(步骤 8)	5 μ l	10 μ l	20 μ l
Buffer PFHG4(步骤 10)	50 μ l	100 μ l	200 μ l
吸取上相体积(步骤 11)	250 μ l	500 μ l	1 ml
80%异丙醇(步骤 12)	250 μ l	500 μ l	1 ml
70%乙醇(步骤 13)	1/2 离心管体积		
TE	$\geq 50 \mu$ l	$\geq 100 \mu$ l	

*起始样品超过 200 mg 组织或者 1×10^8 细胞，步骤建议使用 2 个或者多个 1.5ml 或者 2ml 离心管操作。

1. 称取 **200 mg 植物样品**，或者离心收集 **1×10^8 真菌细胞**。

2. 根据样品种类和实验条件选择如下方法研磨破碎样品：

A 使用液氮和研钵研磨 (处理幼嫩植物组织和菌丝最佳方法)

A1. 将样品转入研钵中，加液氮浸没样品，用研磨杵轻轻敲打样品使样品成为小碎块，等大部分液氮挥发后快速研磨至样品成粉末状；再加入少量液氮，等大部分液氮挥发后，再快速研磨 10-20 次；

A2. 立即加入 **1 ml Buffer PFHG1** 和 **5 μ l RNase A1**，快速研磨使 Buffer PFHG1 完全覆盖在样品上；

A3. 室温放置或者水浴加热，样品开始融化后立即快速研磨至样品完全融化；

A4. 将 1ml 枪头剪掉 1-2 mm，吸取溶液转入 1.5ml 离心管中；或者直接将溶液倒入 1.5ml 离心管中；

A5. 在研钵中加入 **100 μ l Buffer PFHG1**，研磨数次，将溶液合并到步骤 A4 中的离心管中，剧烈摇晃混合均匀；继续操作步骤 3；

B 研钵直接研磨 (处理幼嫩植物组织和菌丝，此方法不能充分破碎细胞壁，产量会比其加液氮后研磨的方法低)

B1. 剪碎样品放入研钵中，加入 **1 ml Buffer PFHG1** 和 **5 μ l RNase A1**，快速研磨至无明显的块状组织；

B2. 将 1ml 枪头剪掉 1-2 mm，吸取溶液转入 1.5ml 离心管中；或者直接将溶液倒入 1.5ml 离心管中；

B3. 在研钵中加入 **100 μ l Buffer PFHG1**，研磨数次，将溶液合并到步骤 B2 中的离心管中，剧烈摇晃混合均匀；继续操作步骤 3；

C 使用 1-2mm 玻璃珠和研钵研磨 (推荐处理老化的植物、藻类、真菌组织，培养的真菌细胞)

C1. **植物、藻类和真菌组织**：剪碎后放入研钵中，加入 **1 ml Buffer PFHG1** 和 **5 μ l RNase A1** 和 1-2mm 玻璃珠，研磨至无明显的块状组织；

培养的真菌细胞：离心收集细胞去除培养基，加 **1 ml Buffer PFHG1** 和 **5 μ l RNase A1** 悬浮细胞转入研钵中，加 1-2mm 玻璃珠，快速研磨；

C2. 将 1ml 枪头剪掉 1-2 mm，吸取溶液转入 1.5ml 离心管中；或者直接将溶液倒入 1.5ml 离心管中；

C3. 在研钵中加入 **100 μ l Buffer PFHG1**，研磨数次，将溶液合并到步骤 C2 中的离心管中，剧烈摇晃混合均匀；继续操作步骤 3；

3. 65°C温育 1 小时，温育期间剧烈摇晃混合 1-2 次。

4. 离心 5min，将上清转入干净的 2ml 离心管中。

▲植物叶片等组织如果在步骤 2 没有充分研磨粉碎，有少量组织漂浮在溶液表面，应仔细吸取溶液转入干净的 2ml 离心管中。

5. 加入 **1 ml Buffer PFHG2**，缓慢摇晃 10 次，再剧烈摇晃 10 次。

6. 离心 1 min，倒弃上清；加入 **1 ml Buffer PFHG2**剧烈摇晃 10 次。

7. 离心 1 min，倒弃上清；将离心管倒扣在吸水纸上 2 min；或者简短离心，仔细吸除残留的上清。

8. 用 1ml 塑料滴管戳碎沉淀物(约反复 10 次)，加入 **500 µl Buffer PFHG3**和 **10 µl Proteinase K**剧烈摇晃悬浮沉淀物。

9. 65°C温育 30 min，温育期间剧烈摇晃混合 1-2 次。

10. 冰浴 2 min，加入 **100 µl Buffer PFHG4** (2-8°C预冷)混合均匀。

11. 离心 2 min，溶液分为上相和油脂状下相；仔细吸取 500 µl 上相，转入干净的 1.5 ml 离心管中。

12. 加入 **500 µl 80%异丙醇**缓慢翻转离心管 20 次(出现丝状或簇状 DNA 凝集物)，再剧烈摇晃 20 次使 DNA 凝集物变得更紧密；离心 1 min，倒弃上清。

13. 加入 **750 µl 70%乙醇**，剧烈摇晃 20 次；离心 1 min，观察沉淀位置，缓慢倒弃上清。

14. 将离心管倒置在干净的吸水纸上至少 5 min，或者简短离心，仔细吸除残留的乙醇(勿吸除沉淀)。室温放置 10 min 或者 37°C放置 5 min 挥发乙醇。

▲乙醇会影响后续的酶反应，需要尽可能挥发完全；但需要避免长时间放置，完全干燥 DNA 沉淀，因为完全干燥的 DNA 很难溶解。干燥至 DNA 沉淀为半湿润状态，无酒精味，效果最佳。

15. 加入至少 **50 µl TE**，低速 Vortex 震荡 5 秒或者剧烈摇晃 10 次，65°C水浴 10-60 min 溶解 DNA，水浴 5min 后轻弹离心管底部打散 DNA 凝集物(一般继续水浴 10 min 后即可完全溶解)；或者 65°C水浴过夜。