

GB-Direct Plant PCR 试剂盒

GB-Direct Plant PCR 是一种新颖的可直接扩增不同大小植物 DNA 片段的 PCR 试剂盒，具有适用性广和稳定性强的特点，并有效地克服了传统碱裂法只能扩增小片段基因的限制性。GB-Direct Plant PCR 试剂盒由 Lysis Buffer-A、Lysis Buffer-B、2x GB-Direct Plant PCR Premix 和 GB-DNA Polymerase 所组成。植物的叶、茎、根、种子及果子干粉经过 GB-Direct 核酸裂解液处理后可直接用于 PCR 反应，无需提取其基因组 DNA。此试剂盒可用于快速植物 PCR 检测,STR 分子标记分析,大量转基因植株鉴定,及植物基因分型等。

产品信息：

| 编号 | 试剂盒组分 | 规格 |
|----------------|---------------------------------|------------|
| GB4003-200-01A | GB-Direct Plant Lysis Buffer-A | 200 x 90µl |
| GB4003-200-01B | GB-Direct Plant Lysis Buffer-B | 200 x 10µl |
| GB4003-200-02P | 2x GB-Direct Plant PCR Premix * | 200 x 25µl |
| GB4003-200-02E | GB-DNA Polymerase | 200 x 2µl |

* 2xPCR Premix 含有 dNTPs、MgCl₂ 等组分，能有效地抵抗抑制剂的干扰。

存储条件：保存于-20℃，有效期 1 年。请避免反复冻融，若计划间歇性使用建议分装后保存于-20℃。一旦解冻可存放在 4℃ 一个星期。

实验步骤：

(一) 样本的准备：

- 植物叶片：**用 75% 酒精消毒过的干净刀片把叶片剪碎，取一小片(0.5cm²，相当于 P200 枪头的底部面积)，放入 1.5mL 离心管内。请勿超过 5mg，因为过量组织会降低裂解效率。
- 植物根、茎：**用干净刀片将样本去皮、切碎，取一小粒

(1.5mm³，相当于 1 颗油菜籽的体积，请勿超过 5mg)，放入 1.5ml 离心管内。

- 种子：**新鲜种子可按照植物根茎处理方法；对干燥种子建议先将种子在水中浸泡过夜，然后切成小粒加入到离心管内；种子研磨干粉可直接使用，但请勿超过 5mg。
- 为防止样本间的交叉污染，每处理完一个样本后请用 75%酒精清洗刀片，然后用干净的纸巾擦干残液。
- 由于裂解后的 DNA 样本中除了 DNA 以外还含有许多其他杂质，建议现做现用。如需长时间保存，可保存于-20℃待用。

(二) 样本的裂解及 PCR 反应设置：

1. 样品预处理：

A 手工处理：数量不多的样本可选择用手捣碎。

方法：在含有植物样本的 1.5ml 离心管中加入 90µl Lysis Buffer-A 和 10µl Lysis Buffer-B，用 P1000 的枪头挤压样本 30 次左右以捣碎植物组织，并确保样本处于裂解液中，而非贴在管壁上。

B 自动研磨仪处理：如需同时处理大批量样本，可先将 Lysis Buffer-A 和 Lysis Buffer-B 按 9:1 的比例混合，漩涡均匀，然后将 100µl 混合后的 Lysis Buffer-AB 分别加到每个 1.5ml 离心管中。放入自动研磨仪，利用钢珠的撞击使核酸高效释放。

2. 裂解：

植物叶片：75℃水浴 20 分钟。

植物根、茎、种子：55℃水浴 15 分钟，然后 95-100℃ 5 分钟。(注：叶片样品也可使用此方法)

- 离心取上清**，上清液即可作为 PCR 反应所需的 DNA 模板。可最大速度 14,000 rpm 离心 1 分钟，以沉淀未被完全裂解的植物碎片。
- 由于不同 PCR 反应体系所需的 DNA 模板量是不一样的，而且不同植物材料所含的 DNA 量也有所差异，因此对于一个特定的 PCR 反应体系建议尝试 3 个不同剂量的 DNA 模板进行

优化实验，以确定最佳的模板用量。如在 25μl PCR 体系中可分别取 1μl、2μl、3μl 裂解后的上清液作为初步实验条件。PCR 反应的设置可根据表一进行。

表一：PCR 反应的设置：

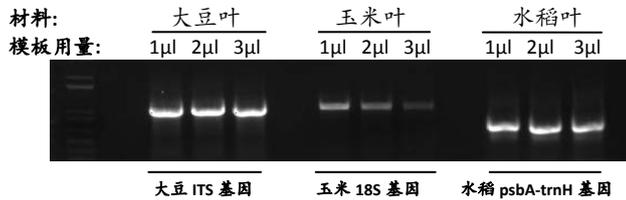
| PCR 反应成分 | 25 μl 体系 | 50 μl 体系 |
|-----------------------------|----------|----------|
| DNA 模板 (μl) | 1-3 | 2-5 |
| 2x GB-PCR Premix (μl) | 12.5 | 25 |
| GB-DNA Polymerase (μl) | 1 | 2 |
| Forward Primer (10 μM) (μl) | 0.25 | 0.5 |
| Reverse Primer (10 μM) (μl) | 0.25 | 0.5 |
| 蒸馏灭菌 ddH ₂ O | to 25 μl | to 50 μl |

5. 如 PCR 遇到问题，建议设立阳性及阴性对照反应以发现问题所在。阳性反应可用 50ng 纯化的植物 DNA 为模板，阴性反应以 ddH₂O 为模板，引物可采用以前成功扩增的引物。

表二：PCR 循环的设定 (推荐)：

| | | | | | |
|----|------|------|---------|----------|------|
| 温度 | 94°C | 94°C | 55-58°C | 72°C | 72°C |
| 时间 | 4 分钟 | 30 秒 | 45 秒 | 1 分钟/1kb | 5 分钟 |
| 循环 | 1 次 | 35 次 | | | 1 次 |

图一. 从大豆叶、玉米叶和水稻叶中扩增目的 DNA 片段 (25μl PCR 体系)



网址: www.genebankbios.com

邮箱: order@genebankbios.com

(三) 实验中的问题及解决方法：

| 问题 | 产生问题的原因 | 解决问题的方法 |
|-----------|---|--|
| 没有 PCR 产物 | DNA 模板浓度过高 | 用 2 - 5 倍体积 ddH ₂ O 稀释模板，再取 2ul (约 10% PCR 总反应体积量，25μl)为模板进行 PCR 反应。 |
| | 引物降解变质 | 重新配制低浓度引物。 |
| | 忘记 95-100°C 水浴 5 分钟 | 55°C 水浴 15 分钟，然后用微波炉把水烧开 (95-100°C)，将离心管放入烧开的水中 5 分钟。 |
| | 样本材料过多，裂解不完全 | 严格按照此说明书的要求进行取样。 |
| | 样本材料变质；或模板保存不当，基因组 DNA 降解 | 尽量采用新鲜植物组织作为实验材料；模板最好现做现用，也可保存于 -20°C 待用，但不宜反复冻融多次。 |
| | 试剂盒保存不当，试剂失效 | 若计划间歇性使用可将试剂进行分装保存于 -20°C。解冻后可以存放在 4°C 一个星期。 |
| 存在假阳性产物 | PCR 反应未达到优化状态，如： 变性时间太短； 退火温度太高； 伸展时间太短； 循环次数不够 | 设置一系列优化实验，每次实验只改变一个设定条件。如：增加变性时间，以 10 秒为一阶段；降低退火温度，以 2-4°C 为一阶段；增加伸展时间，以 15 秒为一阶段；增加 PCR 循环次数到 35。 |
| | 样本制备过程中交叉污染 | 采样前用 75% 酒精清洗刀具，然后用干净的纸巾擦干残渣 |