

## AmPure Plant DNA Kit

(快速制备从植物样品中制备 DNA 用于 PCR)

### 简介

Magen 公司的 AmPure 产品系列采用独特的溶液系统,可快速地从各种生物样品中快速制备 DNA,用于 PCR。该系统只需对样品进行简单的处理,无需抽提纯化,得到的裂解液可直接用于各种 PCR,对 Taq 酶和反应液无特别要求。AmPure Plant Kit 含制备 DNA 的溶液,适合于从各种植物叶子或组织中快速制备 DNA,用于 PCR。AmPure Plant Kit 含有快速制备 DNA 的溶液和 2 x Taq MasterMix (含溴酚蓝)。Taq MasterMix 含有甘油和溴酚蓝,可直接上样。

### 组成

#### ● AmPure Plant DNA Kit

产品成分	D7107-01	D7107-02	D7107-03
制备次数	100 次	500 次	1000 次
DLB Buffer	11ml	60ml	110ml
Proteinase K	5.5mg	26mg	2 x 26mg
Protease	1.8ml	3ml	6ml
Dissolve Buffer	1.8ml	3ml	6ml
IRB Buffer	11 ml	60ml	110ml

#### ● AmPure Plant DNA Plus Kit

产品成分	D7108-01	D7108-02	D7108-03
制备次数	100 次	500 次	1000 次
DLB Buffer	11ml	60ml	110ml
Proteinase K	5.5mg	26mg	2 x 26mg
Protease	1.8ml	3ml	6ml
Dissolve Buffer	1.8ml	3ml	6ml
IRB Buffer	11 ml	60ml	110ml
Taq Master Mix	2ml	8ml	14ml
dH2O	15ml	40ml	100ml

### 保存条件

试剂盒可保存 2-8°C。长期保存时,建议把 Proteinase K 干粉保存于 -20°C。Taq MasterMix 建议分装保存于 -20°C。Proteinase K 溶解后,分装保存于 -20°C。反复冻融 Proteinase K 和 Taq MasterMix 会影响实验结果。

### 准备条件

- 灭菌的离心管
- 70%乙醇
- (可选)一次性的 1.5ml 研磨杵
- 灭菌的剪刀和镊子
- 95°C 水浴锅
- 55°C 水浴锅
- 加入适量 Protease Dissolve Buffer 至 Proteinase K 干粉,使其终浓度为 10mg/ml。轻轻振荡溶解,分装保存于 -20°C

### Section A: DNA 制备及 PCR 步骤

第一次使用本试剂盒时,请仔细查看 DLB Buffer 中是否有结晶析出,若出现结晶,请将 DLB Buffer 于室温放置让结晶完全溶解,或 37°C 水浴重新溶解。

1. 若处理多个样品时,用 70%乙醇清洗打孔器、剪刀和镊子。
2. 用打孔器从植物叶片中打出直径为 0.5-0.7cm 圆片样品,并转移至 1.5ml 离心管中。(也可用于剪刀剪出 0.4-0.6cm 正方形的叶片)
3. 加入 **100µl DLB Buffer 和 5µl Proteinase K (10mg/ml)**,涡旋混匀;确保所有叶片都浸泡到溶液中。若需提取产量,可加入一颗不锈钢珠至样品中,涡旋 1 分钟,以提高植物样品的裂解效果。
4. 65°C 水浴 10~30 分钟。
5. 95°C 水浴 10 分钟。
3. 加入 **100µl IRB Buffer 至裂解液中**,涡旋混匀。
4. 把样品保存于 **-20°C 或取 1~4µl 粗提液用于 PCR**。若样品需要长期保存,建议把样品于 10,000 x g 离心 2 分钟,转称上清液新的离心管中,然后把样品保存于 -20°C。

## Section B: PCR 扩增

(AmPure Plant Plus Kit, 含 Taq MasterMix)

1. 按下表在冰上配制 PCR 反应液:

试剂	体积
灭菌水	~ $\mu\text{l}$
2 x Taq MasterMix	12.5 $\mu\text{l}$
上游引物	~ $\mu\text{l}$
下游引物	~ $\mu\text{l}$
DNA 抽提液	1-4 $\mu\text{l}$
总体积	25 $\mu\text{l}$

2. 混匀;

3. 按下表设定 PCR 仪的程序;

步骤	温度	时间	循环数
初始变性	94°C	3 分钟	1
变性	94°C	0.5-1 分钟	30-35
退火	45-68°C	0.5-1 分钟	循环
延伸	72°C	1-2 分钟	
最后延伸	72°C	10 分钟	1
保存	4°C	For ever	

4. 当 PCR 预热上 94°C 时, 暂停 PCR 仪, 把样品放入 PCR 仪中, 立即进行扩增。

5. 反应结束后, 取 3-5 $\mu\text{l}$  PCR 产物上样于 1.5-2% 琼脂糖凝胶上电泳分析结果。

## C. 常见问题回答

### ● 扩增条带很弱或没有?

1. 样品中含有大量的抑制因子: 用 1:1 DLB Buffer/IRB Buffer 稀释 DNA。若需验证是否有抑制因子, 在 DNA 粗制液中加入 100-500 个拷贝的已知的基因模块, 再进行 PCR。
2. 裂解不够: 使用研磨杵对样品进行匀浆, 延长 55°C 的水浴时间;
3. PCR 参数设计不够合理; 改变退火温度, 延伸时间, 延长循环数等;

### ● 组织样品没有被消化?

该方法并不要求消化所有的样品。但若需要提高 DNA 的产量, 可对样品进行匀浆和延长 55°C 的水浴时间来提高消化效果, 提高 DNA 的得率。

### ● 扩增条带不特异?

1. 采用热启动 Taq 酶, 以提高特异性;
2. 若使用 Taq MasterMix, 必须在冰上配制反应液, 并待 PCR 仪升温至 94°C 后, 再把 PCR 反应液转移至 PCR 仪中, 以减少非特异性的扩增。
3. 用 Touchdown PCR 技术, 减少非特异性的扩增。