

# 植物组织直接PCR试剂盒

使用说明书 (Ver.0.0.1)

## 产品特点

- ◇ 简单快速：适用于从不同类型植物叶片等组织中一步法基因鉴定。
- ◇ 高特异性：本产品所用 Taq 酶为抗体修饰热启动酶，具有高模板和引物亲和性及扩增特异性，特别适合基因分型和转基因鉴定。
- ◇ 基因检测：本产品操作简便，结果可靠，可用于转基因植株鉴定、植物基因分型等。

产品货号：

JSR-ED-301-50 (50 次反应) JSR-ED-301-200 (200 次反应)



扫描二维码了解更多产品信息

# 目录 Contents

产品组份	1
储存条件	1
产品简介	1
操作步骤	1
注意事项	3

## 产品组份

试剂盒组成	20 $\mu$ l $\times$ 50 次	20 $\mu$ l $\times$ 200 次	储存条件
Buffer P1	1.25 mL $\times$ 2	5mL $\times$ 2	2~8 $^{\circ}$ C
Buffer P2	500 $\mu$ L	1mL $\times$ 2	2~8 $^{\circ}$ C
2 $\times$ Plant Master Mix	500 $\mu$ L	1mL $\times$ 2	-25~-15 $^{\circ}$ C
无 DNase/RNase 水	1mL	1mL $\times$ 2	2~8 $^{\circ}$ C

\*2 $\times$  Plant Master Mix: 包含热启动 Taq DNA 聚合酶、dNTP 混合物、MgCl<sub>2</sub>、反应缓冲液、PCR 反应增强剂、优化剂以及稳定剂等，同时包含电泳 Loading Buffer，PCR 完成之后可直接电泳。

## 储存条件

1. Buffer P1 置于 2-8 $^{\circ}$ C 保存。有效期 1 年。
2. Buffer P2 置于 2-8 $^{\circ}$ C 保存。有效期 1 年。
3. 2  $\times$  Plant Master Mix -25~-15 $^{\circ}$ C 保存，避免反复冻融。有效期 1 年。
4. 无 DNase/RNase 水置于 2-8 $^{\circ}$ C 保存。有效期 1 年。

试剂盒有效期 1 年。

## 产品简介

本试剂盒是一款可直接对不同类型植物叶片进行 PCR 扩增的试剂盒，适应性广、稳定性强。试剂盒采用独特的裂解缓冲液体系，可以快速的裂解多种植物样品并释放出基因组 DNA，不需要除去蛋白、RNA 或次生代谢产物等，即可将释放出的基因组 DNA 作为模板直接用于 PCR 反应。此外，样品使用量少，低至 1mm 植物叶片即可进行实验。

本试剂盒中提供的 2 $\times$  Plant Master Mix 具有很强的扩增兼容性，能直接以待测样品裂解液为模板，进行高效特异性扩增。该试剂为 2 倍浓缩 PCR 反应混合液，包含了用于 PCR 扩增除模板和引物外的所有组分，大大简化操作过程，降低污染几率。且含有示踪染料，PCR 产物可直接电泳。该试剂盒可用于转基因植株鉴定、植物基因分型等。

## 操作步骤

1. 植物叶片
  - 1) 研磨裂解法:
    - a. 研磨仪破碎: 将直径 5mm 左右的叶片置于 50  $\mu$ L Buffer P1 中，用研磨仪加钢珠（钢珠直径 3mm 左右，共 2 个）破碎叶片（45Hz，1min），叶片破碎后溶液呈现绿色，瞬时离心，将上清液置于 4 $^{\circ}$ C 备用，取 1  $\mu$ L 用于 PCR 扩增。

- b. 枪头捣碎：推荐使用幼嫩叶片。将直径 5mm 左右的叶片置于 50  $\mu$ L BufferP1 中，用枪头将叶片捣碎，捣碎后溶液呈现绿色，瞬时离心，将上清液置于 4 $^{\circ}$ C 备用，取 1  $\mu$ L 用于 PCR 扩增。
- 2) 加热裂解法：推荐使用幼嫩叶片。将直径 5mm 左右的叶片置于 50  $\mu$ L BufferP1 中，95 $^{\circ}$ C 加热 5-10min (确保裂解液完全浸没叶片)，较难裂解的叶片 (老叶片) 可适当延长时间 (10-20min)，加热裂解后溶液呈现绿色，振荡混匀，瞬时离心，将上清液置于 4 $^{\circ}$ C 备用，取 1  $\mu$ L 用于 PCR 扩增。
- 3) 直接法：推荐使用幼嫩叶片。使用打孔器或者刀，将直径 1mm 左右的叶片直接加入到 PCR 反应体系中；复杂样本或者是长片段的扩增，推荐使用直径 < 1mm 的叶片。
2. PCR 反应体系

组分	体积 ( $\mu$ L)	体积 ( $\mu$ L)	终浓度
2 $\times$ Plant Master Mix	10	25	1 $\times$
Forward Primer (10 $\mu$ M)	0.5	1	0.2~0.25 $\mu$ M
Reverse Primer (10 $\mu$ M)	0.5	1	0.2~0.25 $\mu$ M
裂解产物 (DNA 模板)	1	2	-
无 DNase/RNase 水	To 20	To 50	-

\*各组分使用前应充分混匀。

- 1) 模板加入量：小于 PCR 反应体系的 5%，过多会严重抑制 PCR 反应，强烈推荐加入 1  $\mu$ L 模板。叶片直扩优先推荐研磨仪裂解法。
  - 2) 引物终浓度：0.2-0.25  $\mu$ M 可以得到较好结果。若 PCR 反应效果不佳时，可在 0.1-0.5  $\mu$ M 范围内调整引物浓度。
  - 3) 反应体系：推荐使用 20  $\mu$ L 或 50  $\mu$ L，以保证目的基因扩增的有效性和重复性。
  - 4) 体系配制：配制好 PCR 反应体系，置于涡旋仪上涡旋混匀，瞬时离心将反应液集于管底。
  - 5) 对照反应：建议进行 PCR 时，设置阳性和阴性 PCR 对照反应以便于排除假阳性或假阴性的干扰。
  - 6) 为了更稳定地保存裂解后的模板，将转移出来的上清液，按照裂解产物 (DNA 模板) : BufferP2=5:1 的比例混合，混匀后 -20 $^{\circ}$ C 保存，其稳定保存的时长会因时间和样本状态的不同而有所差异。如果处理后的植物叶片上清液一周内用于 PCR 扩增，不用加 Buffer P2，上清液应置于 -20 $^{\circ}$ C 保存。
3. 反应条件：

循环步骤	温度	时间	循环数
预变性	94 $^{\circ}$ C	5 min	1
变性	94 $^{\circ}$ C	10 sec	35
退火*	50~65 $^{\circ}$ C	20 sec	
延伸**	72 $^{\circ}$ C	1 min/kb	
终延伸	72 $^{\circ}$ C	5 min	1

\*退火温度：请参考引物的理论  $T_m$  值，退火温度可设置低于引物理论值 2-5°C。

\*\*延伸时间：需要根据片段的长度来确定，对于 1kb 以内的 DNA 片段，建议延伸时间为 1min。

4. 结果检测：反应结束后取 10  $\mu\text{l}$  反应产物，进行琼脂糖凝胶电泳检测。

## 注意事项

- ◇ 做叶片实验时，建议使用新鲜采集的叶片组织，若为长期冷冻组织，需-80°C保存，应尽量避免反复冻融，以免造成模板降解，影响 PCR 效率。叶片组织以幼嫩为宜，若为成熟的叶片，避免使用叶片主脉部位组织。
- ◇ 建议扩增片段长度 1kb 以内，以便扩增效率最佳。
- ◇ 取样时使用打孔器或者刀取适宜大小的样本，样本不同时，打孔器或者刀每次处理样本前需清洗干净。
- ◇ 对于叶片组织，建议取 1-10mm 的叶片，过小会使 PCR 扩增产量低，过多会抑制 PCR 反应，采用加热裂解法、枪头捣碎、研磨仪破碎的方式处理植物叶片，处理后需振荡离心，务必取上清液试验，沉淀会严重抑制 PCR 反应。
- ◇ 本产品自售出之日起提供一年质量保证。所有试剂均通过严格质量检测，确保性能稳定可靠。
- ◇ 本产品仅供专业研究人员在受控环境下使用。操作人员须佩戴防护手套及护目装置等个人防护装备，并严格遵守所在机构的安全操作规程。请注意，部分试剂可能具有刺激性，使用时需特别谨慎。
- ◇ 避免试剂长时间暴露于空气中，以防挥发、氧化或 pH 值变化，使用后请立即盖紧瓶盖，并按照说明书要求妥善储存。