

Plant Tissue Direct PCR Kit (With Dye)

植物组织直接 PCR 试剂盒

产品简介

Plant Tissue Direct PCR Kit (With Dye)植物组织直接 PCR 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 1 mm 植物叶片即可进行实验。

本试剂盒中提供的 2× 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。

产品信息

| | |
|----|-----------------------------------|
| 货号 | 10187ES05 / 10187ES50 / 10187ES70 |
| 规格 | 5 T / 50 T / 200 T |

组分信息

| 组分编号 | 组分名称 | 10187ES05 | 10187ES50 | 10187ES70 | 储存条件 |
|---------|------------------------------|-------------|--------------------|-----------------|-----------|
| 10187-A | Buffer P1 | 250 μ L | 1.25 mL \times 2 | 5 mL \times 2 | 2-8°C |
| 10187-B | Buffer P2 | 50 μ L | 500 μ L | 1 mL \times 2 | 2-8°C |
| 10187-C | 2 \times Plant Master Mix* | 50 μ L | 500 μ L | 1 mL \times 2 | -25~-15°C |

*2× Plant Master Mix：包含热启动 Taq DNA 聚合酶、dNTP 混合物、MgCl₂、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

- 试剂 10187-A【Buffer P1】，置于 2-8°C 保存。有效期 1 年。
- 试剂 10187-B【Buffer P2】，中和裂解产物，利于更长时间保存样本，置于 2-8°C 保存。有效期 1 年。
- 试剂 10187-C【2 \times Plant Master Mix】，-25~-15°C 保存，避免反复冻融。有效期 1 年。

试剂盒有效期 1 年。

使用说明

1. 植物叶片

1) 研磨裂解法：

- 研磨仪破碎：将直径 5 mm 左右的叶片置于 50 μ L Buffer P1 中，用研磨仪加钢珠（钢珠直径 3 mm 左右，共 2 个）破碎叶片（45 Hz，1 min），叶片破碎后溶液呈现绿色，瞬时离心，上清液请放在 4°C 备用，取 1 μ L 用于 PCR 扩增。
- 枪头捣碎：推荐使用幼嫩叶片。将直径 5 mm 左右的叶片置于 50 μ L Buffer P1 中，用枪头将叶片捣碎，捣碎后溶液呈现绿色，瞬时离心，上清液请放在 4°C 备用，取 1 μ L 用于 PCR 扩增。

2) 加热裂解法: 推荐使用幼嫩叶片。将直径 5 mm 左右的叶片置于 50 μL Buffer P1 中, 95°C加热 5-10 min (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 (10-20 min), 加热裂解后溶液呈现绿色, 震荡混匀, 瞬时离心, 上清液请放在 4°C备用, 取 1 μL 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 1 mm 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<1 mm 的叶片。

2. PCR 反应体系

| 组分 | 体积 (μL) | 体积 (μL) | 终浓度 |
|------------------------------------|----------------------|----------------------|------------------------|
| 2 \times Plant Master Mix | 10 | 25 | 1 \times |
| Forward Primer (10 μM) | 0.5 | 1 | 0.2-0.25 μM |
| Reverse Primer (10 μM) | 0.5 | 1 | 0.2-0.25 μM |
| 裂解产物 (DNA 模板) | 1 | 2 | - |
| ddH ₂ O | To 20 | To 50 | - |

表 1 反应体系

*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 μL 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 μM 可以得到较好结果。反应性能较差时, 可在 0.1-0.5 μM 范围内调整引物浓度。

3) 反应体系: 推荐使用 20 μL 或 50 μL , 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) 为了更稳定的保存裂解后的模板, 将转移出来的上清液, 按照**裂解产物 (DNA 模板) : Buffer P2 = 5:1**的比例混合, 混匀后-20°C保存, 稳定保存随时间和样本状态不同而有所不同。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, 上清液请保存在-20°C。

3. 反应条件

| 循环步骤 | 温度 (°C) | 时间 | 循环数 |
|------|---------|----------|-----|
| 预变性 | 94 | 5 min | 1 |
| 变性 | 94 | 10 sec | 35 |
| 退火* | 50-65 | 20 sec | |
| 延伸** | 72 | 1 min/kb | |
| 终延伸 | 72 | 5 min | 1 |

表 2 反应条件

*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 1 kb 以内的 DNA 片段, 建议延长时间为 1 min。

注意事项

1. 做叶片实验时, 建议使用新鲜采取的叶片组织, 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。

2. 建议扩增片段长度 1 kb 以内, 以便扩增效率最佳。

3. 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。

4. 对于叶片组织，建议取 1-10 mm 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，处理后需震荡离心，务必取上清液试验，沉淀会严重抑制 PCR 反应。
5. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。
6. 本产品仅作科研用途！

常见问题与解决方法

| 常见问题 | 可能原因 | 解决方法 |
|------------------------|-------------------------------------|---|
| 阳性对照、待测样本均无条带。 | PCR 反应体系或反应条件不合适。 | 使用梯度 PCR 摸索 PCR 最佳反应条件。 |
| | PCR 试剂保存不当失去活性。 | 2×PCR Mix 应保存于-25~-15℃，使用时避免反复冻融。若使用频繁，可在 2-8℃短时间存放。 |
| | 引物设计问题。 | 尝试重新设计引物进行检查。 |
| 阳性对照有目的条带，待测样本无条带或条带弱。 | 不当储存或长期储存引起试剂活性丧失。 | 使用新鲜的试剂。 |
| | 裂解液、中和液加入比例不当，裂解混合液影响 PCR 体系的 pH 值。 | 正常条件下，中和后的裂解混合液的 pH 应该在 7-8 左右（裂解产物和 Buffer P2 严格按照 5:1 的量进行中和）。 |
| | 样本裂解混合液保存不当或保存时间过久，DNA 基因组已经降解。 | 裂解混合液可在 2-8℃保存 5 天，尽量使用新制备的裂解液混合液进行 PCR。 |
| | 模板加入量不适合。 | 在反应体系 <5% 范围内优化模板加入量。 |
| | PCR 循环数不足。 | 适当增加 PCR 的循环数，推荐在 35-40 循环为佳。因为模板复杂，一般 PCR 反应要比用纯化的 DNA 模板多 5-10 个循环为佳。 |
| 非特异性扩增 | PCR 退火温度太低，循环数、引物浓度或模板浓度太高。 | 提高 PCR 退火温度，降低 PCR 循环数、引物浓度或模板浓度。 |
| | PCR 引物错配。 | 重新设计 PCR 引物。 |
| | 配制 PCR 反应体系时温度太高或配制完成后放置时间太久。 | PCR 反应体系的配制在低温下进行，配制完成后尽快进行 PCR 扩增反应。 |
| 阴性对照出现目的条带 | 操作工具或试剂污染。 | 实验所有试剂或器材均应高压灭菌。操作时应小心轻柔，防止将靶序列吸入加样枪内或溅出离心管外。 |
| | 样本间交叉污染。 | 每个取样器只对一个样本使用；或取完一个样本后，将取样器刀口浸入 2% 的次氯酸钠溶液中，反复涮洗，然后用干净的纸巾擦干残液。 |