

Plant Tissue Direct PCR Kit (With Dye) 植物直扩 PCR 试剂盒（含染料）

产品简介

本品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 PCR 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。

产品规格

产品货号	N132023E	N132023S
产品规格	50 T	200 T

组分信息

组分编号	组分名称	N132023E (50 T)	N132023S (200 T)	储存条件
N132023-A	Buffer P1	1.25 mL×2	5 mL×2	2-8℃
N132023-B	Buffer P2	500 μL	1 mL×2	2-8℃
N132023-C	2 × Plant PCR Master Mix*	500 μL	1 mL×2	-25~-15℃

【注】：*2× Plant PCR 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。

产品储存

1. 试剂 N132023-A【Buffer P1】，置于 2-8℃保存。有效期 1 年。
2. 试剂 N132023-B【Buffer P2】，中和裂解产物，利于更长时间保存样本，置于 2-8℃保存。有效期 1 年。
3. 试剂 N132023-C【2×Plant PCR Master Mix】，-25~-15℃保存，避免反复冻融。有效期 1 年。
4. 试剂盒有效期 1 年。

操作注意

- 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℃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！

操作说明

1. 植物叶片

- 1) 研磨裂解法：
 - a. 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℃备用，取 1 μ L 用于 PCR 扩增。
 - b. 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℃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 μ L Buffer P1 中，95℃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℃备用，取 1 μ 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 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

表 1. PCR 反应体系

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

【注】：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 μ 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 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。

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. PCR 反应条件

表 2 PCR 反应程序

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

【注】:

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。

2) **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。

常见问题与解决方案

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°C, 使用时避免反复冻融。若使用频繁, 可在 2-8°C 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长, DNA 基因组已经降解。	裂解混合液可在 2-8°C 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，将取样器刃口浸入 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。