

EchoLUTION植物DNA试剂盒说明书

用于植物组织基因组DNA的一步纯化样本方案,适用于新鲜、冷冻干燥和干燥的植物组织,如叶、花、果实、根、面粉和种子样本。

所需材料和设备

- 每个样本**10-50 mg**植物组织;一般建议用30 mg(某些情况下不同植物种类,可能需要优化投入量)干样品类型(例如:冷冻干燥,面粉,种子):推荐10mg
- 取决于机械破坏的首选方法
组织研磨杵(BioEcho产品编号050-004-100)
研磨钢珠(BioEcho产品编号050-006-200)
通过珠子研磨法替代样品破碎:几种方案是可行的。植物组织(冷冻、冻干、新鲜)可在干燥或植物裂解缓冲液中进行珠子研磨。用于珠子研磨的材料不要添加研磨悬浮液!如果泡沫已经形成在珠子研磨过程中,研磨后以全速离心3分钟。完全破碎的珠子研磨条件最好设定为30 Hz的3 min以上的实验条件。
- 带转子的微型离心机,用于**1.5和2ml**反应管
重要事项:将离心机切换到相对离心力 r_{cf} ($x g^*$);如果不可能,请使用以下公式*用于计算每分钟转数(rpm)到循环频率的转换
- 恒温混匀仪(性能最快)
能够加热至60°C和80摄氏度。或者:加热块或加热室。
- 涡旋震荡器
 - 10ul和200ul刻度的移液枪,相应的移液枪枪头
 - 每个样品备一个反应管(1.5 ml),用于裂解步骤(最好带安全帽)
 - 每个样品备一个反应管(1.5 ml),用于洗脱和收集纯化DNA
 - 每个样品备一个反应管(2 ml),用于柱制备
 - 组织分割刀。BioEcho产品编号050-002-001
 - 对于最快程序(方案1):穿帽器(BioEcho产品编号050-001-001)

启动前的准备

- 将恒温混匀仪、热块或热室加热至60°C
- 将微量离心机设置为1000 $x g^*$
- 重要事项:切换至相对离心力, r_{cf} ($x g^*$, 而不是rpm)

操作流程1: 需用穿帽器的纯化

裂解(包括使用研磨杵进行机械破碎)



1. 转移植物样品(推荐**30 mg**)和**100ul**植物裂解缓冲液(LB)到**1.5ml**反应管(最好带安全帽)
注:如果样品类型为强吸收液体(例如冻干材料,某些种子),添加的裂解缓冲液量需要增加到200ul。
2. 通过短时涡旋重悬研磨悬浮液(GS),并向每个含有植物组织的反应管中添加10ul研磨悬浮液。
3. 向每个植物样品中添加2ulRNA酶A(R)。

磁珠法替代样品破碎:几种方案是可行的。植物组织(冷冻的、冻干的、新鲜的)可以被打碎或放入植物裂解缓冲液中(LB)。不要添加磁珠(GS)如果在实验过程中产生泡沫,全速离心3分钟。完全破碎的珠粒打浆条件需要通过实验确定,30Hz下3分钟是一个良好的起点。

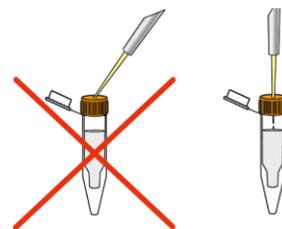
4. 用研磨杵使植物组织均质,直至完全破碎。
5. 向每个样品中添加**5ul TurboLyse P**蛋白酶(P)
6. 将反应管置于恒温混匀仪,并在60°C下孵育**30分钟**,以最大振荡速度振荡。(如果只有温度没有振荡,则孵育60分钟,在这种没有振荡情况下,孵育过程中脉冲涡旋振荡3次)。同时,在裂解过程中,继续进行步骤8“柱制备”。
7. 在60°C下培养后,将温度升高至80°C并培养额外时间最大振荡时间为10分钟。

色谱柱制备(在执行步骤6和7期间同步完成)

8. 短暂涡旋EchoLUTION色谱柱,并将其放入**2ml**反应管中,静置**10-20分钟**。
9. 使用盖帽打孔器(扫描二维码观看视频):在立柱管帽上打孔,并将色谱柱连同盖帽打孔器一起从**2 ml**反应管中取出。掰断色谱柱的底部封盖,并在拔出的同时按顺时针方向扭转,以分离盖帽打孔器。将穿孔的色谱柱放回**2ml**反应管中。
10. 以**1000 x g***离心1分钟,丢弃收集于**2ml**反应管中的液体。
11. 将制备好的EchoLUTION色谱柱放入一个新的**1.5 ml**反应管中,进行分离洗脱纯化的并放回支架。继续“DNA纯化”。

DNA的纯化

12. 执行步骤7后,向每个样品中添加**25ul**洗涤液P(CS)。漩涡震荡3秒。样品会变得混浊。
13. 全速离心**2分钟**。
14. 将裂解上清液(最大**100ul**)转移到制备的EchoLUTION色谱柱上。步骤11中的色谱柱,如图所示:



将移液枪枪头尖端通过开孔的管盖上垂直插入纯化管内并缓慢地(5秒)把样品加到色谱柱中。

Note:

- 在加载裂解液上清液期间,不要用枪头尖端接触色谱柱树脂层!
 - 可多次加载剩余上清液,且不会干扰纯化。
15. 以**1000 x g***离心1分钟。纯化的基因组DNA洗脱到**1.5 ml**洗脱液中可立即应用于下游应用中。洗脱的DNA可立即使用,或在4°C下储存,或在4°C下长期储存-20摄氏度。对于分光光度分析,使用试剂盒随附的**1x Tris**缓冲液(T)(如适用)作为空白对照。

操作流程2: 无需穿帽器的纯化

裂解

1. 执行方案1中的步骤1-7。

色谱柱制备 (在执行步骤6和7期间同步完成)

8. 短暂旋涡EchoLUTION色谱柱, 并将其放入2ml反应管中, 让其静置10-20分钟 (建议在裂解时同步进行)。

9. 将色谱柱的螺帽拧松半圈, 然后掰下底部封盖。

注意事项: 拧松螺帽并掰下底部封盖后, 不要重新拧紧色谱柱上的螺帽。螺帽必须保持松开半圈状态不动以避免产生真空。将该色谱柱放回原来的2 ml反应管, 并将含有色谱柱的反应管放入离心机。

10. 以1000 x g*离心1分钟, 丢弃收集于2ml反应管中的离心下来的液体。

11. 将制备好的色谱柱放入一个新的1.5 ml反应管中, 用于洗脱溶液采集DNA样本并放回支架中。继续“DNA纯化”。

DNA的纯化

12. 执行步骤7后, 向每个样品中添加25µl洗脱溶液P (CS) 漩涡3秒。样品会变得混浊。

13. 全速离心2分钟。

14. 将含有DNA的裂解液上清液 (最大100µl) 转移到步骤11制备的EchoLUTION色谱柱



打开色谱柱管盖, 用移液枪缓慢 (5秒) 将上清液加到准备好的色谱柱的树脂层中心上方。加完样后, 关闭螺帽并再次拧松半圈。

重要事项: 不要重新拧紧色谱柱螺帽柱。

Note:

- 在加载裂解液上清液期间, 不要用移液枪枪头尖端接触树脂层!
- 可多次加载剩余上清液, 且不会干扰纯化

15. 以1000 x g*离心1分钟。纯化的基因组DNA洗脱到1.5 ml洗脱管中, 可立即应用于下游应用。

产品使用限制

EchoLUTION Plant DNA试剂盒仅供研究使用。它未经注册或授权用于诊断、预防或治疗疾病。

注意事项: 将离心机切换到相对离心力rcf (xg); 如果不是这样的话

请尽可能使用下面的公式*来计算每分钟转速, (rpm) 转换成rcf

*大多数离心机提供rpm和g-force (rcf) 之间的选择; 如果不是, 则计算与重力匹配的转速使用以下公式: $rpm = 1,000 \times r$, r=转子半径, 单位为mm。g为所需的g力。例如: 半径为150 mm时, 1000 xg的相应转速约为2400 rpm。

用于植物组织基因组DNA的一步纯化

产品编号 (rxn)	010-003-010 (10)	010-003-050 (50)	010-003-250 (250)
------------	------------------	------------------	-------------------

试剂盒内容物	植物裂解缓冲液、涡轮裂解酶P蛋白酶、植物核糖核酸酶A、研磨悬浮液、洗涤液P、1x Tris缓冲液、色谱柱		
--------	--	--	--

相关产品	钢珠050-006-200 陶瓷刀片手术刀050-002-001 组织研磨杵050-004-100 盖打孔机050-001-001		
------	--	--	--

快速操作流程 (请先阅读扩展方案)

裂解

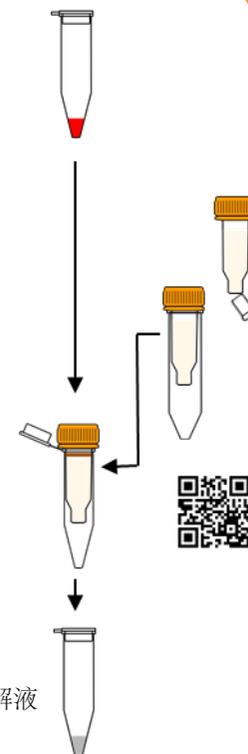
- 将30 mg植物组织转移到反应管中
- 加100ul (LB)
- 涡旋重悬 (GS) 并加10µl
- 加 2 µl (R)
- 用杵研磨组织(如组织已经粉碎可以不研磨)
- 添加5 µl (P), 快速涡旋
- 孵育30分钟/60°C, 同时最大速度振荡, 然后孵育10分钟/80°C, 同时最大速度振荡 (振荡速度推荐1200以上)
- 添加25µl (CL) 然后快速涡旋
- 以最大速度离心2分钟

色谱柱制备 (在60°C和80°C孵育期间同步进行)

- 旋涡EchoLUTION色谱柱, 置于2ml试管中。静置10分钟
- 使用盖打孔机在盖上打孔, 然后掰断底部封闭端
- 将色谱柱放回2ml试管中
- 以1000 x g*离心1分钟, 以洗脱柱缓冲液
- 将色谱柱置于1.5 ml试管中

DNA的纯化

- 穿过盖孔 (扫描二维码观看视频), 用移液枪慢慢转移裂解液上清液 (最大100µl) 至色谱柱中
- 以1000 x g*离心1分钟, 将DNA洗脱到洗脱管中
- 洗脱DNA即可使用



2019/07/29



北京中生柏奥生物科技有限公司

BioEcho Life Sciences GmbH

手机: 18610438010/18911671291

电话: 400-188-6323

网站: www.bioecho.cn

