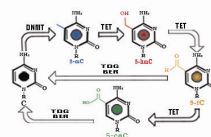




艾德科技（北京）有限公司
A&D Technology Corporation

A&D, Lab Good Partners !



地址：北京市昌平区中关村生命科学园路东60米
电话：010-52406250/57225208
技术电话：18911529660 技术QQ：1951545998

网址：www.aderr.com E-MAIL:tech@aderr.com

Plant Direct PCR Kit

TP-0211T	50Preps
TP-02110	200Preps
TP-02111	500Preps
TP-02112	1000Preps
TP-02113	2000Preps



目 录

产品介绍	3
产品特点	3
试剂盒应用	3
试剂盒内容	4
试剂盒组分信息	4
储存条件	4
产品质量控制	5
注意事项	5
试剂盒应用实例	5
操作前准备事项	5
操作指南	7
直接法	7
裂解法	8
PCR 引物设计原则	10
对照反应	10
阳性对照	10
阴性对照	11
操作示意图	12
问题分析指南	13

产品介绍

本产品可以直接使用微量植物叶片（如：水稻、小麦、烟草、玉米、大豆、油菜等）进行 PCR 反应，也可采用独特的裂解缓冲液体系快速的从植物叶片样本中，释放出基因组 DNA，用于 PCR 反应，因此特别适合大规模基因检测。

裂解缓冲液释放基因组 DNA 过程可以在 15-20 min 内完成，不需要其他去蛋白、RNA 或者次生代谢产物的过程，即可将释放出的微量 DNA 作为模板进行 PCR 反应。

2xPlant PCR Easy Mix 具有很强的 PCR 反应抑制物耐受性，能直接以植物叶片或待测样本的裂解液为模板，进行高效特异性扩增。该试剂包含 Foregene Taq DNA 聚合酶、dNTPs、MgCl₂、反应缓冲液、PCR 反应增强剂、优化剂和稳定剂。与直接裂解液配合使用能够快速简便地对样品进行检测，并具有灵敏度高、特异性强、稳定性好等特点。

产品特点

- ◆ 无需进行费时而昂贵的 DNA 纯化。
- ◆ 样品需求量小，只需取直径 2-7mm 左右的植物叶片即可。
- ◆ 操作简便。
- ◆ 优化的 PCR 体系，使 PCR 具有更高的特异性、更强的 PCR 反应抑制物耐受性。

试剂盒应用

- ◆ 样本裂解释放的 DNA：仅用作 PCR 模板。
- ◆ 试剂盒可用于以下用途：转基因植株鉴定、植物基因分型等。

试剂盒内容

Plant Direct PCR Kit

植物直接 PCR 试剂盒

试剂盒组成	TP-0211T	TP-02110	TP-02111	TP-02112	TP-02113
	50 次	200 次	500 次	1000 次	2000 次
Buffer P1	3ml	12ml	30ml	60ml	110ml
Buffer P2	3ml	12ml	30ml	60ml	110ml
2x Plant PCR Easy Mix	550µl	2.2ml	5.2ml	11ml	22ml
说明书	1 份	1 份	1 份	1 份	1 份

试剂盒组分信息

- Buffer P1: 提供植物组织裂解反应所需的环境。
- Buffer P2: 中和 Buffer P1, 使裂解混合物不影响 PCR 反应体系。
- 2x Plant PCR Easy Mix: 包括福际生物特别改造的热启动 Taq DNA Polymerase、dNTPs、MgCl₂、Taq Reaction Buffer、PCR 反应增强剂、优化剂以及稳定剂等。PCR 反应时, 只需将适当的植物组织或其裂解液、引物、ddH₂O 添加到 2x Plant PCR Easy Mix 中即可用于 PCR 反应。

储存条件

A: 试剂盒内容保存

- 本试剂盒的 2xPlant PCR Easy Mix 保存在 -20℃; 若频繁使用, 也可置于 4℃ 短期保存 (限 10 天内用完)。
- 本试剂盒其余组分在常温 (15–25℃) 干燥条件下, 可保存 12 个月; 如需保存更长时间可置于 2–8℃。(注意: 若低温保存, 溶液容易产生沉淀。在使用前务必将试剂盒内的溶液在室温中放置一段时间, 必要时可在 37℃ 水浴中预热 10 分钟, 以溶解沉淀, 混匀后再使用)。

B: 样本裂解混合物保存(裂解法)

- 立即作为模板进行 PCR 反应。
- 由于裂解液释放出来的 DNA 不纯, 不适合长期储存, 建议现做现用。测试显示, 裂解液在 4℃ 存放 2-3 天后, 仍然能够扩增出目的条带。

产品质量控制

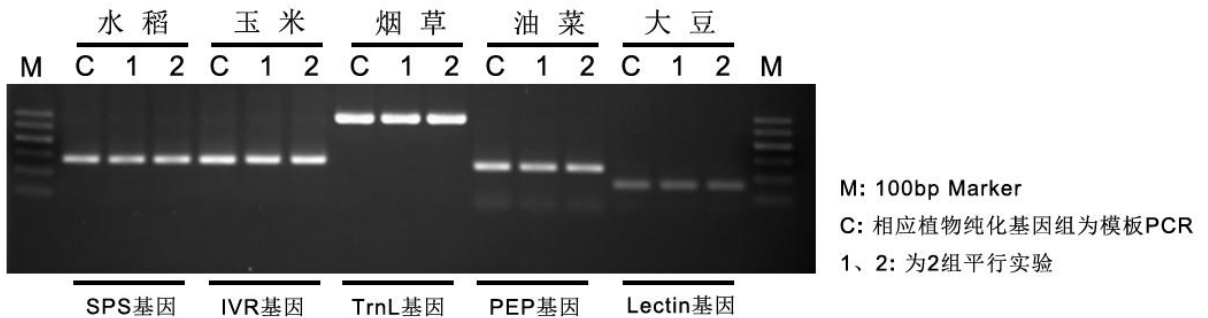
按照福际生物试剂盒质量检测体系标准，每一批次的产品都严格进行多次测试，确保每一批次试剂盒质量的可靠性和稳定性。

注意事项：(请务必在使用试剂盒前仔细阅读注意事项)

- ◆ 样品应避免反复冻融，否则会导致作为 PCR 模板的 DNA 片段较小，影响 PCR 效率。
- ◆ 若 Buffer P1 有沉淀析出，可放置于 37℃ 待沉淀消失，并摇匀溶液后使用。
- ◆ 2xPlant PCR Easy Mix 应避免反复冻融，否则会影响 PCR 效率。
- ◆ 如果环境温度过高，2xPlant PCR Easy Mix 可能会变浑浊，可置于冰上放置 1-2min，待溶液澄清，上下颠倒混匀 3-5 次后再使用。

直接 PCR 实例电泳图

Plant Direct PCR Kit 可以处理多种植物叶片，提供的 PCR Mix 有很强的 PCR 反应抑制物耐受性，检测灵敏度高、扩增特异性强。使用试剂盒裂解混合液作为模板扩增相关基因，1%琼脂糖凝胶电泳分析，见下图：



操作前准备事项

使用本试剂盒前，请务必仔细阅读说明书。Plant Direct PCR Kit 操作简单、方便、快速，说明书提供了整个试剂盒的完整信息和正确使用方法。请在使用前准备好必要的实验材料和设备。

实验材料和设备

- ◆ 各种来源的植物叶片（新鲜的、冷冻保存的）。
- ◆ 1.5ml 无菌离心管、0.2ml 无菌 PCR 管。

- ◆ 台式离心机 ($\geq 13,400\times g$)、PCR 仪、95°C 水浴或金属浴、移液器等。

安全性

- ◆ Buffer P1 含 SDS: 刺激性、致敏性。

操作指南

试剂盒根据不同实验需要，提供了两种操作方法。直接法仅需要将一小片植物组织直接加入 PCR 反应体系即可；裂解法则是将少量含有植物组织的裂解产物加入 PCR 反应体系。其中裂解法适合目的片段较长，扩增难度较大，以及需要以同一样本进行多次 PCR 扩增的实验。

一、直接法

1. 在 200 μ l PCR 管内加入 2 \times Plant PCR Easy Mix、引物、适量的 ddH₂O，使得 2 \times Plant PCR Easy Mix 稀释至 1 \times ，混匀（体系配制见表一）。
2. 剪取 1-2mg 叶片碎块（直径 2-3mm）到配制好的 1 \times PCR 反应体系中。若选用材料为较成熟的叶片，尽量避免剪取叶片主脉部分，尽量使用幼嫩叶片。
注意：保证叶片完全被 PCR 反应液浸没，不能贴在 PCR 管壁上；不能加入过量组织材料，过量组织会引起 PCR 扩增效率降低。在剪取不同叶片样品之前，用 70% 的乙醇冲洗打孔钳或剪刀，以免样品污染。
3. 根据优化好的 PCR 条件（退火温度等）进行 PCR 反应（反应条件见表二）。
注意：尽量使用优化后的条件进行 PCR 反应，可以得到更好的结果。
4. 琼脂糖凝胶电泳检测结果。

PCR 反应体系配制(表一)

PCR 体系添加内容	用 量		终 浓 度
2 \times Plant PCR Easy Mix	10 μ l	25 μ l	1 \times
Forward Primer (10 μ M)	0.5 μ l	1 μ l	0.2-0.25 μ M *
Reverse Primer (10 μ M)	0.5 μ l	1 μ l	0.2-0.25 μ M *
DNA模板	1-2mg叶片 (直径2-3mm)	2-3mg叶片 (直径3-3.5mm)	
ddH ₂ O (灭菌蒸馏水)	9 μ l	23 μ l	
Total Volume	20 μ l	50 μ l	

*：通常引物终浓度为0.2 μ M可以得到较好结果。反应性能较差时，可以在0.1-0.5 μ M范围内调整引物浓度。

注意：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。

PCR 反应条件举例 (表二)

步骤	温度	时间	循环数	内容
1	94℃	3min	1	预变性
2	94℃	30sec	35-40	变性
3	45-70℃	30sec		引物退火
4	72℃	x min (1kb/min)		延伸
5	72℃	5min	1	终延伸

注意：PCR反应条件视模板、引物等的结构条件不同而各异。在具体操作中需要根据模板类型、目的片段大小、扩增片段的碱基序列和引物的GC含量及长短等具体情况来设计最佳的反应条件，包括退火温度，延伸时间等。

二、裂解法**A：样本 DNA 释放 (PCR 模板预制)****A-1：小规模模板制备 (金属浴法)**

1. 剪取 5-10mg 叶片碎块 (直径 5-7mm) 到 1.5ml 离心管内。若选用材料为较成熟的叶片，尽量避免剪取叶片主脉部分。

注意：不能加入过量组织材料，过量组织会引起裂解效率降低。在剪取不同叶片样品之前，用 70% 的乙醇冲洗打孔钳或剪刀，以免样品污染。

2. 加入 50 μ l Buffer P1，轻轻混匀，确保裂解液能够完全浸没叶片碎块。
3. 将其放置于 95℃ 金属浴裂解 10min，其间可以轻微晃动离心管，以帮助植物组织裂解 (确保叶片碎块被裂解液完全浸没)。
4. 加入 50 μ l Buffer P2，置于涡旋混匀仪上充分震荡混匀。
5. 12,000 rpm (~13,400xg) 离心 1min。
6. 根据实验需要，使用微量移液器移取部分上清至新的离心管，4℃ 保存或直接作为模板进行 PCR 反应。

A-2：大规模模板制备 (PCR 仪法)

1. 剪取 5-10mg 叶片碎块 (直径 5-7mm) 到 200 μ l PCR 管或 PCR 板内。若选用材料为较成熟的叶片，尽量避免剪取叶片主脉部分。

注意：不能加入过量组织材料，过量组织会引起裂解效率降低。在剪取不同叶片样品之前，用 70% 的乙醇冲洗打孔钳或剪刀，以免样品污染。

2. 加入 50 μ l Buffer P1，确保裂解液能够完全浸没叶片碎块。
3. 将其放置于 PCR 仪，95℃ 裂解 10min。

本产品仅供科研使用。请勿用于医药、临床医疗、食品及化妆品等用途

- 加入 50 μ l Buffer P2，用微量移液器吹打混匀。
- 使用微量移液器将上清转移至新的离心管，4 $^{\circ}$ C 保存或直接作为模板进行 PCR 反应。

B : PCR 反应鉴定

- 取适量的 A 步骤处理好的裂解混合液添加到 2 \times Plant PCR Easy Mix，再添加相应的引物，并用 ddH₂O 使 Plant PCR Easy Mix 为 1 \times （体系配制见表三）。

注意：模板量占 PCR 体系的 10-20%之间最佳，不宜超过 30%（如 20 μ l 的 PCR 体系中，加入 2-4 μ l 裂解液即可，不宜超过 6 μ l）。

- 将 PCR 体系混匀，根据优化好的 PCR 条件（退火温度等）进行 PCR 反应（反应条件见表四）。

注意：尽量使用优化的 PCR 条件进行 PCR 反应，可以得到更好的结果。

- 琼脂糖凝胶电泳检测结果。

PCR 反应体系配制(表三)

PCR 体系添加内容	用 量		终 浓 度
2 \times Plant PCR Easy Mix	10 μ l	25 μ l	1 \times
Forward Primer (10 μ M)	0.5 μ l	1 μ l	0.2-0.25 μ M *
Reverse Primer (10 μ M)	0.5 μ l	1 μ l	0.2-0.25 μ M *
DNA模板	4 μ l	10 μ l	
ddH ₂ O (灭菌蒸馏水)	5 μ l	13 μ l	
Total Volume	20 μ l	50 μ l	

*：通常引物终浓度为0.2 μ M可以得到较好结果。反应性能较差时，可以在0.1-0.5 μ M范围内调整引物浓度。

注意：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。

PCR 反应条件举例 (表四)

步骤	温度	时间	循环数	内容
1	94℃	3min	1	预变性
2	94℃	30sec	35-40	变性
3	45-70℃	30sec		引物退火
4	72℃	x min (1kb/min)		延伸
5	72℃	5min	1	终延伸

注意：PCR 反应条件视模板、引物等的结构条件不同而各异。在具体操作中需要根据模板类型、目的片段大小、扩增片段的碱基序列和引物的 GC 含量及长短等具体情况来设计最佳的反应条件，包括退火温度，延伸时间等。

PCR 对照反应

在PCR结果分析时，不管是阳性结果或阴性结果，如果没有对照反应，我们都不能确定结果是否可靠。为了便于后续实验结果的分析，我们建议在进行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。

A : 阳性对照

选用容易扩增的样本保守基因的引物和采用纯化的样本DNA作为模板进行阳性对照反应以确定PCR反应体系和条件的正确性以及2×Plant PCR Easy Mix有效性。其反应体系的配制见表五。

阳性对照反应体系配制(表五)

PCR 体系添加内容	用 量		终 浓 度
2×Plant PCR Easy Mix	10μl	25ul	1×
Forward Primer (10μM) 1*	0.5μl	1μl	0.2-0.25μM
Reverse Primer (10μM) 1*	0.5μl	1μl	0.2-0.25μM
DNA模板2*	Xμl	Xμl	100-200ng
ddH ₂ O (灭菌蒸馏水)	(9-X) μl	(23-X) μl	
Total Volume	20μl	50μl	

1*：引物可选用该样本比较容易扩增的保守基因的引物，如β-Actin基因、叶绿体基因组上的保守序列等（请确保这些引物的可用性）。

2*：可选用样本纯化的 DNA，也可根据实验需要，自行选择。

B : 阴性对照

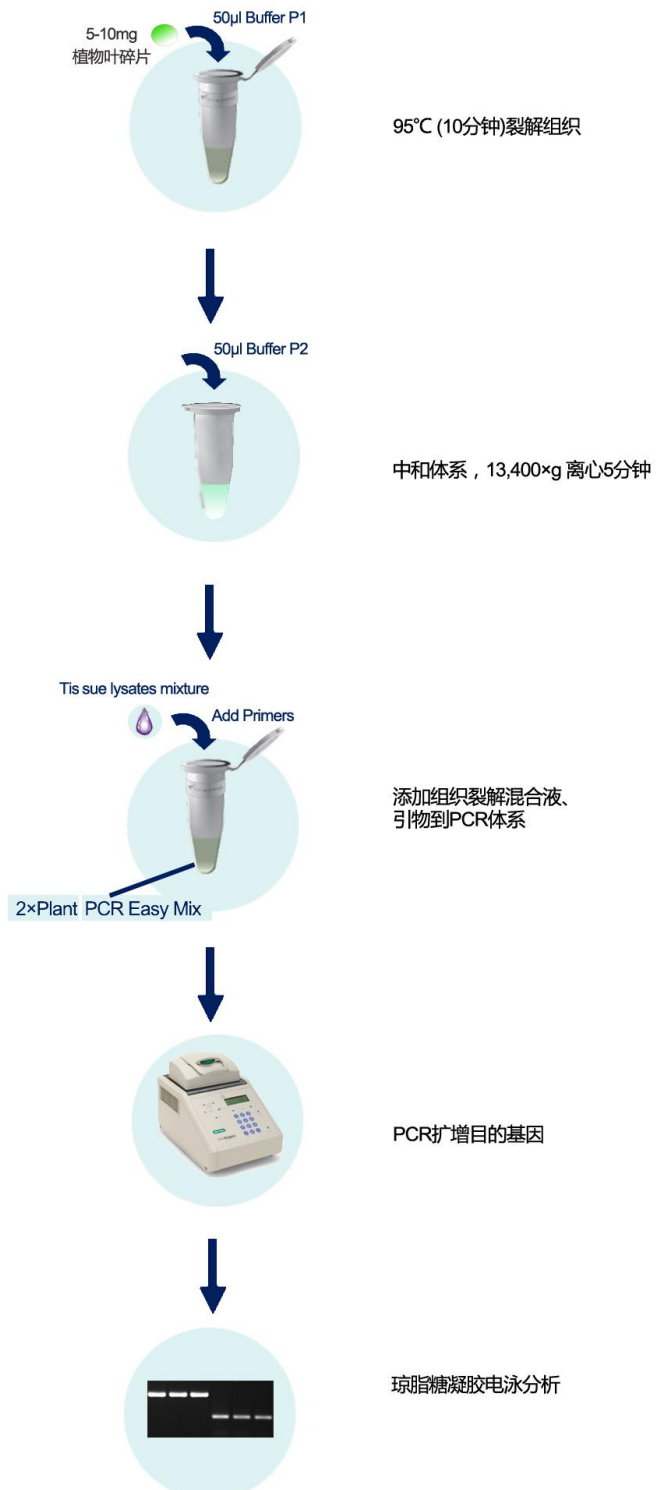
PCR反应体系被污染会导致PCR结果出现假阳性，需要设置阴性对照来排除。清洗后的打孔器或剪刀与样本接触的部位用ddH₂O浸泡，取其浸泡液作为模板；另取ddH₂O作为模板，用目的基因引物进行PCR扩增，以排除PCR体系是否被污染和实验是否有其他污染源。

操作示意图

直接法



裂解法



问题分析指南

以下针对 Plant Direct PCR Kit 在样本直接 PCR 实用中可能遇到的问题进行分析，希望能对您的实验有所帮助。另外，对于在操作说明和问题以外的其他实验或技术上的问题，我们设有专门的技术支持帮助您。如有任何需要可联系我们：028-66070618 或 E-mail: Tech@foregene.com。

在试剂盒的实用过程中往往会遇到许多问题，比如：没有 PCR 扩增产物、PCR 特异性差等，下面就分别对使用 Plant Direct PCR Kit 可能会遇到的问题进行分析。建议在直接 PCR 的同时设置阳性对照或阴性对照以便后续分析实验结果。

现象	原因	建议
正对照、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。	2xPlant PCR Easy Mix 应保存于-20℃，使用时避免反复冻融。若使用频繁，可在4℃短时间存放。
	引物设计问题	尝试重新设计引物进行检查
正对照有目的条带，待测样本无条带或条带弱	加入植物组织过量。	增大反应体系，或减少植物组织用量。
	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，中和后的裂解液的 pH 应该在 7-8 左右。
	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。	裂解液可在 4℃ 保存 2-3 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 10-20% 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。
	退火温度偏低。	适当提高退火温度。

本产品仅供科研使用。请勿用于医药、临床医疗、食品及化妆品等用途

非特异性扩增	PCR 循环数过多。	适当降低循环次数，推荐在 35-40 循环为佳。
	引物浓度偏高。	适量降低引物用量。
	模板加入量过多。	将模板加入量控制在 10-20%。
空白对照出现目的条带	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。

