

## 植物基因组 DNA 小量提取试剂盒

### E.Z.N.A.<sup>®</sup> Plant DNA Mini Kit

货号	D3485-00	D3485-01	D3485-02
反应次数	5 次	50 次	200 次
HiBind <sup>®</sup> DNA Mini Columns	5 个	50 个	200 个
2 mL Collection Tubes	10 个	100 个	400 个
P1 Buffer	5 mL	50 mL	180 mL
P2 Buffer	1 mL	10 mL	40 mL
P3 Buffer	4 mL	20 mL	80 mL
RNase A	40 $\mu$ L	250 $\mu$ L	1 mL
DNA Wash Buffer	2 mL	15 mL	3 x 20 mL
Elution Buffer	5 mL	15 mL	50 mL
User Manual	✓	✓	✓

#### ★ 保存方式及稳定性

1. 按条件保存的试剂盒保质期为 24 个月（见盒外失效日期），所有组分均可常温运输；
2. RNase A 长期保存放置 2-8°C；
3. 当贮存温度较低时，P1 Buffer 和 P3 Buffer 易析出沉淀，请在使用前把整瓶试剂置于 37°C 中至沉淀完全溶解，充分混匀后再使用；
4. 本试剂盒仅限科学研究使用。

#### ★ 实验前准备

1. 按照下表提示，使用【无水乙醇】对 DNA Wash Buffer 进行稀释，稀释后室温保存；

货号	无水乙醇 加入量
D3485-00	8 mL
D3485-01	60 mL
D3485-02	80 mL (每瓶)

## 用户自备仪器及耗材：

- ✓ 离心转速可达 14,000xg 的小型离心机
- ✓ 无核酸酶的 1.5mL 离心管
- ✓ 无水乙醇、异丙醇、无菌水、液氮
- ✓ 温度可达 65°C的孵育装置
- ✓ 研钵、研磨杵 (Cat# SSI-1015-39)
- ✓ 涡旋仪
- ✓ 带标准接口的多头真空抽滤装置

## ★ 提取步骤 —— 干燥样品离心方案

1. 用机械研磨仪或者研钵将干燥样品研磨成粉末状；然后称量 10-50 mg 样品粉末到 1.5 或 2 mL 离心管中；
2. 加入 800  $\mu$ L P1 Buffer，涡旋混匀，确保充分分散沉淀；  
**# 注意：**按照一组 4-6 个样品处理：研磨，加 P1 Buffer，然后继续步骤 3，再开始第二组，干燥的样品量注意不要超过 50mg。需要充分悬浮样品，使裂解液中不存在结块，样品团聚会导致产量低。
3. 65°C 孵育 10min，孵育期间颠倒混匀 2 次；
4. 加 140  $\mu$ L P2 Buffer，涡旋充分混匀；
5. 室温 10,000xg 离心 10min；转移上清液到一新的离心管，注意不要吸到沉淀；
6. 加 0.7 倍上清体积的异丙醇，混匀。这一步可以去除大部分的多糖并通过后续的步骤来增加 DNA 结合能力从而达到提高产量的目的。加异丙醇后无需孵育；  
**# 注意：**通常步骤 5 可以转移得到 700  $\mu$ L 上清液，需要加 490 $\mu$ L 的异丙醇。注意样品不同，上清液的体积可能会有所不同，需要测量体积并正确加入异丙醇。
7. 室温 14,000xg 离心 2min；
8. 弃上清，小心吸除废液注意不要吸到 DNA 沉淀，把离心管倒扣在吸水纸上 1min，把废液吸干，该步无需干燥 DNA；
9. 加 300  $\mu$ L 无菌水，65°C加热，涡旋溶解 DNA 沉淀；

**# 注意：**65°C短暂加热可以有效地溶解 DNA。

10. 加入 4  $\mu\text{L}$  RNase A, 涡旋混匀;

**# 注意：**可以把 RNase A 加入到步骤 9 的无菌水中来简化步骤, RNase A 在孵育过程中保持稳定活性。

11. 加入 150  $\mu\text{L}$  P3 Buffer 和 300  $\mu\text{L}$  无水乙醇, 充分涡旋混匀; 加入无水乙醇后可能会形成絮状沉淀, 这不影响 DNA 的回收。可以用移液枪上下吸打混匀 10-15 次, 这可能会使沉淀重新溶解;

12. 将 HiBind<sup>®</sup> DNA Mini Columns 套入收集管中;

13. 转移第 11 步得到的混合液到结合柱中, 室温 10,000xg 离心 1min, 弃滤液及收集管;

14. 将 HiBind<sup>®</sup> DNA Mini Columns 套到新的收集管中, 加入 650 $\mu\text{L}$  DNA Wash Buffer(已加无水乙醇正确稀释)至结合柱中, 10,000xg 离心 1min, 弃滤液;

**# 注意：**DNA Wash Buffer 在使用前必须按照说明书用无水乙醇进行稀释。

15. 重复步骤 14 进行第二次 DNA Wash Buffer 洗涤;

16. 将 HiBind<sup>®</sup> DNA Mini Columns 套回收集管, 12,000xg 离心空甩 2min;

17. 将 HiBind DNA Mini Columns 套入新的 1.5mL 离心管中, 加入 50-100  $\mu\text{L}$  65°C预热的 Elution Buffer 或无菌水至结合柱中, 室温放置 3-5min, 然后 10,000xg 离心 1min 洗脱 DNA;

18. 重复步骤 17 进行二次洗脱, 产物放置 -20°C 保存。

**# 注意：**以下操作可以用来帮助提高 DNA 产量。

- 首次洗脱可获得 60-70%的 DNA, 二次洗脱洗脱效率~90%。
- 用新的 Elution Buffer 进行二次洗脱(可增加产量, 但会导致浓度降低)。
- 某些情况下, 把 Elution Buffer 加到 HiBind DNA Mini Columns 后 65°C孵育, 可以提高产量。

## ★ 提取步骤 —— 新鲜或冷冻样品离心方案

1. 把样品先用液氮浸泡冷冻，然后用机械研磨仪或者研钵将样品研磨成粉末状；然后称量 100mg 样品粉末到 1.5 或 2 mL 离心管中；
2. 加入 600  $\mu$ L P1 Buffer，涡旋混匀，确保充分分散沉淀；需要充分悬浮样品，使裂解液中不存在结块，样品团聚会导致产量低；  
**# 注意：**按照一组 4-6 个样品处理：研磨，加 P1 Buffer，然后继续步骤 3，再开始第二组，样品量注意不要超过 200mg。
3. 65°C 孵育 10min，孵育期间颠倒混匀 2 次；
4. 加 140  $\mu$ L P2 Buffer，涡旋充分混匀；
5. 室温 10,000xg 离心 10min；转移上清液到一新的离心管，注意不要吸到沉淀；
6. 加 0.7 倍上清体积的异丙醇，混匀。这一步可以去除大部分的多糖并通过后续的步骤来增加 DNA 结合能力从而达到提高产量的目的。加异丙醇后无需孵育；  
**# 注意：**通常步骤 5 可以转移得到 600  $\mu$ L 上清液，这样就需要加 420 $\mu$ L 的异丙醇。注意样品不同，上清液的体积可能会有所不同，需要测量体积并正确加入异丙醇。
7. 室温 14,000xg 离心 2min；
8. 弃上清，小心吸除废液注意不要吸到 DNA 沉淀，把离心管倒扣在吸水纸上 1min，把废液吸干，该步无需干燥 DNA；
9. 加 300  $\mu$ L 无菌水，65°C 加热，涡旋溶解 DNA 沉淀；  
**# 注意：**65°C 短暂加热可以有效地溶解 DNA。
10. 加入 4  $\mu$ L RNase A，涡旋混匀；RNase A 的处理不需要额外的孵育。  
**# 注意：**可以把 RNase A 加入到步骤 9 的无菌水中来简化步骤，RNase A 在孵育过程中也能保持稳定活性。
11. 加入 150  $\mu$ L P3 Buffer 和 300  $\mu$ L 无水乙醇，充分涡旋混匀；  
**# 注意：**加入无水乙醇后可能会形成絮状沉淀，这不影响 DNA 的回收。
12. 按照第 3 页“干燥样品离心方案”的步骤 12-18 继续完成操作。

## ★ 提取步骤 —— 快速离心方案

1. 先用机械研磨仪或者研钵将样品研磨成粉末状；然后称量 < 50mg 的干燥样品/ < 200mg 的冷冻或新鲜的样品粉末到 1.5 或 2 mL 离心管中；
2. 加入 600  $\mu$ L P1 Buffer 和 5  $\mu$ L RNase A, 涡旋混匀, 确保充分分散沉淀, 室温放置 1min；
3. 65°C 孵育 5min, 孵育期间颠倒混匀 1 次；
4. 加 140  $\mu$ L P2 Buffer, 涡旋充分混匀；
5. 室温 10,000 $\times$ g 离心 10min；转移上清液到一新的离心管, 注意不要吸到沉淀；  
**# 注意：**通常可以转移得到 600  $\mu$ L 上清液。上清液的体积会有所不同, 干燥的样品上清液会比较低。
6. 加入 0.5 倍上清体积的 P3 Buffer 和 1 体积的无水乙醇, 充分涡旋混匀；  
**# 注意：**加入无水乙醇后可能会形成絮状沉淀, 这不影响 DNA 的回收。
7. 按照第 3 页“干燥样品离心方案”的步骤 12-18 继续完成操作。

## ★ 提取步骤 —— 真空抽滤方案

1. 按照第 2-3 页“干燥样品离心方案”的步骤 1-11, 第 3 页“冷冻或新鲜样品离心方案”的步骤 1-11, 或者第 4 页“快速离心方案”的步骤 1-7 准备好裂解结合液；
2. 按英文使用说明准备好真空抽滤器, 把 HiBind<sup>®</sup> DNA Mini Column 连接到抽滤器；
3. 转移裂解液到 HiBind<sup>®</sup> DNA Mini Column, 小心不要超过结合柱的容积 (700 $\mu$ L), 用真空抽滤让裂解液通过结合柱, 转移剩下的裂解液到结合柱, 抽滤, 直到所有的裂解液都通过结合柱；
4. 洗涤结合柱: 加 650 $\mu$ L DNA Wash Buffer (已加无水乙醇稀释), 抽滤；
5. 重复步骤 4, 进行第二次 DNA Wash Buffer 洗涤；
6. 弃去滤液, 把 HiBind<sup>®</sup> DNA Mini Column 重新装回收集管, 最大速度离心空柱 2min 以甩干结合柱基质；
7. 把 HiBind<sup>®</sup> DNA Mini Column 装在干净的 1.5mL 离心管上, 加入

50-100 $\mu$ L Elution Buffer 到结合柱基质中，静置 2min，13,000 $\times$ g 离心 1min 洗脱出 DNA；

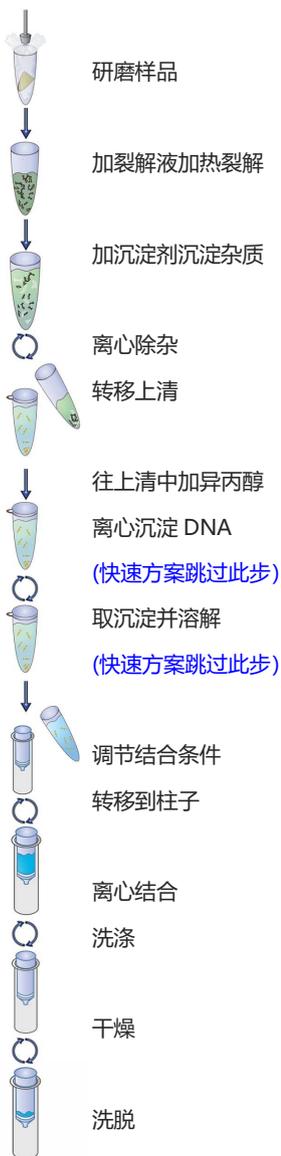
**# 注意：**

- 确保 Elution Buffer 准确加入到结合膜中央；
- 首次洗脱可获得 60-70%的 DNA，二次洗脱洗脱效率~90%。
- 用新的 Elution Buffer 进行二次洗脱(可增加产量,但会导致浓度降低)。
- 某些情况下，把 ELution Buffer 加到 HiBind DNA Mini Columns 后 65 $^{\circ}$ C 孵育，可以提高产量。

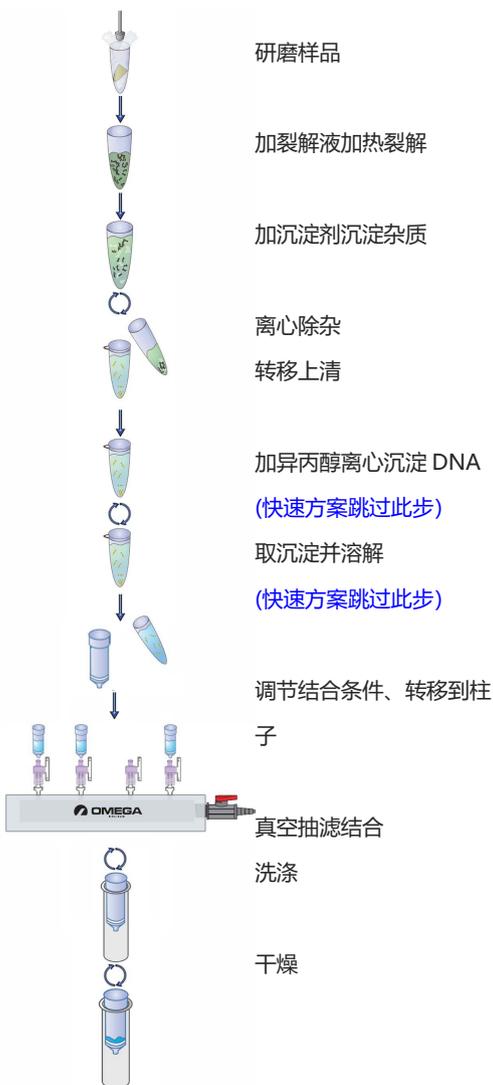
8. 将洗脱的 DNA 保存在-20 $^{\circ}$ C。

## ★ 提取步骤示意图

### 离心操作流程



### 真空抽滤操作流程



## ★ 产品信息卡



更多详情，请扫描左方二维码获取原文说明书

中文翻译仅供辅助阅读



常见问题合集及操作注意事项

请扫描左方二维码获取



中国总代理：广州飞扬生物工程有限公司

技术支持：020-32051125

企业 QQ：800848200（人工客服在线）

中文网站：[omegabiotek.com.cn](http://omegabiotek.com.cn)



如需查询代理商名录，请关注“飞扬生物”微信号获取

### 售后保障服务说明

为确保您所使用的试剂为正品来源，请从使用单位所在地指定代理商处购买 Omega bio-tek 产品。由其他渠道购买或任一标签信息(应包括货号、条形码、完整 Lot 号、失效日期)缺失的试剂盒，我司恕不提供任何质量保证及售后服务。