

For research use only

Version Number: 1.1

Plant Leaf Direct PCR Kit - UNG

For performing PCR directly from plant leaves (containing low polysaccharide and polyphenol components) without prior DNA purification

试剂盒组成		TP-02121	TP-02123
(50 μ L 裂解体系 + 20 μ L PCR 体系)		200 T	2000 T
Part I	Buffer P1	10 mL	100 mL
	Buffer P2	10 mL	100 mL
	6 \times DNA Loading Buffer	1.5 mL	6 mL
Part II	2 \times Leaf PCR Easy™ Mix(UNG)	1 mL \times 2	1.7 mL \times 12
说明书		1 份	1 份

产品简介

本产品采用独特的裂解缓冲液体系，能够快速地从多糖多酚含量低植物(如：水稻、小麦、烟草、玉米、大豆、油菜等)的叶片样本中释放出基因组 DNA，用于 PCR 反应。

裂解缓冲液处理叶片时，无需研磨或剪碎处理。裂解缓冲液释放基因组 DNA 过程可以在 5-10 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，特别适合大规模基因检测。

2 \times Leaf PCR Easy™ Mix 具有很强的 PCR 反应抑制物耐受性，能以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 D-Taq DNAPolymerase、dNTPs、MgCl₂、反应缓冲液、PCR 优化剂和稳定剂。与裂解缓冲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。

2 \times Leaf PCR Easy™ Mix(UNG)在 2 \times Leaf PCR Easy™ Mix 的基础上用 dUTP 替代了 dTTP，并同时加入能够降解含有 dUTP 模板的 UNG 酶(Uracil-N-glycosylase)。在 PCR 反应前，利用 UNG 酶降解含有尿嘧啶的 PCR 产物，UNG 酶对不含有尿嘧啶的模板不会造成任何影响，从而保证扩增的特异性和准确性，防止了大规模基因检测时可能出现的 PCR 产物污染问题。

运输及储存条件

- ❖ 运输条件：全程低温冰盒运输，保证试剂盒 Part II 处于<4°C 状态。
- ❖ 保存条件：本试剂盒 Part I 保存在常温或 2-8°C；Part II 保存在-20°C。

产品特点

- ❖ 无需进行费时而昂贵的 DNA 纯化。
- ❖ 样品需求量小，直径 2 mm (1 mg)的叶片即可进行实验。
- ❖ 无需研磨、破碎等特殊处理，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。
- ❖ 防污染 PCR 体系 2 \times Leaf PCR Easy™ Mix，有效消除由 PCR 产物所引起的污染，保证扩增的特异性和准确性。

注意事项：(请务必在使用试剂盒前仔细阅读注意事项)

- ❖ 该试剂盒只适合于多糖多酚含量低的植物样本，多糖多酚含量高的样本请选择多糖多酚植物叶片直接 PCR 试剂盒(Plant Leaf Direct PCR Plus Kit-UNG)。
- ❖ 注意实验用具的清洁以及实验的操作手法，避免样本间的交叉污染。
- ❖ 请尽量使用植物新鲜幼嫩叶片进行实验。若选用成熟的叶片，请避免使用叶片主脉部位组织。
- ❖ 若 Buffer P1 有沉淀析出，可放置于 37°C 待沉淀消失，并摇匀溶液后使用。
- ❖ 2 \times Leaf 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，2 \times Leaf PCR Easy™ Mix 可能会变浑浊，可置于冰上放置 1-2 min，待溶液澄清，上下颠倒混匀 3-5 次后再使用。
- ❖ 电泳检测时，切勿使用含有 SDS 的 Loading Buffer，否则在电泳时会在泳道中出现一大团拖尾亮带，影响实验结果判断。

操作指南

一、直接法 (仅限多糖多酚含量低的植物叶片样本)

- 在 200 μL PCR 管内加入 2 \times Leaf PCR Easy™ Mix, 再添加对应的引物, 并用 ddH₂O 使其稀释为 1 \times (PCR 体系配制见下表 1)。
- 剪取 1-2 mg 叶片碎块(直径 2-3 mm)加入上述配制的 PCR 体系中。
注意: 确保叶片碎块完全被 PCR 反应液浸没, 切勿加入过量叶片组织。
- 根据优化好的 PCR 条件(退火温度等)进行 PCR 反应(反应条件见下表 2)。
- 琼脂糖凝胶电泳检测结果。

二、裂解法

A: 样本释放

- 剪取 3-5 mg 叶片组织(直径 5-7 mm)到 200 μL 或 1.5 mL 离心管中。
注意: 切勿加入过量叶片组织。
- 加入 50 μL Buffer P1, 确保裂解液能够完全浸没叶片组织。
- 盖好离心管盖, 将其置于 PCR 仪或金属浴中, 95°C 裂解 10 min。
注意: 加热后, 如果管壁上液体较多, 可瞬时离心将液体收集到离心管底部。
- 加入 50 μL Buffer P2, 用微量移液器吹打或者涡旋混匀。
- 所得裂解混合液可 4°C 保存(5 天以内)或直接作为模板进行 PCR 反应。若需要长期保存, 可以将裂解混合液置于 -20°C 进行保存。

B: PCR 反应鉴定

- 在 PCR 管内加入相应的 2 \times Leaf PCR Easy™ Mix(UNG)以及特异引物待用。
- 取适量的 A 步骤处理好的裂解混合液添加到上述配制的 PCR 体系中(体系配制见下表 1)。
注意: 模板量占 PCR 体系的 10-20% 之间最佳, 不宜超过 30%(如 20 μL 的 PCR 体系中, 加入 2-4 μL 裂解液即可, 不宜超过 6 μL)。
- 根据优化好的 PCR 条件(退火温度等)进行 PCR 反应(反应条件见下表 2)。
- 琼脂糖凝胶电泳检测结果。

表 1: PCR 反应体系配制

PCR 体系添加内容	用 量		终 浓 度
2 \times Leaf PCR Easy™ Mix(UNG)	10 μL	25 μL	1 \times
Forward Primer(10 μM)	0.5 μL	1 μL	0.2-0.25 μM 1*
Reverse Primer(10 μM)	0.5 μL	1 μL	0.2-0.25 μM 1*
叶片组织或裂解混合液(DNA模板) 2*	X μL	X μL	
ddH ₂ O(灭菌蒸馏水)	(9-X) μL	(23-X) μL	
Total Volume	20 μL	50 μL	

1*: 通常引物终浓度为 0.2-0.25 μM 可以得到较好结果。反应性能较差时, 可以在 0.1-0.5 μM 范围内调整引物浓度。

2*: 裂解产物作为 PCR 模板, 加入量在 PCR 体系 10-20% 之间最佳, 实际操作可进行模板加入量条件摸索, 找到最佳模板用量。

注意: 此体系配制仅作参考, 实验室可根据需要调整 PCR 体系大小, 添加适当比例的裂解混合液即可。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。

表 2: 反应条件举例

步 骤	温 度	时 间	循 环 数	内 容
1	37°C	5 min	1	UNG 酶处理
2	94°C	3 min	1	预变性
3	94°C	10 sec	30-40	变性
4	55-65°C	20 sec		引物退火
5	72°C	X min (2kb/min) 2*		延伸
6	72°C	5 min	1	终延伸

1*: 2 \times Leaf PCR Easy™ Mix(UNG)对高 GC 含量的模板具有很好的扩增能力, 在进行 PCR 时, 我们建议所有引物的退火温度比 T_M 值高 2°C。

2*: 1 kb 以内的 DNA 片段, 建议延伸时间为 30 sec。

注意: 此表 PCR 条件仅供参考。PCR 反应条件视模板、引物等的结构条件不同而异。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。

请务必按下图取样, 叶片取样大小切勿超过下图所示

直接法(比例尺=1: 1)

裂解法(比例尺=1: 1)

