



08-08

Nucleic Acid Purification Kit

MagExtractor

-Plant Genome-

(Code No.: NPK- 500,501)

使用说明书

研究用

TOYOBO CO., LTD. Life Science Department
OSAKA JAPAN

目 录

1. 前言.....	1
2. 使用前须知.....	1
3. 试剂盒中所包含的物品.....	2
4. 操作程序.....	3
[1] 试剂盒需要的其他物品	3
[2] 抽提流程	4
[3] 样品前处理	5
[4] 使用MFX-2000 进行Plant DNA抽提	6
[5] 使用手动法进行Plant DNA抽提	10
5. 一般样品的分析.....	11
[1] DNA定量	11
[2] 电泳	11
[3] PCR	11
6. 抽提实例.....	12
7. 疑难解答.....	13

【 注意 】

本试剂盒中所包含的所有试剂为研究用试剂。请不要用于诊断或临床等场合。
在使用本试剂盒的时候，请严格遵守常用的实验室安全操作程序。

Hoffman-La Roche Ltd.拥有PCR方法的专利权。

1. 前言

MagExtractor-Plant Genome-利用在 Chaotropic (盐) 的情况下, DNA 吸附于硅胶表面的特性, 进行 Plant DNA 的抽提。本试剂盒与自动核酸抽提装置 MFX-2000 并用, 可简便地从植物叶及植物培养细胞等植物样品中抽提出高纯度的 Plant DNA。另外, 本试剂盒也可用作手动抽提用试剂盒而加以使用。

特征

- 本试剂盒用于从植物标本如培养细胞和叶子以及其它植物组织中进行 DNA 抽提。
- 无需进行乙醇沉淀, 可以实现快速抽提。
- 不使用苯酚。
- 不使用 RNase。
- 所抽提的 DNA 被回收至 TE 缓冲液中, 可以被直接用于 PCR 或者其它分析方法。

2. 使用前须知

- MagExtractor-Plant Genome-适用于以下样品:

对应样品	样品量	主要用途
植物标本, 如叶子以及培养细胞	0.01 到 0.1g	PCR

参见第十页“6. 抽提实例”。

- 有关溶解液的储存

由于本试剂盒是在低温下进行储存以及运输, 因此溶剂中的表面活性剂成分将有所沉淀。按照以下的步骤, 请在室温 (20~30°C) 下进行相应的溶解以及储存。从溶剂的表面上看, 有些情况下可能没有任何沉淀出现, 但是, 可能已形成了透明凝块, 故在使用之前, 务必进行以下操作。同样, 如果在储存期间产生沉淀, 也进行相同的操作并进行溶解。其它试剂请在 4°C 下进行储存。

(参照第 2 页 “[3] 试剂盒中包含的物品”。)

- (1) 在 50℃ 的水浴下，加热 10 分钟。
- (2) 轻轻地上下转动瓶子以溶解沉淀的凝块。（剧烈摇动会形成泡沫。）
- (3) 在 50℃ 的水浴下中，再次加热 5 分钟。
- (4) 轻轻地上下转动瓶子以进行完全溶解。

如果在溶液中仍然有一些未溶解的部分，则在水浴下中再次加热 5 分钟并上下转动混合直到未溶解的部分完全被溶解。

（可能会形成透明凝块，请进行两次检查以确保完全溶解。）

- 建议在室温（20~30℃）下使用本试剂盒。低温会导致溶剂成分的沉淀可能会影响本试剂盒的性能。

3. 试剂盒中所包含的物品

在本试剂盒中含有可以抽提出 100 份 RNA 样品的试剂。请在以下的温度下储存这些试剂：

试剂	容量	储存
溶解液	20ml	溶解后，在室温（20~30℃）下保存。
吸附液	45ml	4℃
洗净液	100ml	4℃
磁珠	3ml	4℃

· 分别以各自规定的温度进行保存，并且在使用之前请先将它们回复到室温状态。另外，也可以在室温（25℃以下）下进行（1 个月内）短期储存。

· 吸附液以及洗净液含有高浓度的蛋白质变性剂。在处理时应小心谨慎并戴上手套以及其它防护用具并且实施适当的安全预防措施。万一试剂沾在手或者皮肤上，请用清水充分清洗。如若碰到眼睛，请立刻用清水清洗，然后去看医生。

· 如果使用本公司的 MFX-2000 自动核酸抽提装置，请将所需的量倒入指定的试管中，并将其安装在规定的位置上。

（参照第 6 页“4 - [4] - (5) 试剂的安装”。）

4. 操作程序

[1] 试剂盒需要的其他物品

(1) 试剂

- 液氮

- 氯仿/异戊醇

将氯仿：异戊醇*¹以比例 24：1（体积比）混合

- 灭菌水

市场上销售的纯水或者经过高温高压蒸汽灭菌消毒处理过的 milli Q 水。

- 乙醇

99.5%以上的特级品。用于手动抽提时，请使用 70%的乙醇。

- TE 缓冲液（pH 8.0）

10mM Tris-HCl（pH 8.0），1mM EDTA（pH 8.0）

*¹ 又被称为 3-甲基-1-丁醇。

(2) 器具及器材

- 微量移液器

- 微量移液器用 tip

- （具有大约 3,000 到 12,000 rpm 的）台式离心机

- 加温 block（也可以是水浴槽，65℃）

- 1.5ml 微型试管

当使用**MFX-2000**时：

- 抽提专用试管（Code No.: MFX-301）... 用于样品回收
- 抽提专用 6 连试管（Code No.: MFX-302） 用于进行抽提
- 附带专用过滤器的 tip（Code No.: MFX-402）
- 安装试剂用试管（50ml、15ml、2ml）*¹

当使用手动法时：

- 1.5ml 微型试管用磁性台架

（东洋纺织 *Magical Trapper* (Code No.: MGS-101)）

- 试管混合器（由 Tomy Seiko 有限公司制造的 MT-360 等）

*1 建议将以下物品用作试剂设置用试管：

50ml 的试管：Blue Max 2170（Becton Dickinson 产品）。

15ml 的试管：Blue Max. Jr 2196（Becton Dickinson 产品）。

2ml 的微型试管：2220, 2200（INOUP TIC 公司产品）。72.693, 72.694（Assist 公司产品）

[2] 抽提流程

经简单的前处理之后，MagExtractor -*Plant Genome*-可以使用 MFX-2000 进行自动抽提。以下是关于抽提流程的说明。

使用液氮的冻结样品

- ← 溶解液..... [细胞分解]
- ← 在 65°C 下进行 10 分钟
- ← 氯仿抽提..... [多聚糖的去除]
- ← 吸附液 前处理约 15 分钟

使用 MFX-2000 进行抽提

- ← 磁珠：大约 2 分钟..... [DNA 的吸附]
- B/F 分离
- ← 洗净液：大约 5 秒（2 次）..... [非特异吸附物的去除]
- B/F 分离
- ← 70% 的乙醇：大约 5 秒（2 次） [蛋白质变性剂的去除]
- B/F 分离
- ← 抽提液（TE）：大约 2 分钟..... [DNA 的溶出]
- B/F 分离

上清液的回收（100 μl）

自动抽提总共耗时大约 10 到 12 分钟

即使用当手工方法进行抽提，在前处理之后，DNA 抽提也只需耗时约十五分钟。（参照第八页上的“[4]-5 使用手工方法进行 Plant DNA 抽提”。）

[3] 样品前处理

进行 DNA 抽提时使用 MagExtractor-Plant Genome-试剂盒进行 DNA 抽提时要求对所使用的样品进行前处理。（参照第三页上的“[4]–[2]抽提流程”。）

根据以下步骤，进行前处理。

- (1) 将储存在液氮中的 0.01~0.1g 的样品磨碎。（快速进行该项，并同时补充液氮以避免样品融解。）
- (2) 将样品移入 1.5ml 试管中。（使用液氮或者其它方法对使用的药匙及试管进行提前冷却以避免已磨碎的样品被融解。）
- (3) 在样品中添加 300 μ l 的溶解液并进行充分混合。（确认其没有沉淀后再进行添加。如果有沉淀，请参照第一页“2. 使用前须知”并对沉淀进行溶解。）
- (4) 使用旋涡混合器，剧烈振动 10 秒钟。（只有将样品完全浸没溶剂之后，才能进行振动。）
- (5) 在 65 $^{\circ}$ C 下培育 10 分钟。（使用旋涡混合器，每隔 3 到 4 分钟进行共 2 次的剧烈搅拌，每次 5 秒钟。）
- (6) 添加 300 μ l 的氯仿/异戊醇。
- (7) 剧烈混合 3~5 秒钟。（旋涡混合器可能无法使溶液被完全均匀地混合，可用手剧烈摇动使其混合。）
- (8) 用离心机以 12,000 rpm 的速度进行 1 分钟的离心。（根据样品的不同情况，可能会有少量的沉淀。如果发生了这种情况，请再用离心机进行 2~3 分钟的离心。）
- (9) 将 250 μ l 的上清液回收到一个未使用过的 1.5ml 试管中。（如果上清液少于 250 μ l，则必须非常仔细地进行操作，同时对溶液界面进行抽吸以回收上清液。上清液的量因样品而有所不同。
例： 0.1g 的烟草大约有 250 μ l
 0.1g 的水稻植物大约有 200 μ l
- (10) 添加 600 μ l 的吸附液。
（如果上清液少于 100 μ l，则添加 750 μ l 吸附液。）

[4] 使用 MFX-2000 进行 Plant DNA 抽提

在使用MFX-2000 之前，请务必通读完其使用说明书。

(1) 操作程序的选择

现在可供使用的MFX-2000 程序可针对DNA、Total RNA、质粒DNA等的抽提。使用MagExtractor-Plant Genome-请用第 13 号操作程序。

(2) 加温 block 以及回收 block 温度的设定

将加温 block 以及冷却 block 设定成如下所述的温度：

	加温 block	冷却 block
温度设定	OFF	10℃

- 由于不使用加温 block，请切断其电源。
- 使用简易保冷 block 时，请将 block 事先置于冷藏库或是低温室进行予冷。
简易保冷可用于回收液的临时保冷。

(3) 附带专用过滤器的 tip 安装

将具有专用过滤器的 tip 安装在 tip 架上。相关数量，请参见以下表格。

- 请务必使用附带专用过滤器的 tip（Code No.: MFX-402）。
- tip 已经过 γ 射线消毒。在进行安装时，一定要使用手套。
- 安装超过规定数量的 tip 不会引起任何问题。
- 将必要量的 tip 从左下方开始，垂直地排列在 tip 架上。有关安装位置的更多细节，请参见 MFX-2000 使用说明书。

样品数	tip 数	样品数	tip 数
1	6	13	39
2	8	14	41
3	10	15	43
4	12	16	45
5	17	17	50
6	19	18	52
7	21	19	54
8	23	20	56
9	28	21	61
10	30	22	63
11	32	23	65
12	34	24	67

(4) 专用试管的安装

根据样品个数，将专用试管（编号： **MFX-301**）或者特制的 6 连试管（编号： **MFX-302**）安装在抽提架的 **A** 到 **F** 的插槽以及回收 block 上。

- 除了以上提及的专用试管，不得将其它试管安装在抽提架中，否则容易产生故障。
- 专用试管（编号： **MFX-301**）以及带螺旋帽的 1.5ml 试管*¹被设置在回收block中。
- 有关设置位置的更多细节，请参照 **MFX-2100** 使用说明书。

* Assist试管（编号： 72.692）等

(5) 试剂的安装

将试剂注入到规定的试管中并将它们安装在指定的试剂架上。

- 确认每种试剂是否都已回复到室温。
- 试剂的必需量依据样品的数量而定。请参照下页的表格，安装试剂。
- 在进行分装之前，请充分地搅动磁珠并进行确认，直到这些磁珠已均匀混合。然后将它们分装到 2ml 试管中。另外，在注入磁珠后，请立刻（10 分钟之内）启动仪器，否则会导致产物有很大的差异并有可能导致仪器发生故障。
- 使用微量移液器分装磁珠。对于其它试剂，则将试管上的刻度标记作为分装时的标准。
- 抽提后所剩的试剂可以被再次使用。但是，如果长时间存放不用，则由于蒸发或者其它现象液体成分可能会发生变化。请务必注意。
- 请注意本试剂盒并不包含灭菌水、乙醇（99.5%以上的特级品）以及 TE 缓冲液（pH8.0）。（参照第 2 页上的“4 - [1] - (1) 试剂”。）

安装位置	试剂名	试管容量
1	灭菌水	50ml
2	洗净液	50ml
5	乙醇	50ml
7	磁珠	2ml
9	TE 缓冲液（pH8.0）	15ml

每种试剂的使用剂量

试剂	灭菌水	洗净液	乙醇	磁珠	TE
试管容量	50ml	50ml	50ml	2ml	15ml
安装位置	1	2	5	7	9

各试管中分装的试剂量 (ml)

样品数	1	5 (20)	5 (20)	5 (20)	0.5 (1.5)	2 (5)		
	2		10 (20)	10 (20)				
	3				15 (20)		15 (20)	0.8 (1.5)
	4		20 (20)	20 (20)				
	5							
	6	30 (35)			30 (35)			
	7					35 (35)	35 (35)	1.3 (1.5)
	8		40 (45)	40 (45)				
	9	45 (45)			45 (45)			
	10		10 (20)	10 (20)				
	11	15 (20)			15 (20)			
	12		20 (20)	20 (20)				
	13	25 (35)			25 (35)			
	14		30 (35)	30 (35)				
	15	35 (35)			35 (35)			
	16		40 (45)	40 (45)				
	17	45 (45)			45 (45)			
	18		5 (20)	5 (20)				
	19	10 (20)			10 (20)			
	20		15 (20)	15 (20)				
	21	20 (20)			20 (20)			
	22		25 (35)	25 (35)				
	23	30 (35)			30 (35)			
	24		35 (35)	35 (35)				

- 上表中所示根据样品总数而定的每种试剂分装量的参考标准。这些数值都含有保留量，因此，请根据这些数值将试剂分装到试管中。
- 圆括号中的数值代表当试剂分装到试管中时的最大容许量标准。分装量超过这些数值可能会造成喷嘴污染、引起溢出等其它问题。

(6) 样品的安装

按照第 4 页上的“4-[3] 样品前处理”来制备样品，并把它们安装在抽提架上。

- 如果使用带有螺旋帽的 1.5ml 样品试管，则剪掉盖子连结部后将它们放在样品的安装位置上。
- 将它们按照顺序安装在编号 1~24 的插孔中。

(7) 抽提开始

按照以下标准，开始进行抽提。

- ① 确认是否按照所规定的说明安装了样品、试管、专用试管（抽提架以及回收 block）以及专用 tip。
- ② 确认每个架子的安装位置以及工作台是否已完全收纳到里面（直至听到“咔嚓”声）。关上机器前门。（如果机器前门未完全关上，则抽提不会开始。）
- ③ 接通 MFX-2000 的电源。
- ④ 在液晶显示屏上将出现“操作程序”以及“样品数”。输入操作程序“13”并且在“样品数”中输入样品数量的数值。
- ⑤ 屏幕上会显示提示“请按下启动键”，后按下“START”。
- ⑥ 抽提启动后液晶显示屏上会显示“操作中”。

(8) 样品的回收

在完成抽提后，打开机器前门并取出样品。

- 在完成抽提后，所抽提的 DNA 将回收道安装在回收 block 上的试管中。在液晶显示屏上也将再次出现“请按下启动键”。
- 在已经证实了仪器已完全停止运转之后，从回收 block 中取出试管并在冷藏或者在低温（4~10℃）下储存直到再次使用这些试管。
- 从磁珠中溶出的 DNA，由于使用的是大约 100 μ l 的溶出液（TE 缓冲液），因此回收液也为 100 μ l 左右。

[5] 使用手动法进行 Plant DNA 抽提

本试剂盒也可以用于手工 DNA 抽提。可按照以下步骤进行抽提。

- 对于磁珠分离，建议使用市场上销售的 1.5ml 微型试管用磁性台架。另外，使用台式离心机以 3,000 rpm 程度离心 15 秒钟也能够进行分离。
- 未包含在本试剂盒中的其它必需物品

请参照第 2 页“4-[1]-(1) 试剂”。

请事先制备将特级乙醇与灭菌水按 7: 3 比例混合的 70% 乙醇溶液。（每个样品需要大约 2ml。）

- ① 取出按照第 4 页“4-[3] 样品前处理”制备的样品。
- ② 添加 40 μ l 磁珠。（在使用之前请将磁珠进行充分的混合。）
- ③ 使用试管混合器来进行 1 分钟的剧烈混合。[DNA 的吸收]
- ④ 将试管安装在磁性台架上并放置 30 秒左右以使磁珠凝集。（此时，对这些磁珠进行数次颠倒混合并且尽可能多地回收粘在盖子上的磁珠。）
- ⑤ 去除上清液。
- ⑥ 添加 900 μ l 洗净液。
- ⑦ 使用旋涡混合器剧烈混合 5 秒钟。（此时，确认磁珠是否已被充分地分散以及混合。）
- ⑧ 将试管安装在磁性台架上并放置 30 秒左右以使磁珠凝集。（此时，对这些磁珠进行数次颠倒混合并且尽可能多地回收粘在盖子上的磁珠。）
- ⑨ 去除上层清液。
- ⑩ 重复步骤⑥~⑨。
- (11) 添加 900 μ l 的 70% 乙醇溶液。
- (12) 使用旋涡混合器剧烈混合 5 秒钟。（此时，确认磁珠是否已被充分地分散以及混合。）
- (13) 将试管安装在磁性台架上并放置 30 秒左右以使磁珠凝集。（此时，对这些磁珠进行数次混合并且尽可能多地回收粘在盖子上的磁珠。）
- (14) 去除上清液。
- (15) 重复步骤(11)~(14)。（尽可能多地去除包括乙醇在内的任何残留在盖子上的物质。）

- (16) 添加 100 μ l TE 缓冲液。
- (17) 使用试管混合器剧烈混合 1 分钟。[DNA 的溶出]
- (18) 将试管安装在磁性台架上并放置 30 秒左右以使磁珠凝集。
- (19) 将含有 DNA 的上清液回收到一个未用过的 1.5ml 微型试管中。

5. 一般样品的分析

请按照以下注意事项进行操作。

[1] DNA 定量

- 当用吸收度检测法进行 DNA 定量测定时，请务必用离心机分离所回收的溶液（12,000 rpm，1 分钟）并使用上清液。
- 当计算 $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ 比例以及 DNA 浓度时，请务必用 $A_{320\text{nm}}$ 数值进行校正。

DNA 浓度	$(A_{260}-A_{320}) \times 50 \mu \text{g/ml}$
$A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$	$(A_{260}-A_{320}) / (A_{280}-A_{320})$

[2] 电泳

- 若将一部分回收液直接用于电泳，请将 Loading Dye 的量增加为通常的 1.5 到 2 倍，否则可能会发生样品无法沉入样品孔中，使得电泳失效。

[3] PCR

- 回收液中混有大约 10% 的乙醇溶液。如果直接用于 PCR，可能会阻碍反应的进行。因此，不要超过反应总液的五分之一（即：在每 50 μ l 的反应液中最多可有 10 μ l）。
- 可能会在所回收的溶液中混入了少量的磁珠。但这并不会阻碍 PCR。

6. 抽提实例

以下是使用 MFX-2000 从 0.1g 样品中进行抽提的实例。

样品	回收量
烟草（叶子）	3~5 μ g
烟草（培养细胞）	2~3 μ g
水稻植物（叶子）	3~5 μ g
<i>Arabidopsis thaliana</i> （叶子）	1 μ g
番茄（叶子）	3 μ g
卷心菜（叶子）	3 μ g
玉米（叶子）	3~4 μ g

- 回收量根据不同的样品类型以及条件而会有所变动。请以本书中所述的数值作为标准。

7. 疑难解答

产生错误时，请参照以下对策。

[1] 回收量低，无法得到 DNA

原因	对策
样品过剩	即使使用规定量以上的样品，也不会使回收量上升，反而会使效率下降。请减少样品量。另外，有的样品单位重量下体积可能会很大。如果无法浸没在溶解液中，则也请减少样品量。
破碎不充分	液氮下的冻结粉碎不充分是一个原因。进行充分的破碎处理直到它成为细粉末。并注意破碎时不要使样品解冻。
溶解不充分 (1) 氯仿抽提液为 250 μ l 左右的情况 (2) 氯仿抽提液低于 150 μ l 或者非常少的情况	可能是溶解液与样品之间混合不充分，或者样品本身难以溶解所致。将溶解液与样品进行充分混合，使用旋涡混合器振动 1 分钟后再进行抽提。(通常为 10 秒钟) 可能是样品内水份含量较少而吸收了部分溶解液。请添加溶解液至 350~400 μ l 并按照以上 (1) 的对策继续进行抽提，即可获得良好效果。
试剂量不足 (MFX 抽提)	确认试剂量是否不足或者检查残留物的数量。如果几乎没有任何残留物 (200 μ l 以下)，说明试剂量不足。
吸附，溶出不充分 (手动抽提)	使用手动法时，通过使用试管混合器搅动 1 分钟来使磁珠吸收 DNA 以及从磁珠中分离出 DNA。(参照第 9 页“5-[5] 手动抽提法”(3), (17))。各搅拌 10 分钟左右，则 DNA 回收量将会增加。

- 回收量可能视样品的类型以及储存条件而有所不同。

[2] 在氯仿抽提过程中无法良好分离

原因	对策
在添加了氯仿以及异戊醇之后的混合不充分	使用旋涡混合器时可能会无法达到充分的混合。可用手上下剧烈地摇动样品使其混合，然后用离心机进行分离。

[3] PCR 不能有效进行

原因	对策
回收液中混入的乙醇溶液产生了阻碍作用	如果使用超过反应液容积五分之一的量，则可能会抑制反应的发生。在这种情况下，减少所使用的溶液量。同样地，可以通过在 75℃ 下加热所回收的溶液 5 分钟来提高效果。

· 其他关于PCR的疑难解答，请参考本公司的各种PCR用酶的实例集或者其他PCR相关解说书等。

[4] 在洗净时，磁珠未完全散开（磁珠粘在 tip 上）

原因	对策
样品过剩	如果试剂量过多，磁珠可能会凝结。如果使用高于规定值的样品量，回收量不会增加，反而会有所下降。请减少样品量。
试剂量不足	确认试剂量是否不足或者检查残留物量。如果几乎没有任何残留物（200 μl 以下），则说明试剂量不足。洗净液如果不足会导致混合不充分并且磁珠不会完全散开。

[5] 磁珠未能很好地分装

原因	对策
由于磁珠的沉淀而导致凝固	使用旋涡混合器，使溶液混合直至均匀之后，该溶液可以被再次用于进行抽提。在开始抽提之前，使用旋涡混合器进行混合直至均匀，或者在开始之前（10 分钟之内），将磁珠放入一个 2ml 试管中。
由于蒸发而引起的混合液成分的浓缩以及结晶化	为了避免发生这种问题，请不要再使用残留在 2ml 试管中的磁珠。即使只是短时间内储存或者不使用，也要完全盖上瓶子或者试管的盖子。

· 关于仪器操作的疑难解答，在MFX-2000的使用说明书中另有说明，请加以参考。

[制造 • 销售商]

东洋纺（上海）生物科技有限公司

上海市浦东新区张杨路 188 号汤臣商务中心 C 座 310 室

邮编：200122

交货期限 • 订货相关咨询

Tel:021-5879-4900 Fax:021-5879-4901

E-Mail:sales@bio-toyobo.cn

产品内容 • 技术相关咨询

Tel:021-5879-4142 Fax:021-5879-5259

E-Mail:tech@bio-toyobo.cn

<http://www.bio-toyobo.cn>

代理商资料：