

AdeptTect 植物快速直接PCR预混液 (含染料) II

AdeptTect Plant Fast Direct PCR Master Mix (dye plus) II

Code No. AG12311

包装量:	120 rxns / 50 μ l
保存温度:	-20 $^{\circ}$ C

产品概述

本产品是专门针对植物叶片快速 PCR 反应而研制的预混型试剂, 简单裂解植物叶片即可获得模板进行 PCR 反应, 无需 DNA 纯化步骤; 同时具有较快的延伸速度, 最快可达 5 sec / kb, 适用于快速 PCR 反应, 极大地缩短实验时长、节约成本。

本产品的样本兼容性和耐受性强, 对水稻、棉花、拟南芥、大豆、烟草、土豆等叶片粗裂后产生的 PCR 抑制物具有超强耐受性。与此同时, 扩增效率高, 针对不同长度和不同 GC 含量的 DNA 序列均能有效扩增, 非常适用于高通量筛选、转基因检测及基因分型等。PCR 反应时, 只需向预混液中加入模板、引物和水即可进行扩增; 反应完毕后可直接进行琼脂糖凝胶电泳。

本产品可有效抑制引物二聚体的形成及非特异性扩增。扩增得到的产物 3' 端不含 A 碱基, 因此不可直接用于 TA 克隆。

保存及运输

保存温度: -20 $^{\circ}$ C 保存

运输温度: 干冰运输或 -20 $^{\circ}$ C 冰袋运输

产品组成

2X Plant Fast Direct PCR Master Mix (dye plus) II	500 μ l X 6 pcs
Plant Lysis Buffer	12 ml
Proteinase K (20 mg/ml)	120 μ l

实验操作

1. 样本的处理:

a) **纯化后的 DNA:** 加入 ≤ 500 ng 纯化后的 DNA 至 PCR 反应液中进行反应即可。

b) 植物样本简单裂解方法: (现配现用)

① 样本处理方法²: 取适量大小的植物叶片¹ 于离心管或研磨管中, 按以下三种方式对叶片进行处理:

a. 直接裂解: 向装有叶片的离心管中加入 100 μ l 的 Plant Lysis Buffer 浸没叶片即可进行下一步²;

b. 枪头或研磨杵 (推荐公司产品: Code No. AG21304): 向装有叶片的离心管中加入 100 μ l 的 Plant Lysis Buffer 浸没叶片, 用干净的 200 μ l 枪头或研磨杵将叶片样本完全捣碎 (溶液中观察不到碎叶即为完全捣碎);

c. 研磨珠 (推荐公司产品: Code No. AG21305): 向装有叶片的研磨管中加入 100 μ l³ 的 Plant Lysis Buffer 浸没叶片, 用研磨仪⁴ 将样本振荡磨碎。

② 向叶片与裂解 Buffer 混合溶液中加入 1 μ l Proteinase K 充分混匀, 60 $^{\circ}$ C 反应 5 min (若裂解效果不好, 可将裂解时间在 5~30 min 范围内调整)。

③ 12000 rpm 室温离心 2~5 min, 将不溶物离心至管底, 将上清液转移至新的离心管中, 若不小心将沉淀吸入, 可再次离心 2~5 min 或将溶液于冰上放置 10~20 min 后再取上清。

④ 98 $^{\circ}$ C⁵ 反应 2 min, 反应后将裂解样本放置于冰上或 4 $^{\circ}$ C 备用, 若当天不使用, 可保存于 -20 $^{\circ}$ C 或 -80 $^{\circ}$ C。

⑤ 上清液即可作为模板进行后续 PCR 反应, 按照表1模板推荐量添加 (50 μ l 体系)。

表1 简单裂解样本加入表

样本类型	推荐处理方式	叶片面积	粗裂模板添加量
水稻	直接裂解或研磨后裂解	4-50 mm ²	2-5μl
棉花	直接裂解	4-25 mm ²	2-5μl
拟南芥	研磨后裂解	25-50 mm ²	2-5μl
大豆	研磨后裂解	25-100 mm ²	2-5μl
烟草	研磨后裂解	25-100 mm ²	2-5μl
土豆	研磨后裂解	25-100 mm ²	2-5μl

- *1: 可参考表 1 推荐的叶片大小剪取叶片样本, 也可根据实验结果适当在此范围外增大或减小裂解的叶片面积。
- *2: 对于需要研磨处理的样本, 应保证研磨时叶片完全浸没在裂解液中, 同时为得到较好的裂解效果尽量将叶片磨碎。
- *3: 若出现研磨不充分的情况, 可适当增加 Plant Lysis Buffer 的添加量至 200 ~ 500 μl。
- *4: 研磨仪的振荡频率建议 70 Hz 处理 5 min, 若研磨管出现破碎情况, 可尝试降低振荡频率, 延长振荡时间, 例如 40 Hz 处理 10 min。
- *5: 98°C 反应温度过高, 可将上清液转移至 0.2 ml 管中, 于 PCR 仪中加热反应。

2. PCR 反应¹ (50 μl 反应体系)

组分名称	反应终浓度	加入量
2X Plant Fast Direct PCR Master Mix (dye plus) II ²	1X	25 μl
Template	-	≤ 5 μl ³
Primer F (10 μM)	0.2 μM ⁴	1 μl
Primer R (10 μM)	0.2 μM ⁴	1 μl
RNase free water	-	Up to 50 μl

详细信息请查阅 www.agbio.com.cn

本产品仅供科学研究使用, 不能用于人、动物的医疗或诊断程序, 不能使用本产品作为食品、化妆品或家庭用品等。

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures for humans or animals. Also, do not use this product as food, cosmetic, or household item, etc.

- *1: 为了获得更好的扩增特异性, 建议在冰上配制反应液。
- *2: 该溶液应避免反复冻融, 防止降低酶活性; 首次使用时, 短暂离心将所有的溶液收集至离心管底部后使用, 减少损失; 使用时应轻柔混匀 (避免起泡), 缓慢吸取。
- *3: 使用纯化的 DNA 模板, 一般推荐 ≤ 500 ng; 简单裂解后的模板推荐用量参考表 1, 具体可根据实验结果调整 (2-5 μl), 模板添加量不宜超过体系的 15%; 若减少反应总体积, 则相应减少模板添加量, 例如 20 μl 扩增体系添加的粗裂模板量可尝试 0.5-2 μl。
- *4: 引物通常使用终浓度为 0.2 μM, 可根据实验结果在 0.1- 0.4 μM 范围内调整。

反应条件 (以三步法 PCR 扩增为例⁶)

步骤	温度	时间	循环数
预变性 ¹	98°C	2 min	1
变性 ²	98°C	10 sec	} 30-35 ⁵
退火 ³	55°C	30 sec	
延伸 ⁴	68°C	20 sec / kb	

- *1: 若模板为简单裂解产物, 一般可将预变性设置为 98°C 2 min (在 1 ~ 5 min 范围内调整); 若扩增纯化后 DNA 模板, 根据不同的目的片段, 可省略预变性步骤。
- *2: 变性条件的设定可根据设备进行调整, 一般 94°C 10-15 sec, 98°C 5-10 sec。
- *3: 退火温度主要取决于上下游引物的 T_m 值, 通常可按照 T_m ± 5°C 设定, 对于特异性较差的引物或 GC 含量较高的片段可适当调高 T_m 值 (推荐 60°C), 或缩短退火时间 (推荐 5 sec)。
- *4: 扩增正常 GC 含量的片段建议延伸速度为 20 sec / kb; 为节省扩增时间, 对于 3kb 以内简单的短片段, 延伸速度可在 5 ~ 20 sec / kb 进行调整, 若片段过长或复杂而导致扩增效果不好, 可尝试将延伸速度延长至 30 ~ 60 sec / kb。
- *5: 一般推荐使用 35 个循环进行扩增, 若扩增特异性不好, 可尝试降低循环数。
- *6: 当引物 T_m 值较高或三步法 PCR 扩增结果不好, 可尝试两步法 PCR 扩增。

➤ 结果检测

反应结束后, 取适量反应产物进行琼脂糖凝胶电泳检测。