

六、疑难解答 (Trouble shooting)

出现的问题	可能的原因	建议解决方法
DNA产量低	处理材料过量或者裂解不完全	使用适量的起始材料，充分研磨或者匀浆
RNA 残留	植物含量 RNA 太丰富	在步骤 3 后裂解物中加 4 μ l RNase, 也可以多加到 8 μ l RNase。
未提取到 DNA	漂洗液 WB 中忘记加无水乙醇	第一次实验时，在漂洗液 WB 中加入指定量无水乙醇。
洗脱下来的 DNA 溶液带颜色或者膜上有明显的色素残留	漂洗次数不够	步骤 7 完成后，加 500 μ l WB 或无水乙醇再漂洗一遍
	起始材料太多过量	减少起始处理材料，不要过量
洗脱下来的 DNA 产量低	离心柱残留有较多乙醇或者底部不慎重沾有乙醇	确保做了步骤 10，否则残留乙醇会影响洗脱效率。
	使用了水或者其他非最佳液体代替洗脱缓冲液	仔细阅读步骤 10 和只使用洗脱缓冲液 EB 洗脱。
A ₂₆₀ 吸光值异常偏高	一些硅基质膜成分一起洗脱下来，干扰了吸光值	将洗脱的基因组 DNA 溶液 13, 000rpm 再离心一分钟，小心取上清使用。
DNA 下游酶切不能切开或者酶切不完全	一些硅基质膜成分一起洗脱下来，抑制了酶切反应	将洗脱的基因组 DNA 溶液 13, 000rpm 再离心一分钟，小心取上清使用。
	离心柱残留有较多乙醇或者底部不慎沾有乙醇抑制了酶切反应	确保做了步骤 10，然后空气中晾几分钟，让残留乙醇挥发。

二、原理简介

针对多糖、多酚的去除成份，迅速裂解细胞和灭活细胞内核酸酶，不需要氯仿抽提，彻底清除多糖、多酚和蛋白质，基因组 DNA 在高离子盐状态下选择性吸附于离心柱内硅基质膜，再通过一系列快速的漂洗—离心步骤，进一步将多糖，多酚和细胞代谢物，蛋白等杂质去除，最后低盐的洗脱缓冲液将基因组 DNA 从硅基质膜上洗脱。

三、试剂盒特点

1. 离心吸附柱内硅基质膜全部采用进口特制吸附膜，柱与柱之间吸附量差异极小，可重复性好。克服了国产试剂盒膜质量不稳定的弊端。
2. 不需要使用有毒的苯酚，氯仿等试剂。
3. 快速，简捷，单个样品操作一般可在 1 小时内完成。
4. 数种去多糖、多酚成份和多次柱漂洗确保高纯度，OD260/OD280 典型的比值达 1.7~1.9，长度可达 30Kb-50kb，可直接用于 PCR，Southern-blot 和各种酶切反应。

四、注意事项 (实验前必须首先阅读这部分!)

1. **所有的离心步骤均在室温完成**，使用转速可以达到 13, 000 rpm 的传统台式离心机，如 Eppendorf 5415C 或者类似离心机。
2. 开始实验前将需要水浴的物品先预热到 65℃ 备用。
3. Buffer P3 中含有刺激性化合物，操作时要戴乳胶手套，**避免沾染皮肤，眼睛和衣服。若沾染皮肤、眼睛时，要用大量清水或者生理盐水冲洗。**
4. 不同来源的植物组织材料中提取的 DNA 的量会有差异，一般 100mg 新鲜组织典型产量可达 3-25 μ g。
5. **洗脱液 EB 不含有螯合剂 EDTA**，不影响下游酶切、连接等反应。

也可以使用水洗脱，但应该确保 PH 大于 7.5, PH 过低影响洗脱效率。用水洗脱 DNA 应该保存在-20℃。DNA 如果需要长期保存，可以用 TE 缓冲液洗脱（10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, PH 8.0），但是 EDTA 可能影响下游酶切反应，使用时可以适当稀释。

五、操作步骤

* 第一次使用前请先在 15ml 漂洗液 WB 中加入 60ml 无水乙醇!

* 将 Buffer FP1 放置在 65℃ 预热, 使用前加入 β -巯基乙醇到终浓度 0.2%。

1. 加热 Buffer FP1 到 65℃ 预热。
2. 取适量样本在研钵中加入液氮充分碾磨成细粉。
3. 转移细粉（植物新鲜组织 100 mg 或干重组织 30 mg）到一个 1.5ml 离心管，不要解冻，加入 550 μ l 65℃ 预热 Buffer FP1 和 4 μ l RNase A 剧烈涡旋振荡混匀 1 分钟，65℃ 水浴 30 分钟.期间激烈涡旋震荡 3 次。
4. 加入 130 μ l 的 Buffer P2,充分混匀，12000rpm 离心 3 分钟。
5. 小心吸取上清到一个分离柱 A，注意不要吸到界面物质，12,000 rpm 离心 1 分钟，收集下液。
6. 加入 1.5 倍体积的 Buffer P3 立刻轻柔涡旋，充分混匀。
7. 将上一步所得混合物（包括可能出现的沉淀）加入一个吸附柱 AC 中，（吸附柱放入收集管中）12,000 rpm 离心 1 分钟，倒掉收集管中的废液。
8. 加入 700 μ l 漂洗液 WB（请先检查是否已加入无水乙醇!），12,000 rpm 离心 1 分钟，弃掉废液。
9. 加入 500 μ l 漂洗液 WB，12,000 rpm 离心 1 分钟，弃掉废液。
10. 将吸附柱 AC 放回空收集管中，13,000 rpm 离心 3-5 分钟，尽量除

去漂洗液，以免漂洗液中残留乙醇抑制下游反应。

11. 取出吸附柱 AC，放入一个干净的离心管中，在**吸附膜的中间部位**加 50 μ l 洗脱缓冲液 EB（洗脱缓冲液事先在 65-70℃ 水浴中预热），室温放置 3-5 分钟，12,000 rpm 离心 1 分钟收集 DNA。

洗脱体积越大，洗脱效率越高，可以 50 μ l 分两次洗脱，可以提高洗脱效率。

12. DNA 可以存放在 2-8℃，如果要长时间存放，可以放置在-20℃。