

For research use only

Version Number: 1.1

## Plant Leaf Direct PCR Plus Kit - UNG

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

试剂盒组成 (50 µL 裂解体系 + 20 µL PCR 体系)		TP-02141	TP-02143
Part I	Buffer PS1	8 mL	80 mL
	Buffer P2	10 mL	100 mL
	6x DNA Loading Buffer	1.5 mL	6 mL
Part II	Buffer PS2	2 mL	20 mL
	2x Leaf PCR Easy™ Mix(UNG)	1 mL x 2	1.7 mL x 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高的植物(如：棉花、香蕉等)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。

2x 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、MgCl<sub>2</sub>、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。

2x Leaf PCR Easy™ Mix(UNG)在 2x 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 2x Leaf PCR Easy™ Mix(UNG)，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高的植物样本，多糖多酚含量低的样本请选择多糖多酚植物叶片直接 PCR 试剂盒(Plant Leaf Direct PCR 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 PS1 有沉淀析出，可放置于 37°C 待沉淀消失，并摇匀溶液后使用。
- ❖ 2x Leaf PCR Easy™ Mix(UNG)应避免反复冻融，否则会影响 PCR 效率。
- ❖ 如果环境温度过高，2x Leaf PCR Easy™ Mix(UNG)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

### A: 样本释放

- 将 50  $\mu\text{L}$  裂解液(40  $\mu\text{L}$  Buffer PS1 + 10  $\mu\text{L}$  Buffer PS2)加入 200  $\mu\text{L}$  或 1.5 mL 离心管中。  
注意: 由 Buffer PS1 和 Buffer PS2 配制成的裂解液最好现配现用; 若需短时间保存, 可以将混合液置于 4°C 保存, 保存时间不宜超过 6 h。
- 剪取 3-5 mg 叶片组织(直径 5-7 mm)到含有上述裂解液的离心管中, 确保裂解液能够完全浸没叶片组织。  
注意: 切勿加入过量叶片组织。
- 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: 若材料多酚含量非常高(裂解 10 min, 裂解液颜色呈棕黄色或棕红色), 可以缩短裂解时间至 5 min。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  $\mu\text{L}$  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 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 5-10% 之间最佳, 不宜超过 20%(如 20  $\mu\text{L}$  的 PCR 体系中, 加入 1-2  $\mu\text{L}$  裂解液即可, 不宜超过 4  $\mu\text{L}$ )。
- 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 $\mu\text{L}$	25 $\mu\text{L}$	1 $\times$
Forward Primer(10 $\mu\text{M}$ )	0.5 $\mu\text{L}$	1 $\mu\text{L}$	0.2-0.25 $\mu\text{M}$ 1*
Reverse Primer(10 $\mu\text{M}$ )	0.5 $\mu\text{L}$	1 $\mu\text{L}$	0.2-0.25 $\mu\text{M}$ 1*
叶片组织或裂解混合液(DNA模板) 2*	X $\mu\text{L}$	X $\mu\text{L}$	
ddH <sub>2</sub> O(灭菌蒸馏水)	(9-X) $\mu\text{L}$	(23-X) $\mu\text{L}$	
Total Volume	20 $\mu\text{L}$	50 $\mu\text{L}$	

1\*: 通常引物终浓度为 0.2-0.25  $\mu\text{M}$  可以得到较好结果。反应性能较差时, 可以在 0.1-0.5  $\mu\text{M}$  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<sub>M</sub> 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各异。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)

