

Version: AF 4.0 (2024.02.20修订)

# Spark Plant Direct PCR Kit

目录号: AF1301

## 01/产品组分

序号	组分	AF1301-A	AF1301-B
		50rxn(50µL/rxn)	200rxn(50µL/rxn)
1	2×Spark Plant Direct Master Mix	1.25 mL	1.25 mL×4
2	Spark Plant Direct Lysis Buffer A	5 mL	20 mL
3	Spark Plant Direct Lysis Buffer B	5 mL	20 mL

## 02/保存条件

2×Spark Plant Direct Master Mix于-20°C保存, Spark Plant Direct Lysis Buffer A/B可于-20°C或2-8°C保存。

## 03/产品概述

本产品适用于对植物叶片、种子等进行直接扩增,可用于非多糖、多酚类植物样品高通量筛选。经过定向进化改造的直扩 DNA 聚合酶,对植物中的 PCR 抑制物具有极强的耐受性,同时保持了极高的扩增性能,适用于 5 kb 以内 DNA 片段的扩增。试剂盒中独特的裂解缓冲液 A 可用于裂解新鲜或冻存的植物组织,操作简单,所得裂解物无需纯化即可作为扩增模板。裂解液中加入的保护剂使得粗品多次冻融后仍可有效扩增。预先配置的 2×Plant Direct Master Mix 只需加入引物和模板即可进行扩增反应,减少了移液操作,提高了检测通量和结果的重现性。扩增产物为平末端。

## 04/操作步骤

### 样品处理

#### ◆植物叶片

- 直接法: 推荐使用幼嫩叶片。为了获得小而统一的样品,推荐使用固定直径 0.5-3 mm 的打孔器打取样本,并将所取的样本直接加入到 PCR 反应体系中(推荐使用 50 µL 体系)。请确保样品处于 PCR 溶液中,而非贴在管壁上。如果用直接 PCR 法

进行长片段和复杂样本的扩增，取直径较小（0.5-1 mm）的样本作模板有助于获得更好的结果。

▲取样时也可使用剪刀或其他工具剪取适宜大小的样本，如果打孔器剪刀重复使用，应在每次使用前用 2% 的次氯酸钠溶液清洁，防止样品之间交叉污染。

- **研磨裂解法：**推荐使用幼嫩叶片。取一小块叶片（直径约 1-3 mm），将其置于 20 μL Plant Direct Lysis Buffer A 中，并将其尽量磨碎（此步骤可使用 100 μL 枪头挤压叶片以捣碎样本）。如果叶片组织的使用量较大（请勿超过 7 mm），请将稀释缓冲液的体积增加至 50 μL。叶片捣碎后，溶液呈现绿色。短暂离心后，取 1 μL 上清加入 PCR 反应体系中作为反应模板。
- **加热裂解法：**推荐使用幼嫩叶片。取一小块叶片（直径约 1-3 mm），将其置于 20 μL Plant Direct Lysis Buffer A 中，95°C 加热 5-10 min，针对较难裂解的叶片可适当延长裂解时间（不超过 20 min）。如果叶片组织的使用量较大（请勿超过 7 mm），请将裂解缓冲液的体积增加至 50 μL。加热结束后短暂离心，取 1 μL 上清加入 PCR 反应体系中作为反应模板。

▲使用前须确保 Plant Direct Lysis Buffer 已充分溶化，如果溶液粘稠或有沉淀，可于 37°C 加热使其完全溶化后再使用。

▲根据植物材料和所加稀释液体积的不同，可适当调整反应体系中的模板体积。

#### ◆ 植物种子

- **研磨裂解法：**使用解剖刀切取直径约 5 mm 大小的种子，将其加入到 100 μL Plant Direct Lysis Buffer A 中，用枪头或其他方式磨碎样本。短暂涡旋震荡后于室温放置 3-5 min，确保种子样本浸没在稀释缓冲液中。短暂离心后，取 1 μL 上清加入 PCR 反应体系中作为反应模板。
- **加热裂解法：**用解剖刀切取直径约 5 mm 大小的种子，将其加入到 100 μL Plant Direct Lysis Buffer A 中，95°C 加热 5-10 min，针对较难裂解的样本可适当延长裂解时间（不超过 30 min），加热结束后短暂离心，取 1 μL 上清加入 PCR 反应体系中作为反应模板。

▲取样时也可使用剪刀或其他工具剪取适宜大小的样本，如果打孔器剪刀重复使用，应在每次使用前用 2% 的次氯酸钠溶液清洁，防止样品之间交叉污染。

▲使用前须确保 Plant Direct Lysis Buffer 已充分溶化，如果溶液粘稠或有沉淀，可于 37°C 加热使其完全溶化后再使用。

▲根据植物材料和所加稀释液体积的不同，可适当调整反应体系中的模板体积。

## 05/实验流程

### 反应体系

操作在冰上进行，各组分解冻后请充分混匀后使用，用完后请及时放回 -20°C 保存。反应体系不同，可按此比例增加或减少产品用量。

Components	Volume	Volume
2×Plant Direct Master Mix	10 μL	25 μL
Primer 1 (10 μM)	0.8 μL	2 μL
Primer 2 (10 μM)	0.8 μL	2 μL
植物叶片/粗提样本	0.5-3 mm 叶圆片/x μL	0.5-3 mm 叶圆片/x μL
ddH <sub>2</sub> O	up to 20 μL	up to 50 μL

- ▲ 2× Plant Direct Master Mix 包含终浓度为 2 mM 的 Mg<sup>2+</sup>。
- ▲ 推荐每条引物终浓度为 0.4 μM，引物使用量过多会导致非特异性扩增增加。
- ▲ 粗品使用量可根据实际情况调整，建议在反应总体积的 2% - 20%之间调整，使用过多易导致扩增失败。

## 反应程序

98°C:	5 min	} 35 cycles
95°C:	10 sec	
58-72°C:	15 sec	
72°C:	30-60 sec/kb	
72°C:	5 min	

- ▲ 预变性 (98°C, 5 min) 可促进植物组织裂解，释放用于 PCR 扩增的基因组 DNA。请勿缩短时间或降低温度。
- ▲ 退火温度一般设置成等于引物 T<sub>m</sub> 值或高于 T<sub>m</sub> 值 2-4°C。本产品中使用的直扩 DNA 聚合酶不同于普通 Taq 酶，对反应退火温度有特殊要求，使用高的退火温度可以有效减少非特异性扩增，提高扩增效率。对于复杂模板，可进行退火温度梯度 PCR 寻找引物与模板结合的最佳退火温度并延长延伸时间来实现高效扩增。
- ▲ 若扩增产物长度 ≤ 1 kb，延伸时间按 30 sec/kb 设定；若扩增产物长度 > 1 kb，延伸时间按 40-60 sec/kb 设定。
- ▲ 对于复杂样本或扩增产量较低的样品可适当提高循环数至 40-50 个循环。

## 06/结果检测

反应结束后取 5 μL 反应产物，在适合浓度的琼脂糖凝胶上进行电泳检测。如果 PCR 产品中含染料，那扩增后的产物不需加上样缓冲液，可直接上样进行电泳。

## 07/注意事项

- ◇ Plant Direct Lysis Buffer B 为赠送可选试剂，用于中和 Plant Direct Lysis Buffer A，延长样本保存时间，可根据情况选择使用。
- 使用方法为：样品处理后，短暂离心转移上清，在上清中加入等体积附赠的 Plant Direct Lysis Buffer B，混匀后置于 -20°C 保存。

## 08/相关产品

- AA0102 SPARKeasy 植物基因组 DNA 快速提取试剂盒（多糖多酚型、小量）
- AA0103 SPARKeasy 植物基因组 DNA 快速提取试剂盒（小量）
- AJ0101 Spark 2000 DNA Marker
- AJ0210 Sparkred
- AJ0208 Spark GoldView
- AC0101 SparkZol Reagent
- AC0305 SPARKeasy 新型植物 RNA 快速提取试剂盒
- AC1709 RNase-Free and DNase-Free 纯水

本产品仅用于科学研究！

Tel: 0531-82387577

Web: <http://www.sparkjade.com>

Support: [support@sparkjade.com](mailto:support@sparkjade.com)

