



Plant Leaf Direct PCR Kit-UNG

Cat.No.TP-0212T/02121/02122/02123

For plant leaves containing high polysaccharide and polyphenol components

For performing PCR directly from plant leaves without prior DNA purification

For research use only



目 录

产品介绍	3
产品特点	4
试剂盒应用	4
试剂盒局限性	4
产品质量控制	4
试剂盒内容	5
储存条件	5
试剂盒组分信息	6
直接 PCR 实例电泳图	6
注意事项	7
操作前准备事项	8
实验材料和设备	8
安全性	8
操作指南	9
● 直接法	10
● 裂解法	11
对照反应	13
操作示意图	14
问题分析指南	15

产品介绍

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低植物(如：水稻、小麦、烟草、玉米、大豆、油菜等)的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，叶片无需研磨或剪碎处理，因此特别适合大规模基因检测。

裂解缓冲液释放基因组 DNA 过程可以在 5-10min 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。

2x Leaf PCR Easy™ Mix 具有很强的 PCR 反应抑制物耐受性，能直接以植物材料的裂解产物为模板，进行高效特异性扩增。该试剂包含公司专门针对直接 PCR 反应改造的 D-Taq DNA Polymerase、dNTPs、MgCl₂、反应缓冲液、PCR 反应增强剂、优化剂和稳定剂。与直接裂解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 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(racil-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。

D-Taq DNA polymerase 是为直接 PCR 反应专门研制出的 DNA polymerase。D-Taq DNA polymerase 对多种 PCR 反应抑制剂具有极强的耐受性、在各种复杂反应体系中均能高效扩增痕量的 DNA，扩增速度可达 2Kb/min，特别适合进行直接 PCR 反应。

根据植物样本差异，该产品分为两个大类：植物直接 PCR 试剂盒(Plant Leaf Direct PCR Kit)和多糖多酚植物直接 PCR 试剂盒(Plant Leaf Direct PCR Plus Kit)；在 PCR 检测阶段，可以根据实验需求，选用普通的 2x Leaf PCR Easy™ Mix 或是具有防 PCR 扩增产物污染作用的 2x Leaf PCR Easy™ Mix(UNG)。

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 2mm(1mg)的叶片即可进行实验。
- ◆ 无需研磨、破碎叶片等特殊处理，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 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。

试剂盒应用

- ◆ 适用范围：多种植物叶片。
- ◆ 样本裂解释放的 DNA：仅用作 PCR 模板。
- ◆ 试剂盒可用于以下用途：转基因植株鉴定、植物基因分型等。

试剂盒局限性

- ◆ 扩增片段 $\leq 1\text{kb}$ ；超过 1kb，扩增效率下降或者扩增失败。
- ◆ PCR 产物如用于测序建议先进行 PCR 产物纯化。
- ◆ PCR 产物可能会有点突变，如用于基因克隆，请知悉。
- ◆ UNG 防 PCR 产物污染体系得到的 PCR 产物请勿用于基因克隆或测序。
- ◆ PCR 产物 3'末端随机加 A 尾。

产品质量控制

按照福际生物试剂盒质量检测体系标准(FOREGENE's Total Quality Management System)，每一批次的植物叶片直接 PCR 系列试剂盒都严格进行多次测试，确保每一批次试剂盒质量的可靠性和稳定性。

试剂盒内容

Plant Leaf Direct PCR Kit-UNG 植物叶片直接 PCR 试剂盒-UNG					
试剂盒组成		TP-0212T	TP-02121	TP-02122	TP-02123
		50 次	200 次	500 次	2000 次
Part I	Buffer P1	3ml	10ml	25ml	100ml
	Buffer P2	3ml	10ml	25ml	100ml
	6x DNA Loading Buffer	1.5ml	1.5ml	1.5ml	1.5ml×4
Part II	2x Leaf PCR Easy™ Mix(UNG)	500µl	1ml×2	1.7ml×3	1.7ml×12
说明书		1 份	1 份	1 份	1 份

储存条件

1. 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。

2. 保存条件

本试剂盒 Part I 保存在常温或 2-8°C。

- ❖ 试剂为 Buffer P1、Buffer P2、6x DNA Loading Buffer。试剂在干燥条件下，可保存 12 个月；如需保存更长时间可置于 2-8°C。

注意：若低温保存，Buffer P1 溶液容易产生沉淀。在使用前务必将试剂盒内的溶液在室温中放置一段时间，必要时可在 37°C 水浴中预热 10min，待沉淀消失，并摇匀溶液后再使用。

本试剂盒 Part II 保存在 -20°C。

- ❖ 试剂为 2x Leaf PCR Easy™ Mix，若频繁使用，也可置于 4°C 短期保存(限 10 天内用完)。

试剂盒组分信息

- ◆ Buffer P1: 提供植物叶片裂解反应所需的环境。
- ◆ Buffer P2: 中和裂解产物, 使其不影响后续 PCR 反应。
- ◆ 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, 从而能够有效防止 PCR 扩增产物污染。包含福际生物特别改造的 D-Taq DNA Polymerase、UDG、dNTPs、MgCl₂、反应缓冲液、PCR 反应增强剂、优化剂以及稳定剂等。PCR 反应时, 只需将适当的裂解混合液、引物、ddH₂O 添加到 2x Leaf PCR Easy™ Mix(UNG)中即可用于 PCR 反应。
- ◆ 6x DNA Loading Buffer: 该 Loading Buffer 中不含有 SDS。建议在进行琼脂糖凝胶电泳时, 配搭使用试剂盒附赠的 6x DNA Loading Buffer, 以便取得好的电泳结果。切勿使用含有 SDS 的 Loading Buffer, 否则在电泳时会在泳道中有一大团拖尾亮光, 影响实验结果。

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低的植物样本, 多糖多酚含量高的样本请选择多糖多酚植物叶片直接 PCR 试剂盒(Plant Leaf Direct PCR Plus 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 P1 有沉淀析出, 可放置于 37°C 待沉淀消失, 并混匀溶液后再使用。
- ◆ 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 1-2min, 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。

操作前准备事项

使用本试剂盒前，请务必仔细阅读说明书。植物叶片直接 PCR 系列试剂盒操作简单、方便、快速，说明书提供了整个试剂盒的完整信息和正确使用方法。请在使用前准备好必要的实验材料和设备。

实验材料和设备

- ◆ 各种来源的多糖多酚含量低的植物叶片(新鲜的、冷冻保存的)。
- ◆ 1.5ml 或 2ml 无菌离心管、0.2ml 无菌 PCR 管。
- ◆ 台式离心机($\geq 13,400\times g$)、PCR 仪、95°C 水浴或金属浴、移液器等。

安全性

- ◆ 本产品仅供科研使用，请勿用于医药、临床医学、食品及化妆品等用途。
- ◆ 使用化学品时，穿戴合适的实验服，手套，防护眼镜等。
- ◆ Buffer P1 含 SDS：刺激性、致敏性。
- ◆ Buffer P1 含 NaOH：刺激性、致敏性。

操作指南

本试剂盒提供了两种实验方法，直接法和裂解法。根据自己实验的需要按相应的实验操作步骤进行即可。

材料取用说明

- ❖ 直接法:可使用打孔器(或剪刀)剪取直径 2-3mm 叶片组织置于 PCR 反应体系即可。若选用成熟的叶片，请避免使用叶片主脉部位组织。
- ❖ 裂解法:可使用打孔器(或剪刀)剪取直径 5-7mm 叶片组织置于裂解液中裂解。若选用成熟的叶片，请避免使用叶片主脉部位组织。

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)

预防样本间交叉污染

为了避免样本间交叉污染，每次取样后都需要将取样器材的刃口或与样本直接接触的部位浸入 2%次氯酸钠溶液中，反复洗刷数次进行清洗，然后用干净的纸巾擦干残余液体后再进行使用。为了试验方便，也可准备多个取样器材，在使用完后进行统一清洗，确保每一单独样本均使用的是无污染取样器材。

植物叶片直接 PCR 操作步骤

针对多糖多酚含量低的植物叶片，如：小麦叶片、水稻叶片、玉米叶片等。试剂盒根据不同实验需要，提供了两种操作方法。直接法仅需要将一小片植物组织直接加入 PCR 反应体系即可；裂解法则是将少量含有植物组织的裂解产物加入 PCR 反应体系。其中裂解法适合目的片段较长，扩增难度较大，以及需要以同一样本进行多次 PCR 扩增的实验。

一、直接法 (仅限多糖多酚含量低的植物叶片样本)

1. 在 200 μ l PCR 管内加入 2 \times Leaf PCR EasyTM Mix(UNG)，再添加对应的引物，并用 ddH₂O 使其稀释为 1 \times (PCR 体系配制见下表 1)。
2. 剪取 1-2mg 叶片碎块(直径 2-3mm)加入上述配制的 PCR 体系中。
注意：确保叶片碎块完全被 PCR 反应液浸没，切勿加入过量叶片组织。
3. 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)。
注意：尽量使用优化后的条件进行 PCR 反应，可以得到更好的结果。
4. 琼脂糖凝胶电泳检测结果。
注意：建议使用随试剂盒配送的 6 \times DNA Loading Buffer，切勿使用含有 SDS 的 Loading Buffer 进行电泳。

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 TM Mix(UNG)	10 μ l	25 μ l	1 \times
Forward Primer (10 μ M)	0.5 μ l	1 μ l	0.2-0.25 μ M *
Reverse Primer (10 μ M)	0.5 μ l	1 μ l	0.2-0.25 μ M *
叶片组织(DNA模板)	1-2mg (直径2-3mm)	2-3mg (直径3-3.5mm)	
ddH ₂ O (灭菌蒸馏水)	9 μ l	23 μ l	
Total Volume	20 μ l	50 μ l	

*: 通常引物终浓度为0.2 μ M可以得到较好结果。反应性能较差时，可以在0.1-0.5 μ M范围内调整引物浓度。

注意：此体系配制仅作参考，实验室可根据 PCR 体系大小，调整叶片组织的用量，切勿加入过量叶片组织。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

步骤	温度	时间	循环数	内容
1	37°C	5min	1	UNG酶处理
2	94°C	5min	1	灭活UNG酶&预变性
3	94°C	10sec	35-40	变性
4	55-65°C ^{1*}	20sec		引物退火
5	72°C	x min (2kb/min) ^{2*}		延伸
6	72°C	5min	1	终延伸

1*: 2x 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 TM 值高 2°C。

2*: 1kb 以内的 DNA 片段, 建议延伸时间为 30sec。

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。

二、裂解法

A: 样本 DNA 释放

1. 剪取 3-5mg 叶片组织(直径 5-7mm)到 200µl 或 1.5ml 离心管中。

注意: 切勿加入过量叶片组织。

2. 加入 50µl Buffer P1, 确保裂解液能够完全浸没叶片组织。

3. 盖好离心管盖, 将其置于 PCR 仪或金属浴中, 95°C 裂解 10min。

注意: 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。

4. 加入 50µl Buffer P2, 用微量移液器吹打或者涡旋混匀。

5. 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

1. 在 PCR 管内加入 2x Leaf PCR Easy™ Mix(UNG)以及特异引物待用。

2. 取适量的 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 3)。

注意：模板量占 PCR 体系的 10-20%之间最佳，不宜超过 30%(如 20 μ l 的 PCR 体系中，加入 2-4 μ l 裂解液即可，不宜超过 6 μ l)。

3. 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 4)。

注意：尽量使用优化的 PCR 条件进行 PCR 反应，可以得到更好的结果。

4. 琼脂糖凝胶电泳检测结果。

注意：建议使用随试剂盒配送的 6 \times DNA Loading Buffer，切勿使用含有 SDS 的 Loading Buffer 进行电泳。

表 3: 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 μ l	25 μ l	1 \times
Forward Primer (10 μ M)	0.5 μ l	1 μ l	0.2-0.25 μ M ^{1*}
Reverse Primer (10 μ M)	0.5 μ l	1 μ l	0.2-0.25 μ M ^{1*}
裂解混合液(DNA模板) ^{2*}	X μ l	X μ l	
ddH ₂ O(灭菌蒸馏水)	(9-X) μ l	(23-X) μ l	
Total Volume	20 μ l	50 μ l	

1*：通常引物终浓度为0.2-0.25 μ M可以得到较好结果。反应性能较差时，可以在0.1-0.5 μ 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 4: 反应条件

步骤	温度	时间	循环数	内容
1	37°C	5min	1	UNG酶处理
2	94°C	5min	1	灭活UNG酶&预变性
3	94°C	10sec	35-40	变性
4	55-65°C ^{1*}	20sec		引物退火
5	72°C	x min (2kb/min) ^{2*}		延伸
6	72°C	5min	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 TM 值高 2°C。

2*: 1kb 以内的 DNA 片段，建议延伸时间为 30sec。

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。

PCR 对照反应

在PCR结果分析时，不管是阳性结果或阴性结果，如果没有对照反应，我们都不能确定结果是否可靠。为了便于后续实验结果的分析，我们建议在进行PCR时，设置阳性和阴性PCR对照反应以便于排除假阳性或假阴性的干扰。

A: 阳性对照

选用容易扩增的样本保守基因的引物和采用纯化的样本DNA作为模板进行阳性对照反应以确定PCR反应体系和条件的正确性以及2× Leaf PCR Easy™ Mix(UNG)有效性。其反应体系的配制见下表5。

表 5: 对照 PCR 反应体系配制

PCR 体系添加内容	用 量		终 浓 度
2× Leaf PCR Easy™ Mix(UNG)	10μl	25ul	1×
Forward Primer (10μM) ^{1*}	0.5μl	1μl	0.2-0.25μM
Reverse Primer (10μM) ^{1*}	0.5μl	1μl	0.2-0.25μM
DNA模板 ^{2*}	xμl	xμl	100-200ng
ddH ₂ O (灭菌蒸馏水)	(9-x)μl	(23-x)μl	
Total Volume	20μl	50μl	

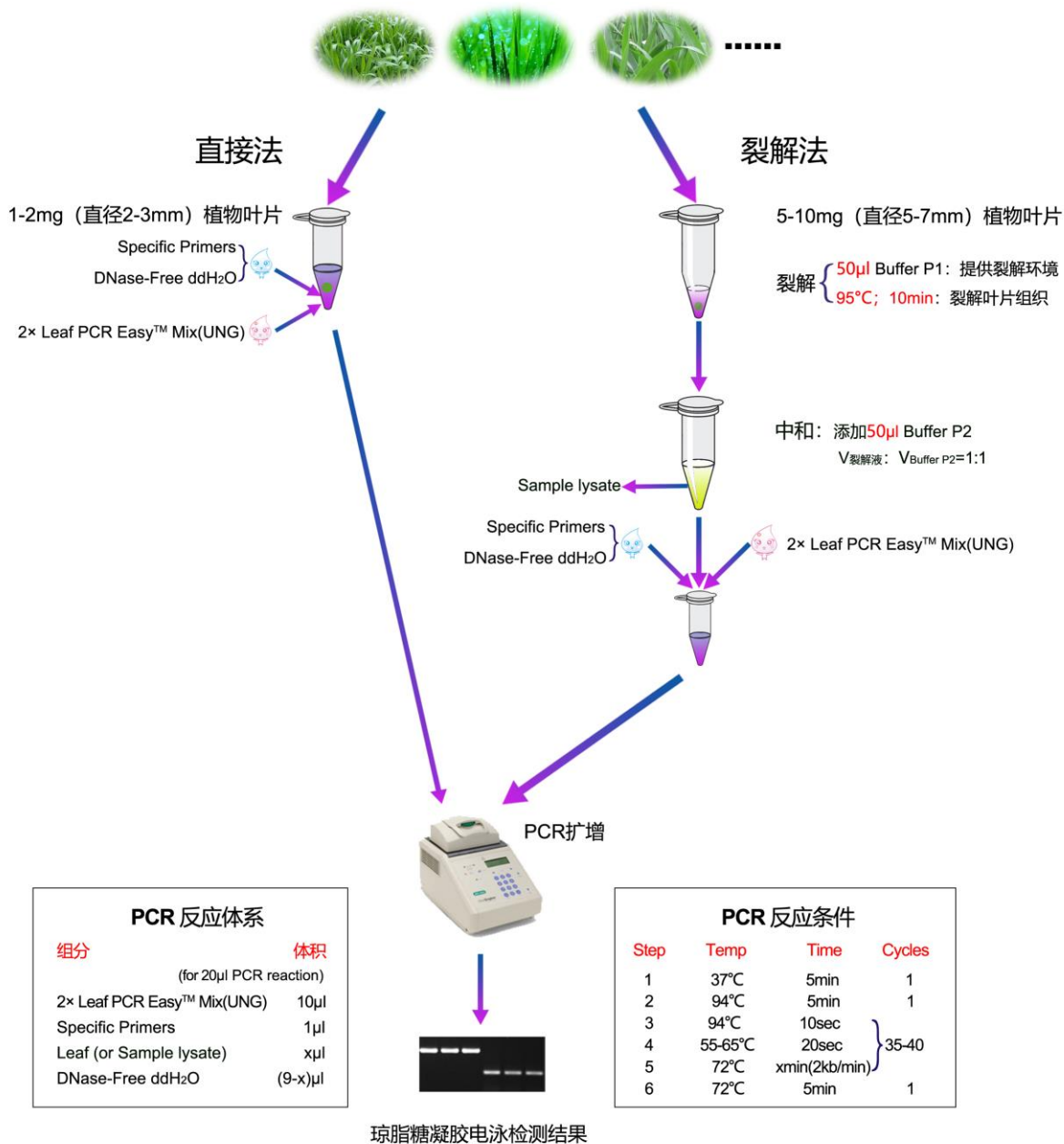
1*: 引物可选用该样本比较容易扩增的保守基因的引物，如β-Actin基因、基因组上的保守序列等(请确保这些引物的可用)。

2*: 可选用样本纯化的 DNA，也可根据实验需要，自行选择。

B: 阴性对照

PCR反应体系被污染会导致PCR结果出现假阳性，需要设置阴性对照来排除。取ddH₂O作为模板，用目的基因引物进行PCR扩增，以排除PCR体系是否被污染或实验是否有其他污染源。

操作示意图



直接法: ● ▲ ■

裂解法: ● ▲ ■

问题分析指南

以下针对植物叶片直接 PCR 系列试剂盒在实验中可能遇到的问题进行分析，希望能对您的实验有所帮助。另外，对于在操作说明和问题以外的其他实验或技术上的问题，我们设有专门的技术支持帮助您。如有任何需要可联系我们：028-83360257 或 E-mail: Tech@foregene.com。

在试剂盒的使用过程中往往会遇到许多问题，比如：没有 PCR 扩增产物、PCR 特异性差等，下面就分别对使用植物叶片直接 PCR 系列可能会遇到的问题进行分析。建议在进行直接 PCR 的同时设置阳性对照或阴性对照以便后续分析实验结果。

正对照、待测样本均无条带

1. PCR 反应体系或反应条件不合适。

建议：使用梯度 PCR 摸索 PCR 最佳反应条件。

2. PCR 试剂保存不当失去活性。

建议：2x Leaf PCR Easy™ Mix(UNG)应保存于-20℃，使用时避免反复冻融。若使用频繁，可在 4℃短时间存放。

3. 引物设计问题。

建议：尝试重新设计引物进行检查。

正对照有目的条带，待测样本无条带或条带弱

1. 叶片中多糖多酚含量较高，裂解混合液呈棕黄色甚至棕红色。

建议：使用多糖多酚植物叶片直接 PCR 试剂盒(Plant Leaf Direct PCR Plus Kit-UNG)。

2. 裂解液、中和液加入比例不当，裂解混合液影响 PCR 体系的 pH 值。

建议：正常条件下，中和后的裂解混合液的 pH 应该在 7-8 左右(裂解产物和 Buffer P2 严格按照 1:1 的量进行中和)。

3. 样本裂解混合液保存不当或保存时间过久，DNA 基因组已经降解。

建议：裂解液可在 4℃保存 5 天，尽量使用新制备的裂解液混合液进行 PCR。

4. 裂解混合液中抑制物过多。

建议：在 PCR 反应体系 5-20%范围内优化模板加入量。

5. PCR 循环数不足。

建议：适当增加 PCR 的循环数，推荐在 35-40 循环为佳。因为模板复杂，一般 PCR

反应要比用纯化的 DNA 模板多 5-10 个循环为佳。

非特异性扩增

1. 退火温度偏低。

建议：适当提高退火温度。

2. PCR 循环数过多。

建议：适当降低循环次数，推荐在 35-40 循环为佳。

3. 引物浓度偏高。

建议：适量降低引物用量。通常引物终浓度为 0.2 μ M 可以得到较好结果。反应性能较差时，可以在 0.1-0.5 μ M 范围内调整引物浓度。

4. 模板加入量过多。

建议：配制 PCR 反应体系时，适量减少模板加入量。

空白对照出现目的条带

1. 操作工具或试剂污染。

建议：实验所有试剂或器材均应高压灭菌。实验时应规范操作，避免在加样操作中溶液倒吸或飞溅。

2. 样本间交叉污染。

建议：每个取样器只对一个样本使用；或取完一个样本后，将取样器刃口或与样本直接接触的部位浸入 2%的次氯酸钠溶液中，反复涮洗数次进行清洗，然后用干净的纸巾擦干残液后再进行使用。

3. PCR 产物污染。

建议：如果实验室检测同类型样本多，最好使用 UNG 防 PCR 产物污染系统的试剂盒进行实验。

中国 ● 福际 World's Foregene

成都福际生物技术有限公司

电话: 028-83360257, 028-83361257

E-mail: info@foregene.com

[Http://www.foregene.com](http://www.foregene.com)

