



Plant Seed Direct PCR Kit I/II-UNG

Cat.No.TP-0312T/03121/03122/03123(I)

Cat.No.TP-0314T/03141/03142/03143(II)

For plant seeds containing low polysaccharide and polyphenol components

For performing PCR directly from plant seeds 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	6
试剂盒组分信息	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
材料取用说明	9
预防样本间交叉污染	9
● 植物种子直接 PCR 操作步骤	10
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反应体系，能够快速地从多糖多酚含量低的植物种子样本(如：水稻、小麦、烟草、玉米、大豆等)中释放出基因组 DNA，用于 PCR 反应，因此特别适合大规模基因检测。为了满足不同检测试验的需要，本试剂盒可以使用多种类型的样本(如完整种子、微量组织切块或多颗种子的磨碎样本)进行实验。其中，对于还需要进行萌发的种子样本，可以选择切取种胚以外的微量组织切块(1-5mg)进行实验；对于需要在大量样本中进行抽样检测的实验，可以选择将多个样本混合并磨碎成直径 0.5mm 左右的颗粒后再进行实验(最低可以检测出 0.1%的目的样本)。

裂解反应体系释放基因组 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 Seed 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混合液为模板，进行高效特异性扩增。该试剂包含公司专门针对直接 PCR 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。与裂解反应体系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 Seed PCR Easy™ Mix(UNG)在 2x Seed 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。

D-Taq DNA polymerase 是 Foregene 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：植物种子直接 PCR 试剂盒(Plant Seed Direct PCR Kit)和多糖多酚植物种子直接 PCR 试剂盒(Plant Seed Direct PCR Plus Kit)。在裂解阶段，考虑到不同类型的种子或组织材料在裂解过程中试剂用量差异较大，客户可根据自己实验材料的大小选择相应的植物种子(中小型)直接 PCR 试剂盒或植物种子(大型)直接 PCR 试剂盒；在 PCR 检测阶段，客户也可以根据实验需求，选用普通的 2x Seed PCR Easy™ Mix 或是具有防 PCR 扩增产物污染作用的 2x Seed 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，只需取单粒种子即可。
- ◆ 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 Seed 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。

试剂盒应用

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

试剂盒局限性

- ◆ 扩增片段≤1kb；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)，每一批次的植物种子直接 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 Seed Direct PCR Kit I-UNG					
植物种子(中小型)直接 PCR 试剂盒-UNG					
试剂盒组成		TP-0312T	TP-03121	TP-03122	TP-03123
		50 次	200 次	500 次	2000 次
Part I	Buffer SP1	10ml	40ml	100ml	400ml
	Buffer SP2	3ml	10ml	25ml	100ml
	6x DNA Loading Buffer	1.5ml	1.5ml	1.5ml	1.5mlx4
Part II	2x Seed PCR Easy™ Mix(UNG)	500µl	1mlx2	1.7mlx3	1.7mlx12
说明书		1 份	1 份	1 份	1 份

Plant Seed Direct PCR Kit II-UNG					
植物种子(大型)直接 PCR 试剂盒-UNG					
试剂盒组成		TP-0314T	TP-03141	TP-03142	TP-03143
		50 次	200 次	500 次	2000 次
Part I	Buffer SP1	30ml	120ml	100mlx3	400mlx3
	Buffer SP2	3ml	10ml	25ml	100ml
	6x DNA Loading Buffer	1.5ml	1.5ml	1.5ml	1.5mlx4
Part II	2x Seed PCR Easy™ Mix(UNG)	500µl	1mlx2	1.7mlx3	1.7mlx12
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 $< 4^{\circ}\text{C}$ 状态。

2. 保存条件

本试剂盒 Part I 保存在常温或 $2-8^{\circ}\text{C}$ 。

- ❖ 试剂 Buffer SP1、Buffer SP2、 $6\times$ DNA Loading Buffer，在干燥条件下，可保存 12 个月；如需保存更长时间可置于 $2-8^{\circ}\text{C}$ 。

注意：若低温保存，Buffer SP1 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 $2\times$ Seed PCR EasyTM Mix(UNG)，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 SP1：提供植物种子裂解反应所需的环境。
- ◆ Buffer SP2：中和裂解产物，使其不影响后续 PCR 反应。
- ◆ $2\times$ Seed PCR EasyTM Mix(UNG)：包含福际生物特别改造的 Taq DNA Polymerase、UNG 酶、dNTPs、dUTP、 MgCl_2 、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、 ddH_2O 添加到 $2\times$ Seed PCR EasyTM Mix(UNG) 中即可用于 PCR 反应。
- ◆ $6\times$ 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 $6\times$ 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种子样本，多糖多酚含量高的样本请选择多糖多酚植物种子直接 PCR 试剂盒(Plant Seed Direct PCR Plus Kit)。
- ◆ 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 1 年以内的种子进行实验。若种子保存时间超过 1 年或种子特别干燥，在裂解时，请先挑破种皮或使用敲碎的种子。
- ◆ 若 Buffer SP1 有沉淀析出，可放置于 37°C 待沉淀消失，并摇匀溶液后再使用。
- ◆ 2x Seed 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 Seed 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。植物种子直接 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种子(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 SP1 含 SDS：刺激性、致敏性。
- ◆ Buffer SP1 含 NaOH：刺激性、致敏性。

操作指南

本说明书根据实验材料差异，分别提供了植物种子快速释放 DNA，并进行 PCR 检测的方法。客户可根据自己的实验材料，按照相应的实验说明进行操作。

材料取用说明

- ❖ 完整种子：如果是保存时间较短(一年以内)的种子，取 1 粒(拟南芥、烟草或类似大小的种子可以取 10-30 粒)直接置于裂解液中裂解；若材料保存时间超过 1 年且特别干燥的种子，需要将种皮挑开或将种子敲碎，才能用于裂解反应。
- ❖ 种子组织切块：对需要进行萌发的种子，可使用手术刀(或剪刀)切取微量组织置于裂解液中裂解。若切取过程未损伤种胚，该种子仍可发芽种植。
- ❖ 磨碎样本：如果需要在大量样本中进行抽样检测，可以将多个样本混合并研磨成直径 0.5mm 左右的颗粒后，称取 100mg 样本置于裂解液中裂解。

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的取样器材。

植物种子直接 PCR 操作步骤

针对多糖多酚含量低的植物种子或组织材料，如：烟草种子、小麦种子、水稻种子等。

A: 样本 DNA 释放 (PCR 模板预制)

1. 取适量种子样本加入 200 μ l 或 2ml 离心管中。

注意：若材料为保存时间超过 1 年且特别干燥的种子，需将种皮挑开或将种子敲碎，才能进行裂解反应。

2. 根据种子或组织块大小加入适量 Buffer SP1(试剂用量见下表 1)。

注意：中小型种子每次裂解最多加入 200 μ l Buffer SP1，大型种子每次裂解最多加入 600 μ l Buffer SP1。

3. 将其放置于 PCR 仪或金属浴中，95 $^{\circ}$ C 裂解 10-30min。

注意：多数样本裂解 10min 即可，对于较难裂解或保存时间过长的样本，可以延长裂解时间至 30min。

4. 13,400 \times g 常温离心 2min，取 50 μ l 裂解产物的上清液至新离心管中，加入 50 μ l Buffer SP2，用微量移液器吹打混匀。1-5mg 范围内微量种子切块，可以在裂解完成后，直接向反应管中加入 50 μ l Buffer SP2 进行中和即可。

5. 所得裂解混合液可 4 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ C 进行保存。

表 1: 多糖多酚含量低样本的裂解相关参数

样本类型	样本量 (mg)	Buffer SP1 (μ l)	中和反应(μ l)	
			裂解产物	Buffer SP2
油菜或类似大小种子 ^{1*}	~6	100	50	50
水稻或类似大小单粒种子	~30	200	50	50
玉米或类似大小单粒种子	~250	600	50	50
组织切块	1-5	50	- ^{2*}	50
	5-30	200	50	50
磨碎样品 ^{3*}	100	600	50	50

1*: 以烟草或类似大小的种子进行实验时，需要使用 10-30 粒(约 1-6mg)种子进行裂解。

2*: 针对 1-5mg 范围内微量组织裂解，可以在裂解完成后，直接向反应管中加入 50 μ l 中和液进行中和即可。

3*: 为了保证裂解的强度和均一性，磨碎样品颗粒直径控制在 0.5mm 以内为宜。

B: PCR 反应鉴定

1. 在 PCR 管内加入相应的 2× Seed 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(PCR 体系配制见下表 2)。

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

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 3)。

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× DNA Loading Buffer，切勿使用含有 SDS 的 Loading Buffer 进行电泳。

表 2: PCR 反应体系配制

PCR 体系添加内容	用 量		终 浓 度
2× Seed PCR Easy™ Mix(UNG)	10μl	25ul	1×
Forward Primer (10μM)	0.5μl	1μl	0.2-0.25μM ^{1*}
Reverse Primer (10μM)	0.5μl	1μl	0.2-0.25μM ^{1*}
裂解混合液(DNA模板) ^{2*}	Xμl	Xμl	
ddH ₂ O (灭菌蒸馏水)	(9-X)μl	(23-X)μl	
Total Volume	20μl	50μl	

1*: 通常引物终浓度为0.2-0.25μM可以得到较好结果。反应性能较差时，可以在0.1-0.5μM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 3: 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	3min	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 Seed 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× Seed PCR Easy™ Mix(UNG)有效性。其反应体系的配制见下表4。

表 7: 对照 PCR 反应体系配制

PCR 体系添加内容	用 量		终 浓 度
2× Seed PCR Easy™ Mix(UNG)	10μl	25ul	1×
Forward Primer (10μM) ^{2*}	0.5μl	1μl	0.2-0.25μM
Reverse Primer (10μM) ^{2*}	0.5μl	1μl	0.2-0.25μM
DNA模板 ^{3*}	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性)。

2*: 可选用样本纯化的 DNA，也可根据实验需要，自行选择。

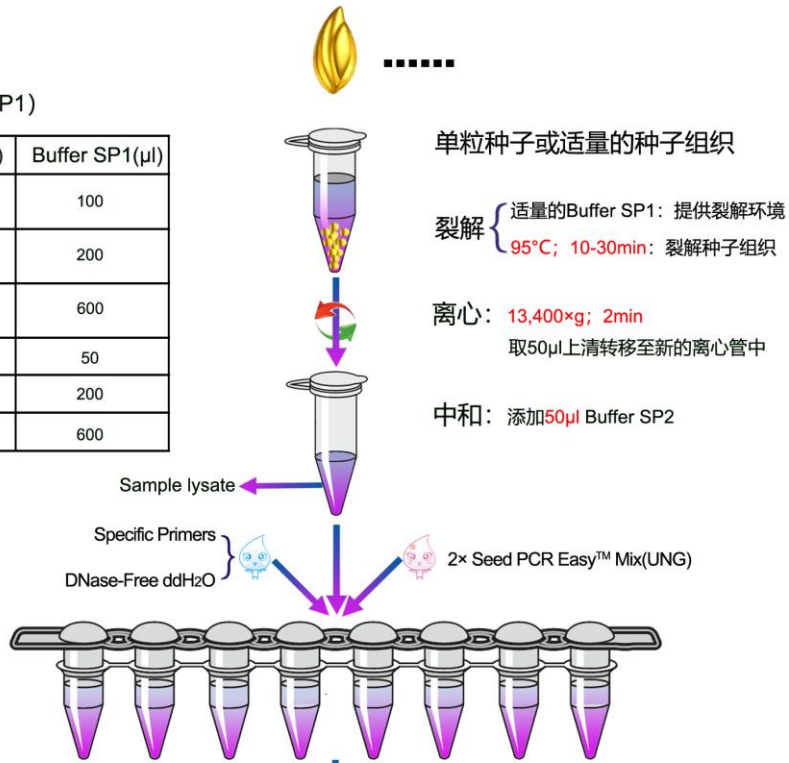
B: 阴性对照

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

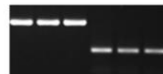
裂解液添加量(Buffer SP1)

样本类型	样本量(mg)	Buffer SP1(μl)
油菜或类似大小种子	~6	100
水稻或类似大小单粒种子	~30	200
玉米或类似大小单粒种子	~250	600
组织切片	1-5	50
	5-30	200
磨碎样本	100	600



PCR扩增

组分	体积
(for 20μl PCR reaction)	
2× Seed PCR Easy™ Mix(UNG)	10μl
Specific Primers	1μl
Sample lysate	xμl
DNase-Free ddH ₂ O	(9-x)μl



琼脂糖凝胶电泳检测结果

Step	Temp	Time	Cycles
1	37°C	5min	1
2	94°C	3min	1
3	94°C	10sec	} 35-40
4	55-65°C	20sec	
5	72°C	xmin(2kb/min)	}
6	72°C	5min	

问题分析指南

以下针对植物种子直接 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种子直接 PCR 系列试剂盒可能会遇到的问题进行分析。建议在直接 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 Seed 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. 种子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：使用多糖多酚植物种子直接 PCR 试剂盒(Plant Seed 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(普通植物种子直接 PCR 试剂盒，裂解产物和 Buffer SP2 严格按照 1:1 的量进行中和；多糖多酚植物种子直接 PCR 试剂盒，裂解产物和 Buffer SP2 严格按照 8:5 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：裂解混合液可在 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. PCR 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)

