

## 常见问题与解决方案

常见问题	可能原因	解决方法
阳性对照、待测样本均无条带。	PCR 反应体系或反应条件不合适。	使用梯度 PCR 摸索 PCR 最佳反应条件。
	PCR 试剂保存不当失去活性。	应保存于-20°C，使用时避免反复冻融。若使用频繁，可在 4°C 短时间存放。
	引物设计问题。	尝试重新设计引物进行检查。
阳性对照有目的条带，待测样本无条带或条带弱。	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。	本试剂盒不适合多酚多糖含量较高的样品。
	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。	裂解混合液液可在 4°C 保存 5 天，尽量使用新制备的裂解混合液进行 PCR。
	PCR 循环数不足。	适当增加 PCR 的循环数，推荐 35-40 个循环为佳。因模板复杂，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	PCR 退火温度太低，循环数、引物浓度或模板浓度太高。	增加 PCR 退火温度，降低 PCR 循环数、引物浓度或模板浓度。
	PCR 引物错配。	重新设计 PCR 引物。
	配制 PCR 反应体系时温度太高或配制完成后放置时间太久。	PCR 反应体系的配制在低温下进行，配制完成后尽快进行 PCR 扩增反应。



## Plant Tissue Direct PCR Kit

**货号：D302-A/B 保存温度：-20°C**

### ● 产品包装

组分	D302A	D302B
2×Plant Tissue Direct PCR ProMix	1.25mL× 2	1.25mL× 8
Plant Tissue Lysis Buffer A	5mL	5mL× 8
Plant Tissue Lysis Buffer B	5mL	5mL× 8

### ● 保存条件

- 2×Plant Tissue Direct PCR ProMix 请置于-20°C保存，避免反复；
- Plant Tissue Lysis Buffer 在常温干燥条件下，可保存 12 个月，如需保存更长时间可置于 4°C。低温保存，易出现沉淀，可平衡至室温或 37°C水浴 10min，待沉淀溶解后，混匀使用。

### ● 产品概述

本产品是一款可直接对不同类型植物叶片或种子进行 PCR 扩增的试剂盒，可用于非多糖、多酚类植物样品高通量筛选。试剂盒包含经过定向进化改造的 PCR 聚合酶，该酶对植物中的 PCR 抑制剂具有很强的耐受性，配合精心优化的 Buffer 体系，使得 6kb 以内的 DNA 片段依然保持了极高的扩增性能。试剂盒采用独特的裂解缓冲液体系，可以快速的裂解多种植物样品并释放出基因组 DNA，并作为模板直接用于 PCR 反应。试剂盒提供 2×Plant Tissue Direct PCR ProMix，包含了用于 PCR 扩增除模板和引物外的所有组分，大大简化操作过程，降低污染几率。扩增产物为平末端，可用于转基因植株鉴定、植物基因分型等。

## ● 操作方法

### 1) 样品处理。

本试剂盒根据不同实验需求提供了两种操作方法。直接法仅需要将一小片植物组织加入 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，以及需要对同一样本进行多次 PCR 扩增的实验。

#### 植物叶片

**直接法：**推荐使用幼嫩叶片。使用固定直径为 0.5-3mm 的打孔器打取样本，以确保获得大小均一的样品。将所取的样本直接加入到 PCR 反应体系中。注意确保样本浸没在 PCR 溶液中。

**研磨裂解法：**推荐使用幼嫩叶片。取一小块叶片（直径 1-3mm），置于 200 μL 或 1.5mL 离心管中；在离心管中加入 50 μL Plant Tissue Lysis Buffer A，使用 100μL 枪头挤压叶片，尽量磨碎直至溶液呈现绿色，加入 50 μL Plant Tissue Lysis Buffer B，用微量移液器吹打或者涡旋混匀；短暂离心后，取 1μL 上清加入 PCR 反应体系中作为模板。

**加热裂解法：**推荐使用幼嫩叶片。取一小块叶片（直径 1-3mm），置于 200 μL 或 1.5mL 离心管中；在离心管中加入 50 μL Plant Tissue Lysis Buffer A，盖好离心管盖，95°C 处理 10 min；加热结束后，加入 50 μL Plant Tissue Lysis Buffer B，用微量移液器吹打或者涡旋混匀；短暂离心后，取 1μL 上清加入 PCR 反应体系中作为模板。

#### 植物种子

**研磨裂解法：**用解剖刀切取直径约 5mm 大小的种子，将其加入到 100 μL Plant Tissue Lysis Buffer A 中，用枪头或其他方式磨碎样本；涡旋震荡 15 秒后于室温放置 3-5min，确保种子样本浸没在缓冲液中；加入 100 μL Plant Tissue Lysis Buffer B，用微量移液器吹打或者涡旋混匀；短暂离心后，取 1μL 上清加入 PCR 反应体系中作为模板。

**加热裂解法：**用解剖刀切取直径约 5mm 大小的种子，将其加入到 100 μL Plant Tissue Lysis Buffer A 中，95°C 处理 10 min，针对较难裂解的样本可适当延长裂解时间（不超过 30min）；加热结束后，加入 100 μL Plant Tissue Lysis Buffer B，用微量移液器吹打或者涡旋混匀；短暂离心后，取 1μL 上清加入 PCR 反应体系中作为模板。

### 2) 反应体系准备。

灭菌水	up to 20 μL	up to 50 μL
2×Plant Tissue Direct PCR ProMix	10μL	25μL
粗提上清☆	optional	optional
正向引物 (10μM)	0.8μL	2μL
反向引物 (10μM)	0.8μL	2μL

☆ 样品使用量可根据实际情况调整，一般可在反应总体积的 2%~20% 之间调整，使用过多易导致扩增失败。

### 3) 在 PCR 仪上运行如下反应条件：

阶段	温度设计		循环数
预变性	98 °C	5 min	1x
	95 °C	10 s	(Tm-3) °C 15 s
	(Tm-3) °C	15 s	
	72 °C	2 kb/min	35x
彻底延伸	72 °C	5 min	1x

☆☆ 预变性 5min 可促进植物组织裂解，释放基因组 DNA，请勿缩短时间或降低温度。

## ● 注意事项

- 建议实验开始前以纯化的基因组 DNA 作为阳性对照，确保体系、引物及操作无误。
- 建议使用新鲜采取的叶片组织，若为长期冷冻组织，应尽量避免反复冻融，否则会导致模板的降解，影响 PCR 效率。叶片组织以幼嫩为宜，若为成熟的叶片，避免使用叶片主脉部位组织。