**NuSmart®植物组织PCR试剂盒**

**（免核酸提取）**

**试剂盒应用**

本试剂盒适用于烟草、拟南芥、水稻、大豆、油菜、玉米、小麦等叶片和种子的PCR、荧光定量PCR 检测。使用该试剂盒无需液氮研磨，无需使用有机试剂，无需重复离心便可获得用于PCR反应的基因组模板。

依托Nu-Smart®平台DNA-Lysis采用专利配方，5分钟内获得花瓣、花蕊、种子、叶片、根、茎等样本的基因组DNA。叶片仅仅需取材1-4mm，取样量小，减少对样品的损耗。

预制的2×TaqMix (With Dye)只需要加入引物和模板DNA即可进行PCR反应，减少移液次数，实现高通量扩增。该体系中添加有电泳缓冲液和染料，PCR结束后直接进行琼脂糖凝胶电泳，使用方便快捷。

本试剂盒仅供研究使用，不可用于临床、食品、化妆品等领域。

**试剂盒组成**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 组分 | **Nu-P0101（50T）** | **Nu-P0102（250T）** |
| DNA-Lysis | 1 mL | 5 mL |
| 2×TaqMix (With Dye) | 500 μL | 2×1.25mL |

**保存条件**

-20ºC保存。

使用前将DNA-Lysis室温充分混匀，经常使用可4℃保存。

2×TaqMix (With Dye)溶解后需置于冰上，避免反复冻融。

**需要准备**

金属恒温浴、PCR仪

**使用方法**

**一、不同样品的处理方法**

1. 叶片的处理

（1）用眼科剪或叶片取样器剪取1-4mm的叶片。

（2）加入20 μL DNA-Lysis。

（3）充分混匀。

（4）置于55℃作用5分钟。溶液即为DNA模板。

1. 种子和果实的处理

（1）研磨后种子或1-2mm果肉放入离心管中。

（2）加入20 μL DNA-Lysis。

（3）充分混匀。

（4）置于55℃作用5分钟。

（5）10,000rpm离心1分钟，上清即为DNA模板。

**二、推荐PCR反应体系**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | **20 μL体系（推荐）** | **50 μL体系** |
| 2×TaqMix (With Dye) | 10 μL | 25 μL |
| 引物1 (10 μM)※ | 1 μL | 2 μL |
| 引物2 (10 μM)※ | 1 μL | 2 μL |
| DNA模板 | 0.5-2 μL | 0.5-3 μL |
| ddH2O | 补足至20 μL | 补足至50 μL |

※：引物浓度可以在0.1-0.5 μM范围内进行调节。

**三、按照以下方法设定PCR反应**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 步骤 | 温度 | 时间 | 循环数 |
| 预变性 | 95 oC | 5 min | 1 |
| 变性 | 95 oC | 15-30 s | 35-40 |
| 退火 | 50~72 oC | 30 s |
| 延伸 | 72 oC | 1 kb/min |
| 彻底延伸 | 72 oC | 5 min | 1 |
|  | 4 oC | Hold | 1 |

**注意事项**

1. **试剂盒使用前注意事项**

（1）所有试剂应按照指定温度储存。请勿反复冻融。

（2）使用前后均需要对操作区进行消毒，消毒方式可以采用75%乙醇或核酸消除剂等。耗材均需使用商品化的无酶耗材。

（3）DNA-Lysis频繁使用，可在4℃保存。长期不使用可放-20℃保存。

1. **样本注意事项**
2. 不同叶片使用不同的取样器进行处理，防止交叉污染导致检测结果偏差。
3. 叶片剪取不宜过大，以1-4mm为宜。
4. 种子样本大小不一，建议研磨后使用。
5. **试剂盒使用过程中注意事项**
6. PCR过程中推荐使用阴性对照和阳性对照。
7. 整个过程中使用的吸头、离心管等耗材应丢弃在含有75%乙醇或核酸消除剂的容器中，减少环境污染。
8. 2×TaqMix (With Dye)包含染料，可在反应结束后直接进行琼脂糖凝胶电泳。
9. 不能使用其他品牌的taq酶，进行PCR扩增检测。
10. **试剂盒使用后注意事项**
11. DNA-Lysis处理后的DNA模板可在-20℃保存至少1个月，如需长期保存，可离心后取上清置-80℃保存。避免反复冻融，防止基因组断裂。
12. PCR反应完成后，严禁在实验区开盖。应在污染区进行琼脂糖凝胶电泳，防止气溶胶污染。
13. 为防止试剂盒污染，请勿将不同批号试剂盒混用。

**检测实例**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 叶片 | | | |
| 烟草 | 拟南芥 | 水稻 | 大豆 |
| 玉米 | 油菜 | 小麦 | 百脉根 |
| 西红柿 | 茄子 | 西瓜 | 荔枝 |
| 龙眼 | 铁皮石斛 |  |  |
| 果实和种子 | | | |
| 水稻 | 油菜 | 玉米 | 大豆 |
| 小麦 | 棉花 | 西红柿 | 茄子 |
| 胡萝卜 | 香蕉 | 荔枝 | 龙眼 |
| 苹果 | 草莓 |  |  |
| 中草药 | | | |
| 白木耳 | 灵芝 | 丹参 | 益母草 |
| 红花 | 紫草 | 苦参 | 艾草 |

**常见问题解析**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **问题** | **可能原因** | **推荐解决方案** |
| 阳性对照和样本都未出现扩增条带 | 1. PCR条件并非最优 2. 2×TaqMix (With Dye)保存不当 3. 引物并非最优 | 1. 推荐使用梯度PCR摸索最佳PCR反应条件。 2. 2×TaqMix (With Dye)应在-20℃保存，使用过程中置于冰浴中。避免反复冻融。 |
| 阳性对照有条带，但是样本无条带或者条带比较弱 | 1. PCR条件并非最优 2. DNA模板量太大 3. 基因组断裂或者降解 4. PCR循环数不合适 5. 样本过大 6. 扩增片段太大 7. 引物浓度不合适 | 1. 推荐使用梯度PCR摸索最佳PCR反应条件。 2. 增大PCR反应体系，过多使用DNA模板会导致扩增效率下降，推荐使用模板量为0.5-2μL。 3. 推荐使用35-40个循环，但是模板复杂，可适当增加5个循环。 4. 叶片大小为1-4mm，样本比较大可适当增加DNA-Lysis用量。 5. 种子样本大小差异比较大，推荐磨碎取小量进行检测。 6. 推荐扩增5kb以内基因。 |
| 非特异性条带多 | 1. 退火温度偏低 2. PCR循环数过多 3. 引物浓度过高 4. 引物并非最优 | （1）推荐使用梯度PCR对退火温度进行摸索。  （2）推荐使用35-40个循环进行扩增。  （3）降低引物浓度，使引物终浓度在0.1-0.5μM。  （4）重新设计引物。 |
| 阴性对照出现条带 | 1. 引物污染 2. 无菌水污染 3. 操作工具污染 4. 样本间交叉污染 5. PCR产物间污染 | 1. 使用耗材需要经过无酶处理。 2. 使用移液器时防止液体飞溅。 3. 减少开盖次数，防止气溶胶污染。 4. 使用的吸头、离心管等耗材应丢弃在含有75%乙醇或核酸消除剂的容器中，防止形成环境污染。 5. 定期对样本处理区域进行消毒。 |