

## 植物直扩 TaqMan qPCR 试剂盒

### Plant Direct TaqMan qPCR Kit

货号	规格	反应次数
BDAG0051-1ml	1ml	100rxn (10ul/rxn)
BDAG0051-5ml	5ml	500rxn (10ul/rxn)
BDAG0051-10ml	10ml	1000rxn (10ul/rxn)

运输：冰袋运输，储存：-20℃保存可保存 24 个月。

#### 试剂组分：

组分名称	货号		
	BDAG0051-1ml	BDAG0051-5ml	BDAG0051-10ml
2×Plant Direct TaqMan qPCR Master Mix	1 mL	5 mL	10 mL
Buffer RLB18	25 mL	125 mL	2,500 mL
ROX Reference I (50×) *	40 μL	200 μL	400 μL
ROX Reference II (50×) *	40 μL	200 μL	400 μL

\*备注：**ROX Reference** 为另行选配试剂，本产品未含；针对不同型号Real-Time PCR仪使用方法如下：

**1. ROX Reference I(50×)**为高浓度ROX，适用于如下型号Real-Time PCR仪：

- Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR System(Thermo Fisher Scientific)；
- Applied Biosystems 7900 Real-Time PCR System(Thermo Fisher Scientific)；
- Step One Plus Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific)。

**2. ROX Reference II (50×)**为低浓度ROX，适用于如下型号Real-Time PCR仪：

- AppliedBiosystems 7500 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific)；
- AppliedBiosystems 7500 FAST Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific)。

**3. 当使用于如下型号Real Time PCR扩增仪时，无需加入ROX Reference：**

- Roche、Bio-Rad、TaKaRa、宏石、雅睿、博日、天隆等其它无需加入ROX校准染料的Real-Time PCR仪。

## 产品描述:

本产品可针对各种类型植物样本，无需进行核酸提取，直接进行 TaqMan Probe 法 qPCR 反应，用于基因含量和转基因等检测。用试剂盒中专门开发的 Buffer RLB18 组分，对植物样本进行破碎处理后，直接进行 qPCR 扩增反应。

产品中使用了经过定向改造，并进行了抗体封闭的直扩型热启动聚合酶(Hot-Start DNA Polymerase)，配合条件优化的热启动 qPCR 专用缓冲体系，对各种样本中的 PCR 抑制物具有极强的耐受性，可有效避免类似于非热启动型聚合酶导致的非特异性扩增反应，从而提升 PCR 扩增效率。同时也能够针对多糖多酚的样本完成理想扩增，获得高灵敏度的 qPCR 检测结果。

## 产品特点

1. 无需进行核酸提取或纯化，直接对各种植物样本进行 qPCR 反应，省时省力；
2. 配合专门开发的高性能样本预处理组分 Buffer RLB18，直接 qPCR 反应效果可媲美相同样本量提取产物作为模板的反应效果；
3. 使用了抗体封闭的突变型聚合酶，可以进行 Hot Start 法 PCR 反应，与特别开发的 Buffer 系统相结合，具有高扩增效率、高扩增灵敏度的特点；
4. 能够针对多糖多酚的样本完成扩增。

## 实验流程

### 1. 样本制备

#### 1.1 植物叶片样品制备

可选择如下方式之一进行样本制备：

##### 1) 组织研磨法

**使用组织研磨仪研磨：**剪取 3-5 mm 尺寸的新鲜幼嫩的叶片于深孔板(或 EP 管)中，向深孔板(或 EP 管)中加入 150-200  $\mu$ L Buffer RLB18，加入两颗钢珠(自备)，盖上硅胶盖(或 EP 管盖)，置于组织研磨仪上研磨 1-2 min。然后，置于平板离心机于 4,000  $\times$  RPM 下离心 1-2 min (建议 4 $^{\circ}$ C 下进行离心)，离心后上清液可直接作为 PCR 反应模板使用。

**使用研钵研磨：**剪取 3-5 mm 尺寸的新鲜幼嫩的叶片于研钵中，向其中加入 200  $\mu$ L Buffer RLB18，用研磨棒充分磨碎后置于离心机于 12,000  $\times$  RPM 离心 1-2 min (建议 4 $^{\circ}$ C 下进行离心)，离心后上清液可直接作为 PCR 反应模板使用。


**3-5 mm 示意图**

## 2) 加热裂解法

剪取 2-3 mm 尺寸新鲜幼嫩的叶片于 200  $\mu$ L EP 管(或 96 孔 PCR 板)中, 向 EP 管(或 PCR 板)中加入 50  $\mu$ L Buffer RLB18 (Plant Lysis Buffer 务必淹没叶片), 盖上管盖, 在烘箱、水浴锅或者 PCR 仪上于 95 $^{\circ}$ C 加热处理 5-10 min, 然后置于台式离心机上于 12,000  $\times$  RPM 下离心 1-2 min(或平板离心机上于 3,000  $\times$  RPM 离心 1-2 min), 建议 4 $^{\circ}$ C 下进行离心, 离心后上清液可直接作为 PCR 反应模板使用。


**2-3 mm 示意图**

### 样本制备注意事项:

- 请务必参照示意图所示尺寸剪取叶片用量, 并尽量不要取到叶脉;
- 为避免交叉污染, 剪取样品的工具每次取样后需洗刷后方可进行下一样品的取样;
- 有条件的情况下建议优先采用组织研磨法进行样本制备, 使用组织研磨仪时预先摸索破碎条件, 包括转速/频率和研磨时间, 研磨后看不到大块叶片即为研磨成功;
- 样本如需长期保存, 请将上清液(吸取上清是尽量不要吸取到底部的沉淀)置于 -20 $^{\circ}$ C 保存, 短时间保存(<1 hr)可置于 4 $^{\circ}$ C 放置。

## 1.2 植物种子样品制备

### 1) 组织研磨法

参照表 1 建议的用量, 将植物种子加入到 Buffer RLB18 中进行充分研磨, 然后置于离心机上于 12,000  $\times$  RPM 下离心 1-2 min, 上清液即可直接作为 PCR 反应模板使用。

表 1 植物种子样本及 Plant Lysis Buffer 用量建议

植物种子	取样量	Plant Lysis Buffer 加入量
水稻	1-2 粒	200-300 $\mu$ L
玉米	0.5-1 粒	300-500 $\mu$ L
芝麻、油菜等	10 粒	200 $\mu$ L

对于需要进行萌发实验的种子，切取 5-10mg 组织（切勿取到种胚），置于 150-200  $\mu\text{L}$  Buffer RLB18 中，充分研磨后置于离心机于 12,000  $\times$  RPM 下离心 1-2 min，所得上清液即可直接作为 PCR 反应模板使用。

## 2) 加热裂解法

参照表 1 建议的用量，将植物种子加入到 Buffer RLB18 中，置于 95°C 处理 10-15 min (针对较难裂解的样本可适当延长加热处理时间)，然后于 12,000  $\times$  RPM 下离心 1-2 min，所得上清液即可直接作为 PCR 反应模板使用。

对于需要进行萌发实验的种子，切取 5-10mg 组织（切勿取到种胚），置于 150-200  $\mu\text{L}$  Buffer RLB18 中，置于 95°C 处理 10-15 min (针对较难裂解的样本可适当延长加热处理时间)，加热结束后于 12,000  $\times$  RPM 下离心 1-2min，所得上清液即可直接作为 PCR 反应模板使用。

## 2. 扩增体系和条件

### 1) 反应体系制备

组分	体积( $\mu\text{L}$ per sample)		终浓度
	Mix A	Mix B	
2 $\times$ Plant Direct TaqMan qPCR Master Mix	10	25	1 $\times$
Forward Primer (10 $\mu\text{M}$ )	0.5	1.0	0.25 $\mu\text{M}$
Reverse Primer (10 $\mu\text{M}$ )	0.5	1.0	0.25 $\mu\text{M}$
Probe (10 $\mu\text{M}$ )	0.4	0.4	0.2 $\mu\text{M}$
Template*	2	5	/
PCR Grade H <sub>2</sub> O	To 20	To 50	/
<b>总体积/rxn</b>	<b>20</b>	<b>50</b>	

\*备注: DNA 模板加入量建议为反应总体积的 10-20%。

### 2) 反应程序

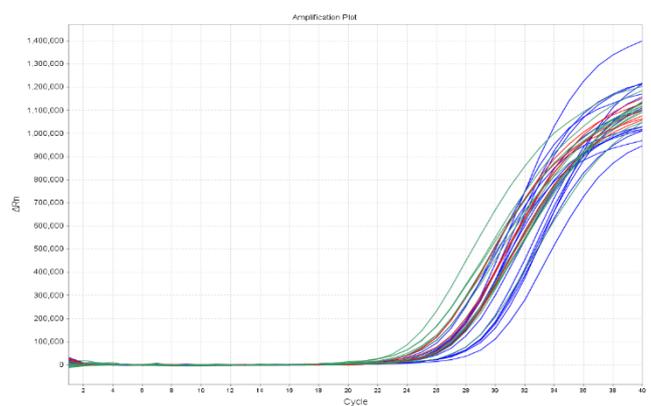
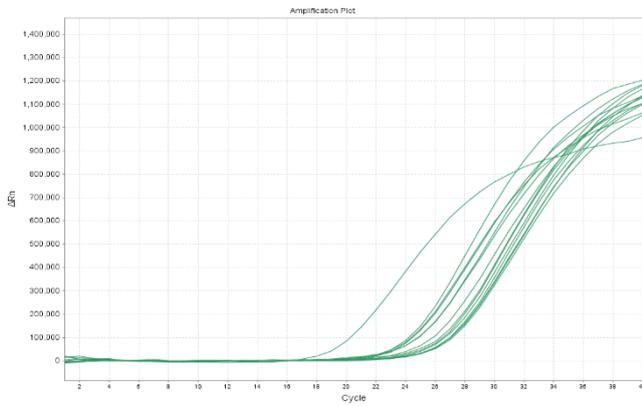
Step	Temp.	Time	Cycle
Initial Denaturation	95°C	5 min	1 Cycle

Denaturation	95°C	15 sec	35~45 Cycles
Annealing / Extension / Data Collection	60°C	30 sec	

## 应用实例

使用本试剂盒对棉花、大豆、玉米、水稻、番茄、小麦等物种的不同叶片进行直接 qPCR 检测，均能良好的完成扩增。

样本制备方法：研磨法



## 注意事项

1. 产品解冻需要在冰上进行，并避免反复冻融；
2. 使用前上下轻柔颠倒容器数次，确保各试剂成份完全混匀，试剂如未充分混匀可能导致反应性能下降。  
可短暂离心 15~30 秒收集试剂至容器底部。切勿使用涡旋震荡等剧烈混匀方式以免产生气泡；
3. PCR 反应配制过程需在冰上进行，各成份加毕后请短暂涡旋混匀并离心；
4. 请避免核酸酶污染样本，否则可能造成扩增反应出现困难的情况；
5. 请仔细阅读本说明，严格按照操作流程和推荐用量使用本产品；
6. 本产品仅供科学研究使用，不可用于临床诊断。