

Plant DNA Extraction Kit

สำหรับเตรียมตัวอย่าง 50 ตัวอย่าง

ชุดนี้ใช้ magnetic beads เป็นตัวจับ DNA เพื่อให้ได้ genomics DNA มีความบริสุทธิ์ได้อย่างรวดเร็วและความบริสุทธิ์สูง ซึ่งเหมาะกับการนำไปทำงานวิเคราะห์ต่อไป อย่างเช่น PCR, Real-time PCR, RT-PCR, NGS, และอื่นๆ

สิ่งที่มีมาใน kit

รายการ	จำนวน
Magnetic bead	500 µl
Lysate AZ	20 ml
Lysate B	1 ml
Washing A	15 ml
Washing S	30 ml
Elution buffer	10 ml

การเตรียมสาร

- เตรียม isopropanol และ absolute ethanol (analytical grade, sterile, RNase free)
- เมื่อเปิดฝา Washing buffer AW และ Washing buffer SW แล้ว ให้เติมดังนี้
 - เติม isopropanol ลงใน **Washing A** 14 ml
 - เติม absolute ethanol ลงใน **Washing S** 44 ml
- น้ำยาล้าง
 - Washing A ให้เติม Isopropyl alcohol (abs)
 - Washing S ให้เติม Ethyl alcohol (abs)

ตัวอย่างแต่ละประเภทให้เตรียมปริมาณดังนี้

ตัวอย่าง	ปริมาณ
ใบไม้สด Fresh plant leaves	50 - 200 mg
ใบไม้แห้ง Dry leaves	10 - 30 mg
เมล็ดถั่วเหลือง Soybean seed	5 - 30 mg
เมล็ดข้าวสาลี Wheat seeds	50 - 200 mg
เมล็ดข้าวโพด Corn seed	50 - 200 mg

ขั้นตอนต่อไปนี้จะใช้สำหรับสกัด DNA จากตัวอย่างพืช ตั้งแต่ 50 mg ถึง 200 mg ต่อตัวอย่าง:

1. นำตัวอย่างเนื้อเยื่อพืชจากตัวอย่างสด ค่อยๆบดด้วยโกร่ง
 - a. เติม **Lysate AZ** 400 ul
 - b. เติม **Lysate B** 5ul
 - c. บดตัวอย่าง 50 mg - 200mg ต่อให้ละเอียด จากนั้นย้ายไปยัง 1.5 ml EP tube, mixing (อาจใช้ vortex 1200 ~ 1800 rpm).
2. บ่ม 1.5ml EP tube ที่ 65 องศาเซลเซียส ประมาณ 15-30 นาที จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 RPM นาน 10 นาที
3. ย้าย 200 ul supernatant ไปยัง 1.5ml EP tube หลอดใหม่ จากนั้นเติม
 - a. **Magnetic beads** 10 ul
 - b. Isopropyl alcohol 200 ul
 - c. ผสมให้เข้ากันด้วย autopipette แล้วบ่มไว้ 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง (25 °C)
4. วางหลอด 1.5 ml EP tube บน magnetic stand รอจน magnetic เกาะตัวเป็นกลุ่มที่ผนังหลอด จนสารละลายใส (ประมาณ 2 นาที) จากนั้นดูดสารละลายส่วนใสทิ้ง โดยระวังไม่ให้ดูดติด magnetic bead ไปด้วย
5. นำ EP tube ออกจาก magnetic stand แล้วเติม **Washing A** 500 µl ผสมแบบคว่ำ/หงายหลอด ประมาณ 2 นาที
6. วาง EP tube บน magnetic stand รอจน magnetic เกาะตัวเป็นกลุ่มที่ผนังหลอด จนสารละลายใส (ประมาณ 2 นาที) จากนั้นดูดสารละลายส่วนใสทิ้ง โดยระวังไม่ให้ดูดติด magnetic bead ไปด้วย
7. นำ Eppendorf tube ออกจาก magnetic stand แล้วเติม **Washing S** 500 µl ผสมแบบคว่ำ/หงายหลอด ประมาณ 2 นาที
8. วาง Eppendorf tube บน magnetic stand รอจน magnetic เกาะตัวเป็นกลุ่มที่ผนังหลอด จนสารละลายใส (ประมาณ 2 นาที) จากนั้นดูดสารละลายส่วนใสทิ้ง โดยระวังไม่ให้ดูดติด magnetic bead ไปด้วย
9. ** ทำซ้ำขั้นตอนที่ 7-8 อีกครั้งหนึ่ง ** จากนั้นให้เปิดฝาทิ้งไว้ (ประมาณ 2-5 นาที) สังเกตให้ magnetic แห้ง และไม่มีแสงสะท้อนของน้ำบน magnetic
10. นำ Eppendorf tube ออกจาก magnetic stand แล้วเติม Elution buffer หรือ deionized water 100 µl แล้ว incubate ที่ 60°C 5-10 นาที
11. วาง Eppendorf tube บน magnetic stand รอจน magnetic เกาะตัวเป็นกลุ่มที่ผนังหลอด จนสารละลายใส (ประมาณ 2 นาที) จากนั้นดูดสารละลายส่วนใสย้ายไปยังหลอด Eppendorf tube หลอดใหม่
12. ตรวจวัดปริมาณและความบริสุทธิ์ของ DNA/RNA ด้วย spectrophotometer หรือ fluorometer