

产品组分

组分名称	组分编号	规格-1	规格-2
		100 RXN	1000 RXN
Nucleic Acid Release Reagent	RM30564	10 mL	100 mL

产品说明

本试剂是基于高效破壁试剂、核酸保护剂、扩增反应增强剂的核酸释放试剂。主要原理是利用高效表面活性剂，在加热的条件下将核酸从样本中裂解并释放出来；并在核酸保护剂的作用下，使 DNA 免受 DNase 的降解；在扩增反应增强剂的作用下，释放产物适合高通量自动化操作并可直接满足下游普通 PCR 的需求。

保存温度

4°C 保存

适用样本

样本类型	适用种类
叶片	红薯、棉花、水稻、玉米、小麦、烟草、大豆、番茄、黄瓜、土豆、拟南芥
动物细胞	293T、293F、Jurkat
拭子	咽拭子、鼻拭子
体液	唾液、痰液

注意事项

1. 若不慎将释放剂保存在 -20°C 冰箱，在使用前需要放置在 65°C 烘箱复溶，复溶后的试剂依然可以进行核酸释放实验，但可能引起部分 PCR 扩增效率下降。
2. 使用其它品牌 PCR 试剂时注意延伸时间不要超过说明书推荐值。
3. 进行 PCR 反应时，模板添加量不要超过推荐值释放液 0.5 μ L，释放液稀释过则不要超过 0.5 μ L $\times$ 稀释倍数，模板过多会抑制 PCR 反应。

操作说明

样本DNA释放

样本	方案	操作步骤	
		预处理	加热
植物叶片	方案①	1. 取少量植物叶片（1-20 mg）放入 1.5 mL 离心管中； 2. 加入 2 颗 3 mm 钢珠和 100 μ L Nucleic Acid Release Reagent； 3. 设置研磨仪 40 Hz 运行 20 s。	可使用金属浴/水浴/PCR 仪器、或者烘箱进行加热：
	方案②	1. 取少量植物叶片（1-20 mg）放入 1.5 mL 离心管中； 2. 加入 2 颗 3 mm 钢珠，并放入样品盒； 3. 舀 2-3 勺液氮倒入样品盒，盖上盒盖，穿戴好防冻手套后迅速上下摇动样品盒 30 s； 4. 加入 100 μ L Nucleic Acid Release Reagent。	
	方案③	1. 取少量植物叶片（1-20 mg）放入 1.5 mL 离心管底部； 2. 使用研磨棒旋转挤压叶片 10 次，或搭配手持电动研磨仪研磨 5 s；若无研磨棒可使用移液吸头用力戳破叶片； 3. 加入 100 μ L Nucleic Acid Release Reagent。	
	方案④	1. 取微量植物叶片（1-5 mg）放入 96 孔 PCR 板底部； 2. 使用 96 孔 PCR 板专用磁套用力按压使叶片破碎，观察叶片明显有汁液渗出即可； 3. 加入 100 μ L Nucleic Acid Release Reagent，贴上封板膜。	
	方案⑤	1. 取微量植物叶片（1-5 mg）放入 PCR 8 联管； 2. 使用 8 通道移液器插上吸头戳破叶片即可； 3. 加入 100 μ L Nucleic Acid Release Reagent，盖紧 8 联管盖。	
贴壁细胞	方案⑥	1. 24/48/96 孔板培养细胞：吸除培养基后直接加入 100 μ L Nucleic Acid Release Reagent 冲洗细胞；6/12 孔板、35 mm 培养皿培养细胞：吸除培养基后直接加入 200 μ L Nucleic Acid Release Reagent 冲洗细胞；转移至 PCR 8 联管并盖紧管盖，或转移至 96 孔 PCR 板并贴上封板膜。 2. 60 mm 培养皿及以上规格培养的细胞：需在吸除培养基后使用 PBS 清洗 2 次；加入胰酶消化 2-3 分钟，终止消化后使细胞完全脱落，用移液器小心吸取不超过 20 μ L 细胞转移至 PCR 8 联管中，加入 100 μ L Nucleic Acid Release Reagent。	1. 设置金属浴/水浴/PCR 仪温度 65 $^{\circ}$ C，加热 10 min； 2. 设置烘箱温度 65-75 $^{\circ}$ C，加热 10 min。
悬浮细胞	方案⑦	1. 24/48/96 孔板培养细胞：静置培养板 10 分钟待细胞完全沉入板底后小心吸除培养基，或 800 rpm 离心 3 min 后小心吸除培养基，然后加入 100 μ L Nucleic Acid Release Reagent 冲洗细胞，转移至 PCR 8 联管并盖紧管盖，或转移至 96 孔 PCR 板并贴上封板膜。 2. 6/12 孔板、35 mm 培养皿及以上规格培养细胞：轻轻晃动培养板、培养皿、培养瓶，用移液器小心吸取 0.5 mL 细胞悬液转移至 1.5 mL 离心管中，或 200 μ L 细胞悬液至 PCR 8 联管中；800 rpm 离心 3 min 收集细胞，小心吸除培养基后加入 100 μ L Nucleic Acid Release Reagent 冲洗细胞，盖紧管盖。	
拭子	方案⑧	1. 将干拭子或新采样的拭子投入到 1.5 mL 离心管中，加入 200 μ L Nucleic Acid Release Reagent。在振荡器上充分振荡混匀 10 min。 2. 若拭子样本已保存在保存液当中，则需要吸取 1 mL 保存液于 1.5 mL 离心管中，12,000 rpm 离心 5 min。弃掉上清后加入 100 μ L Nucleic Acid Release Reagent。	
体液	方案⑨	1. 较稀的样本吸取 1 mL 投入到 1.5 mL 离心管中，12,000 rpm 离心 5 min。弃掉上清后加入 100 μ L Nucleic Acid Release Reagent。 2. 较浓稠的样本，则直接吸取 20 μ L 样本加入 100 μ L Nucleic Acid Release Reagent，充分振荡混匀 1 min。	

样本释放后保存

1. 样本释放后产物如果不立即进行下游实验，可暂时放置于 4℃冰箱保存，建议当天使用。
2. 因样本释放 DNA 浓度较高，为了下游 PCR 实验方便，可对释放液进行稀释。稀释液使用 ddH₂O 即可，用户可依据各自实验习惯进行稀释操作。

样本释放后 PCR 扩增

1. 推荐使用 ABclonal 配套 PCR 扩增试剂：RK20729（带染料版）；RK20718（不带染料版）。如使用其他品牌的 PCR 试剂，请依据对应试剂说明书进行配制反应体系及 PCR 程序设置。
2. 模板添加量最优为 0.5 μL 释放液，加入模板超过 0.5 μL 会降低 PCR 效率，过多的 DNA 模板可能导致 PCR 失败；如对释放液进行稀释操作，则模板添加量为（0.5 μL × 稀释倍数）稀释液。
3. 按照下表配制 PCR 反应体系：

组分	加入量
2X PCR Mix	10 μL
上游引物（10 μM）	0.5 μL
下游引物（10 μM）	0.5 μL
DNA 模板	0.5 μL 释放液/（0.5 μL × 稀释倍数）稀释液
Nuclease-free Water	to 20 μL

4. 按照下表设置 PCR 反应程序：

步骤	温度	时间	循环数
预变性	98℃	45 s	1
变性	98℃	10 s	35-40
退火	60℃	30 s	
延伸	72℃	30 s/kb *	
终延伸	72℃	5 min	1
Hold	4℃	5 min	1

*注意延伸时间不要设置过长，最长不超过 45 s/kb，延伸时间延长易引起非特异性扩增。