

突变体鉴定流程

一、 样品 DNA 提取

（一）SDS 法

- 1、 取 3cm 叶片样品分别装入深孔板，每个样品孔 2 颗钢珠，完成后盖上硅胶盖；
- 2、 将深孔板放入液氮冷冻 5 分钟，取出后震荡 1 分钟，使样品充发震碎；
- 3、 小心开启硅胶盖，用吸液枪悬空加入 300ul 1*buffer 提取液，盖上硅胶盖；
- 4、 放入烘箱，65℃处理 90 分钟。

（二）磁珠法

- 1、 取 3cm 叶片样品分别装入深孔板，每个样品孔 2 颗钢珠，完成后盖上硅胶盖；
- 2、 将深孔板底部放入液氮冷冻 5 分钟，用磁棒套将叶片碾碎；
- 3、 每个样品孔悬空加入 200ul CTAB 提取液，盖上硅胶盖；
- 4、 放入烘箱，95℃处理 120 分钟；
- 5、 取出深孔板，打开硅胶盖，每个样品孔悬空分别加入 300ul 无水乙醇和 100ul Binding Buffer (50ml+500ul 磁珠)
- 6、 另取新深孔板每孔加入 400ul 70%酒精，此为漂洗板；
- 7、 另取新深孔板每孔加入 100ul TE 溶液，此为洗脱板；
- 8、 将样品板，漂洗板，洗脱板依次放入核酸提取仪器中进行核酸提取
- 9、 提取完成，洗脱板中为 DNA 样品

二、 PCR 扩增

1、 PCR 扩增体系

ddH₂O 10ul, PCRMix 10ul, F 引物 1ul, R 引物 1ul, DNA 1ul, 合计 23ul。

F 引物和 R 引物可以点击种质编号查询，也可自行设计。

2、 PCR 扩增程序

PCR 反应	反应温度	反应时间	循环次数
预变性	94℃	5min	
变性	95℃	20s	19cycles（每循环降低 0.5℃）
退火	64℃	30s	
延伸	72℃	30s	
变性	95℃	30s	24cycles
退火	54℃	30s	
延伸	72℃	30s	
延伸	72℃	5min	
结束	16℃	--	温度降至 16℃即可结束反应

三、电泳及送测

- 1、 扩增结束后，取 5ul 样品点样电泳
- 2、 查看胶图确认是否有目标条带
- 3、 将扩增产物送 Sanger 测序
- 4、 将测序结果进行突变分析

试剂配制

1、5*buffer 1L:

Tris 12.114g

NaCl 7.3125g

EDTA 4.653g

SDS 2.5g

ddH₂O to 1L

PH=8,使用时稀释5倍为1*buffer

2、binding buffer

Tris-HCl(pH8.0) 10mL/L

EDTA (pH8.0) 2mL/L

NaCl 146.1g/L

PEG 8000 200g/L

Tween 0.5mL/L

3、漂洗液

无水乙醇 70%

4、洗脱液 TE

Tris-HCl pH8 10mM 10ML/L

EDTA 1mM 2ML/L

PH=8

5、2% CTAB 1L:

CTAB 20g

NaCl 81.8g

EDTA 40mL/L

Tris-HCl 100uL/L

ddH₂O to 1L