

版本号:220301

Modified CTAB Plant DNA Kit**改良 CTAB 植物基因组 DNA 快速提取试剂盒**

目录号: DN14

❖ **适用范围:**

适用于快速提取植物组织（包括复杂多糖多酚类植物）和真菌基因组DNA等。

❖ **试剂盒组成、储存、稳定性:**

试剂盒组成	保存	50 次	100 次	200 次
裂解液 PL	室温	30 ml	60 ml	120 ml
结合液 PQ	室温	18 ml	35 ml	70 ml
<i>第一次使用前按说明加指定量乙醇</i>				
抑制物去除液 IR	室温	25 ml	50 ml	100 ml
漂洗液 WB	室温	13 ml	25 ml	50 ml
<i>第一次使用前按说明加指定量乙醇</i>				
洗脱缓冲液 EB	室温	15 ml	15 ml	20 ml
吸附柱 AC	室温	50 个	100 个	200 个
收集管 (2ml)	室温	50 个	100 个	200 个

本试剂盒在室温储存 12 个月不影响使用效果。

储存事项:

1. 裂解液 PL、或者抑制物去除液 IR 低温时可能出现析出和沉淀，可以在 55℃ 水浴几分钟帮助重新溶解，恢复澄清透明后冷却到室温即可使用。结合液 PQ 盐酸胍浓度高，加入乙醇后可能出现一些沉淀不影响使用，直接取上清用。
2. 避免试剂长时间暴露于空气中产生挥发、氧化、pH 值变化，各溶液使用后应及时盖紧盖子。

❖ **产品介绍:**

改进的经典 CTAB 植物 DNA 抽提液内（添加多种针对植物特点的多糖、多酚去除成份）迅速裂解细胞和灭活细胞内核酸酶，氯仿抽提后通过离心清除多糖、多酚和

蛋白质（根据需要，上清中还加入异丙醇离心沉淀基因组 DNA，进一步去除其它各种杂质），然后基因组 DNA 在高离子盐状态下选择性吸附于离心柱内硅基质膜，再通过一系列快速的漂洗—离心的步骤，进一步将多糖、多酚和细胞代谢物、蛋白等杂质去除，最后低盐的洗脱缓冲液将纯净基因组 DNA 从硅基质膜上洗脱。

❖ **产品特点：**

1. 离心吸附柱内硅基质膜全部采用特制吸附膜，柱与柱之间吸附量差异极小，可重复性好。克服了国产试剂盒膜质量不稳定的弊端。
2. 不需要使用有毒的苯酚等试剂，也不需要乙醇沉淀等步骤。
3. 快速，简捷，单个样品操作一般可在 1 小时内完成。
4. 数种去多糖、多酚成份和多次柱漂洗确保高纯度，OD260/OD280 典型的比值达 1.7~1.9，长度可达 20 kb -50kb，可直接用于 PCR，Southern-blot 和各种酶切反应。

❖ **注意事项**

1. **所有的离心步骤均在室温完成**，使用转速可以达到13,000rpm 的传统台式离心机。
2. 开始实验前将需要的水浴先预热到65℃备用。
3. 需要自备氯仿、无水乙醇和β-巯基乙醇。
4. 结合液PQ 和抑制物去除液IR中含有刺激性化合物，操作时要戴乳胶手套，**避免沾染皮肤、眼睛和衣服。若沾染皮肤、眼睛时，要用大量清水或者生理盐水冲洗。**
5. 不同来源的植物组织材料中提取DNA 的量会有差异，一般100mg新鲜组织典型产量可达3-25μg。
6. **洗脱液EB不含有螯合剂EDTA**，不影响下游酶切、连接等反应。**也可以使用水洗脱，但应该确保pH大于7.5**，pH过低影响洗脱效率。用水洗脱DNA应该保存在-20℃。DNA如果需要长期保存，可以用TE缓冲液洗脱（10mM Tris-HCl，1mM EDTA，pH 8.0），但是EDTA可能影响下游酶切反应，使用时可以适当稀释。
7. **本试剂盒是按照标准提取过程配置各溶液体积，如果样品DNA含量低或者产量低，需要扩大提取量，还需要另外购买溶液。**

❖ **标准操作步骤：**（实验前请先阅读注意事项）

提示：

⇒ 第一次使用前请先在漂洗液 WB 和结合液 PQ 中加入指定量的无水乙醇，充分混匀，加入后请及时在方框打钩标记已加入乙醇，以免多次加入！

⇒ 取所需适量裂解液 PL 放置在 65℃ 预热，使用前加入 β-巯基乙醇到终浓度 2%。

1. 取植物新鲜组织约 100 mg 或干重组织约 30 mg，加入液氮充分碾磨成细粉。
2. 将研磨好的粉末迅速转移到预先装有 600 μl 65℃ 预热裂解液 PL 的离心管中（**实验前在预热的 PL 中加入巯基乙醇，使其终浓度为 2%**），迅速颠倒混匀后，将离心管放在 65℃ 水浴 20-30 min，水浴过程中颠倒离心管以混合样品数次。

可选步骤：如果预计样品 RNA 丰富易残留，可在水浴前加入 5-6μl RNA 酶（20mg/ml）。如果组织干燥或者产量低，可以适当延长水浴时间。

注：如果提取的 DNA 残留 RNA 较多导致电泳时候条带拖尾，条带扭曲，背景很高等不正常电泳情况，可以加 1% RNA 酶（10mg/ml）37℃ 或者室温放置半小时即可消化 RNA，消化完后不需要特殊处理便可用于 PCR 或者酶切。

3. 加入 700 μl 氯仿，充分混匀，13,000 rpm 离心 5 min。

可选步骤（一般不需要）：若提取富含多糖多酚或淀粉植物，可在第 3 步前，用 Tris 饱和酚（PH8.0）/氯仿（1：1）等体积抽提一遍。

4. 小心吸取上清（约 600 μl）到一个新的 1.5ml 离心管（注意不要吸到界面物质。）加入 1.5 倍体积结合液 PQ（**请先检查是否已加入无水乙醇!**）后立刻涡旋，充分混匀。
5. 将混匀的液体转入吸附柱 AC 中，13,000 rpm 离心 30 sec，弃掉废液。（吸附柱容积为 700 μl 左右，可分次加入离心。）
6. 加入 500μl 抑制物去除液 IR，13,000 rpm 离心 30 sec，弃废液。
7. 加入 600μl 漂洗液 WB（**请先检查是否已加入无水乙醇!**），13,000 rpm 离心 30 sec，弃掉废液。
8. 重复操作步骤 7。
9. 将吸附柱 AC 放回空收集管中，13,000rpm 离心 2 分钟。尽量除去漂洗液，以免漂洗液中残留乙醇抑制下游反应。

10. 取出吸附柱 AC，放入一个干净的离心管中，在**吸附膜的中间部位**加 50-100 μl 洗脱缓冲液 EB，室温放置 3-5 分钟，13,000rpm 离心 1min。将得到的溶液重新加入离心吸附柱中，室温放置 2 分钟，13,000rpm 离心 1min。

洗脱体积越大，洗脱效率越高，如果预计和需要产量高，可增大洗脱体积，如果需要 DNA 浓度较高，可以适当减少洗脱体积，但是最小体积不应少于 50 μl ，体积过小降低 DNA 洗脱效率，减少 DNA 产量。

如追求最大产量，洗脱缓冲液事先在 80-100 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中预热后再加可以提高产量。

❖ **附录（低 DNA 含量或者产量低样品操作步骤）：**

1. 取适量植物组织（新鲜组织 400 mg 或干重组织 200 mg）在研钵中加入液氮充分碾磨成细粉。
2. 转移细粉到一个 15ml 离心管，不要解冻，加入 9ml 65 $^{\circ}\text{C}$ 预热的裂解液 PL（确认已经加入 β -巯基乙醇至 2%），剧烈涡旋振荡混匀，用大口径枪头吹打帮助裂解。

如果组织裂解困难，可根据需要加一个轻柔匀浆 10 秒的步骤帮助裂解。

3. 室温放置 60 分钟，中间不时颠倒离心管以混合样品数次。

如果组织干燥或者产量低，可以放置在 65 $^{\circ}\text{C}$ 水浴。

4. 加 4.5ml 氯仿，涡旋充分混匀，3,000g 离心 10 分钟。
5. 小心吸取上清到一个新的 15ml 离心管，注意不要吸到界面物质。重复一遍步骤 4。
6. 小心吸取上清到一个新的 15ml 离心管，估算上清量，加入 0.7 倍体积的异丙醇，涡旋混匀来沉淀 DNA。
7. 立刻 3,000g 离心 20 分钟沉淀 DNA，弃上清，颠倒离心管口放在纸巾上控干残留液体，并小心用移液枪吸干沉淀周围残留液体（不要过于干燥 DNA 沉淀）。
8. 加入 300 μl —400 μl 预热到 65 $^{\circ}\text{C}$ 的灭菌水，重新溶解 DNA，可能需要在 65 $^{\circ}\text{C}$ 短暂温育帮助溶解，期间不断轻弹管底帮助溶解。
9. 加入 1.5 倍体积结合液 PQ（450 μl —600 μl ，**请先检查是否已加入无水乙醇!**）后立刻涡旋，充分混匀。
10. 后续步骤和上面标准操作步骤 5 开始后完全一样。