



CTAB 植物基因组 DNA 快速提取试剂盒

产品信息:

试剂盒组成	保存	CZ307-01 100 次
裂解液 PL	室温	40ml×2
结合液 PQ	室温	15ml×2 第一次使用前加入 30ml 无水乙醇
抑制物去除液 IR	室温	50ml
漂洗液 WB	室温	25ml 第一次使用前加入 100ml 无水乙醇
洗脱缓冲液 EB	室温	15ml
Magbead 磁珠	室温	5ml

保存条件: 本试剂盒在室温储存 12 个月不影响使用效果。

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, 然后基因组 DNA 在高离序盐状态下选择性吸附于磁珠上, 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, 最后在低盐的洗脱缓冲液将纯净的基因组 DNA 从磁珠上洗脱下来。

注意事项:

- 裂解液 PL、结合液 PQ 或者抑制物去除液 IR 低温时可能出现析出和沉淀, 可以在 37°C 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。
- 避免试剂长时间暴露于空气中产生挥发、氧化、pH 值变化。
- 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。**
- 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 3-25 μ g。
- 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°C。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。
- 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。**

自备试剂: 氯仿/异戊醇 (体积比 24: 1 混合)、无水乙醇、 β -巯基乙醇、RNase A(10mg/ml)

操作步骤:

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°C 预热, 使用前加入 β -巯基乙醇到终浓度 2%。
- 取适量植物组织 (新鲜组织 100mg 或干重组织 30mg) 在研钵中加入液氮充分碾磨成细粉。
 - 转移细粉到一个 1.5ml 离心管, 不要解冻, 加 600 μ l 65°C 预热的裂解液 PL (确认已加入 β -巯基乙醇至 2%), 剧烈涡旋振荡混匀, 用大口径枪头轻柔吹打帮助裂解。(为了避免 RNA 的干扰此步骤可加 6 μ l RNase A(10 mg/ml), 我公司提供 RNase A(10 mg/ml) 1ml, 可单独购买)
 - 65°C 水浴 20-60 min, 在水浴过程中颠倒离心管以混合样品数次。
 - 加入 700 μ l 氯仿/异戊醇 (体积比 24: 1 混合), 颠倒充分混匀几分钟 (或者涡旋混匀), 12,000rpm 离心 5 min。
若提取的植物组织富含多糖多酚, 可以在第 4 步前用等体积酚/氯仿 (1: 1) 抽提。
 - 小心吸取上清到一个新的 1.5ml 离心管, 注意不要吸到界面物质。
如上清比较浑浊, 则需要重复步骤 4 一遍, 直到得到透亮上清。
 - 较精确估算上清量, 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。此时可能出现沉淀, 但不影响实验结果。

- 向混合物（包括可能出现的沉淀）中加入 50 μ l 的 Magbead 磁珠。
- 将离心管放在合适型号的振荡器上，振荡结合 5 min(或者将离心管颠倒混匀 10 sec)。
注意：设定的震荡速度一定要将磁珠完全震荡起来，让磁珠充分捕获质粒 DNA。
- 将离心管放于磁力架上静置 2 min，待磁珠完全吸附于离心管的侧壁上后，带着磁力架倒转离心管快速倒掉上清（保持离心管固定在磁力架上），或用移液器吸出上清。
- 加入 500 μ l 抑制物去除液 IR，涡旋震荡 10 sec，使磁珠充分悬浮于漂洗液 IR 中(或者将离心管颠倒混匀 10 sec)。
- 振荡结束后，用手甩，将粘在盖上的磁珠和液滴甩下。
- 将离心管放于磁力架上静置 2 min，待磁珠完全吸附于离心管侧壁上后，带着磁力架倒转离心管快速倒掉上清（保持离心管固定在磁力架上），或用移液器吸出上清。
- 加入 500 μ l 漂洗液 WB（加入无水乙醇!），涡旋震荡 10 sec，使磁珠充分悬浮于漂洗液 WB 中(或者将离心管颠倒混匀 10 sec)。
- 振荡结束后，用手甩，将粘在盖上的磁珠和液滴甩下。
- 将离心管放于磁力架上静置 2 min，待磁珠完全吸附于离心管侧壁上后，带着磁力架倒转离心管快速倒掉上清（保持离心管固定在磁力架上），或用移液器吸出上清。
- 重复操作步骤 13-15。
- 保持离心管固定于磁力架上，待磁珠完全吸附于离心管侧壁上后，用移液器小心吸掉管底和管盖上的残余液体（一旦吸到磁珠，可以打掉液体再让磁铁吸附一下磁珠）。敞开口室温放置 15 min 以挥发乙醇。也可用电风扇对着离心管口吹风以加速乙醇挥发，以肉眼观察不到离心管底部有液滴残留时为止。乙醇挥发过程中需避免磁珠的过度干燥。
- 从磁力架上小心取下离心管置于普通离心管架上，向每个离心管中加入 50-100 μ l 的洗脱缓冲液 EB 或去离子水，涡旋震荡保证磁珠完全悬浮于洗脱缓冲液 EB 或去离子水中。室温静置放置 1min。
- 将离心管放置在磁力架上静置 2 min，待磁珠完全吸附于离心管侧壁上后，用吸头将 40-90 μ l 液体到一个新的 1.5ml 的离心管中。
注意：1.不要吸到磁珠；2.装质粒 DNA 的离心管与带磁珠的离心管一一对应。

附录（低 DNA 含量或者产量低样品操作步骤）：

- 取适量植物组织（新鲜组织 400mg 或干重组组织 200mg）在研钵中加入液氮充分碾磨成细粉。
- 转移细粉到一个 15ml 离心管，不要解冻，加入 9ml 65 $^{\circ}$ 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。（为了避免 RNA 的干扰此步骤可加 90 μ l RNase A(10 mg/ml)，我公司提供 RNase A(10 mg/ml) 1ml，可单独购买）
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。
- 室温放置 60min，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 $^{\circ}$ C 水浴。
- 加 4.5ml 氯仿/异戊醇（体积比 24: 1 混合），涡旋充分混匀，3,000g 离心 10 min。
- 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。
- 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。
- 立刻 3,000g 离心 20 min 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）。
- 加经 65 $^{\circ}$ C 预热的 300 μ l-400 μ l 灭菌水，重新溶解 DNA，可能需要在 65 $^{\circ}$ C 短暂温育帮助溶解，期间不断轻弹管底帮助溶解。
- 加入 1.5 倍体积结合液 PQ（450 μ l-600 μ l，**请先检查是否已加入无水乙醇!**）后立刻涡旋，充分混匀。此时可能出现沉淀，但不影响实验结果。
- 后续步骤和上面标准操作步骤 7 开始后完全一样。