

CTAB 植物基因组 DNA 快速提取试剂盒

Plant Rapid Genomic DNA Kit



产品信息:

试剂盒组成	保存	DL114-01 100 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×2 第一次使用前加入 100ml 无水乙醇
洗脱缓冲液 EB	室温	15ml
吸附柱 AC	室温	100 个
收集管 (2ml)	室温	100 个

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, 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. 提取纯度高, OD_{260}/OD_{280} 典型的比值达 1.7~1.9。
2. 简单快速, 单个样品操作一般可在 1 小时内。

注意事项:

1. 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。
2. 避免试剂长时间暴露于空气中产生挥发、氧化、pH 值变化。

3. 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。**
4. **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。
5. 本试剂盒是按照标准提取过程配置各种溶液，如果DNA样品含量低或者产量低，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℃ 预热，使用前加入 β -巯基乙醇到终浓度为 2%。
1. 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。
 2. 转移细粉到一个 1.5ml 离心管，不要解冻，加入 600 μ l 已经 65℃ 预热的裂解液 PL（确认已加入 β -巯基乙醇为 2%），剧烈涡旋振荡混匀，用大口径枪头轻柔敲打帮助裂解。**（注意:为了防止 RNA 酶的干扰,可加入 6 μ l 的 10mg/ml 的 RNA 酶,室温放置 5 min）**
 3. 65℃ 水浴 20-60 min，在水浴过程中颠倒离心管以混合样品数次。
 4. 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。

5. 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。

6. 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。
7. 将上一步所得混合物（包括可能出现的沉淀）加入一个吸附柱 AC 中，（吸附柱放入收集管中）12,000rpm 离心 30 sec，倒掉收集管中的废液（先加 700 μ l 离心，弃废液，再加入剩余的溶液，再次离心）。
8. 加入 500 μ l 抑制物去除液 IR，12,000rpm 离心 30 sec，弃废液。
9. 加入 500 μ l 漂洗液 WB **（加入无水乙醇!）**，12,000rpm 离心 30 sec，弃掉废液。
10. 重复操作步骤 9。

11. 将吸附柱 AC 放回空收集管中，12,000rpm 离心 2 min，将吸附柱置于室温放置数分钟，以彻底晾干吸附材料中残余的漂洗液，以免漂洗液中残留乙醇抑制下游反应。
12. 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 100 μ l 洗脱缓冲液 EB（洗脱缓冲液事先在 65 $^{\circ}$ C 水浴中预热），室温放置 2-5 min，12,000rpm 离心 1 min。将得到的溶液重新加入离心吸附柱中，室温放置 2 min，12,000rpm 离心 1 min。（**注意：DNA 产物应保存在-20 $^{\circ}$ C，以防 DNA 降解**）

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 或干重组织 200mg）在研钵中加入液氮充分碾磨成细粉。

a. 转移细粉到一个 15ml 离心管，不要解冻，加入 9ml 已经 65 $^{\circ}$ C 预热的裂解液 PL（确认已经加入 β -巯基乙醇为 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 sec 的步骤帮助裂解。（注意：为了防止 RNA 酶的干扰，可加入 90 μ l 的 10mg/ml 的 RNA 酶，室温放置 5min）**

b. 室温放置 1 h，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。

c. 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。

d. 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。

e. 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。

f. 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）。

g. 加入 300 μ l—400 μ l 预热到 65 $^{\circ}$ C 的灭菌水，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。

h. 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。

i. 后续步骤和上面标准操作步骤 7 开始后完全一样。

BM190311