



北京博凌科为生物科技有限公司

Beijing BLKW Biotechnology Co., Ltd.

Tel: 010-57158602/52872342/80773165 (Fax)

[Http://www.blkwbio.com/](http://www.blkwbio.com/)

E-mail: blkwbio@blkwbio.com

- ◆ CTAB植物基因组DNA快速提取试剂盒
- ◆ 目录号 1414
- ◆ 使用手册
- ◆ 实验室使用，仅用于体外

CTAB 植物基因组 DNA 快速提取试剂盒

目录号: 1414

目录编号	包装单位
141401	50次
141402	100次
141403	200次

❖ **适用范围:**

适用于快速提取植物基因组DNA

❖ **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	40 ml	80 ml	75ml 1×2
结合液 PQ	室温	15 ml	25 ml	25 ml×2 <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	100ml
漂洗液 WB	室温	15 ml	25ml	25ml×2 <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	40 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、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 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。
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 在高离序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进口特制吸附膜，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 30 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，如Eppendorf 5415C 或者类似离心机。
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/异戊醇（体积比24：1混合）、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. 取适量植物组织（新鲜组织 100 mg 或干重组织 30 mg）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 600μl 65℃ 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。
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. 65℃ 水浴 20-60 分钟，在水浴过程中颠倒离心管以混合样品数次。

可选：如果组织干燥或者产量低，可以适当延长水浴时间。如果 RNA 残留多，可在水浴前加入 6μl RNA 酶（20mg/ml）。

4. 加入 700μl 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），13,000rpm 离心 5 分钟。

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）抽提一遍。

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) 13,000rpm 离心 30 秒, 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 秒, 弃废液。
9. 加入 700 μ l 漂洗液 WB (请先检查是否已加入无水乙醇!), 12,000rpm 离心 30 秒, 弃掉废液。
10. 加入 500 μ l 漂洗液 WB, 12,000rpm 离心 30 秒, 弃掉废液。
11. 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。
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 65-70 $^{\circ}$ C 水浴中预热), 室温放置 3-5 分钟, 12,000rpm 离心 1 分钟。将得到的溶液重新加入离心吸附柱中, 室温放置 2 分钟, 12,000rpm 离心 1 分钟。
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 μ l, 体积过小降低 DNA 洗脱效率, 减少 DNA 产量。
13. DNA 可以存放在 2-8 $^{\circ}$ C, 如果要长时间存放, 可以放置在 -20 $^{\circ}$ C。



❖ **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℃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℃水浴。

4. 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 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 300μl—400μl 预热到 65℃的灭菌水，重新溶解 DNA，可能需要在 65℃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（450μl—600μl，**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。
10. 后续步骤和上面标准操作步骤 7 开始后完全一样。

