

**公司产品仅供科学研究使用、不得用于临床诊断！**

**商品属性：**

产品名称	规格	货号
CTAB植物DNA提取缓冲液	500ml	P-PR1045

**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，OD260/OD280 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°C。DNA 如果需要长期保存，可以用 TE 缓冲液洗脱（10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH8.0），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°C 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 600μl 已经 65°C 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，用大口径枪头轻柔吹打帮助裂解。

（注意：为了防止 RNA 酶的干扰，可加入 6μl 的 10mg/ml 的 RNA 酶，室温放置 5 min）

3.65°C 水浴 20-60 min，在水浴过程中颠倒离心管以混合样品数次。

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），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 700μl 离心，弃废液，再加入剩余的溶液，再次离心）。

8.加入 500μl 抑制物去除液 IR，12,000rpm 离心 30 sec，弃废液。

9.加入 500 $\mu$ 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 $\mu$ 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 $\beta$ -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 $\mu$ 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 $\mu$ l-400 $\mu$ 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 $\mu$ l-600 $\mu$ 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。