

AipBest CTAB 植物基因组 DNA 快速大量提取试剂盒(离心柱型)
AipBest CTAB Plant Genomic DNA Rapid Maxi Kit(Centrifugal Column)

使用说明书

◆目录号：PD203

目录编号	包装单位
PD203-01	10次

◆试剂盒组成、储存、稳定性：

试剂盒组成	保存	10 次(PD203-01)
裂解液 PL	室温	100mL
结合液 PQ	室温	30mL x 2 第一次使用前按说明加指定量乙醇
抑制物去除液 IR	室温	100mL
漂洗液 WB	室温	25mL x 2 第一次使用前按说明加指定量乙醇
洗脱缓冲液 EB	室温	15mL x 2
吸附柱 AC 和收集管(50mL)	室温	10 套

◆适用范围：适用于快速提取植物基因组 DNA。

◆产品储存：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°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，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，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. 操作安全，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. 快速简便，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 30kb -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 9,000xg，可容纳 50mL 离心管的台式离心机。
2. 开始实验前将需要的水浴先预热到 65°C 备用。
3. 需要自备氯仿或者氯仿/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 3-25 μ g。
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°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。

◆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°C 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 1-2 克或干重组织 0.3-0.4 克)在研钵中加入液氮充分碾磨成细粉。
2. 转移细粉到一个 50mL 离心管，不要解冻，加 10mL 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，用大口径枪头轻柔敲打帮助裂解。
注: 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°C 水浴 30-60 分钟，在水浴过程中颠倒离心管以混合样品数次。

可选步骤 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 100 μ L RNA 酶(20mg/mL)。

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。

注：加入 10mL 氯仿或者氯仿/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)，9,000xg 以上离心 10 分钟。

注：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。

4. 小心吸取上清到一个新的 50mL 离心管，注意不要吸到界面物质。

注：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。

5. 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。

6. 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)静置 2 分钟，9,000xg 离心 2 分钟，倒掉收集管中的废液(每次最多可加 20mL 混合物离心，弃废液，再加入剩余的溶液，再次离心)。

7. 加入 10mL 抑制物去除液 IR，9,000xg 离心 2 分钟，弃废液。

8. 加入 10mL 漂洗液 WB(请先检查是否已加入无水乙醇!)，9,000xg 离心 2 分钟，弃掉废液。

9. 重复操作步骤 9 一遍。

10. 将吸附柱 AC 放回空收集管中，最高速(最好大于 9000xg，如果离心机转速低，需要相应延长离心时间)离心 10-15 分钟以干燥膜基质残留乙醇，用枪头吸除内圈压环和柱壁之间可能残留的乙醇，室温或者烘箱晾干几分钟。

注：该步骤目的为彻底去除吸附柱中残留乙醇，残留乙醇抑制下游反应并且严重降低洗脱效率，降低 DNA 产量。如果洗脱产量低，则必须加做步骤 12。

11. **可选步骤：**选择以下两种方法之一干燥柱子：

- 1) 取下柱子放置于真空容器中，密封真空容器，提供真空 15 分钟；
- 2) 将柱子放置于 60-65℃ 真空干燥箱或烘箱中，放置 10-15 分钟。

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 1.5-2mL 洗脱缓冲液 EB(洗脱缓冲液事先在 65-70℃ 水浴中预热效果更好)，室温放置 3-5 分钟，9,000xg 离心 4-5 分钟。如果需要较多量 DNA，可将得到的溶液重新加入离心吸附柱中，离心 2 分钟。

注：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 1mL，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°C，如果要长时间存放，可以放置在 -20°C。

=====

