

# 新型快速植物基因组DNA提取试剂盒（离心柱型）

目录号: GK1051-50 (50次)

用于快速提取植物基因组DNA

## 一、试剂盒组成、储存

试剂盒组成	保存	50次 (GK1051-50)
Buffer P1	-20℃ (长期) 室温 (1-3个月)	30 ml
Buffer P2	室温	7 ml
Buffer P3	室温	50 ml
RNase A	-20℃	200 ul
漂洗液 WB <sup>△</sup>	室温	15 ml
洗脱缓冲液 EB	室温	15 ml
分离柱 A	室温	50 个
吸附柱 AC	室温	50 个
收集管 (2ml)	室温	50 个

△: 第一次使用前按说明加指定量乙醇

## 注意事项

- 第一次使用前请先在 15ml 漂洗液 WB 中加入 60ml 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！
- Buffer P1、Buffer P3 低温时可能出现析出和沉淀，可以在 37℃ 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，各溶液使用后应及时盖紧盖子。

## 二、原理简介

改进的 CTAB 植物 DNA 抽提液(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，上清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基因组 DNA 从硅基质膜上洗脱。

## 三、试剂盒特点

- 离心吸附柱内硅基质膜全部采用进口特制吸附膜，可重复性好。克服了国产试剂盒膜质量不稳定的弊端。不需要使用有毒的苯酚，氯仿等试剂。
- 快速，简捷，单个样品操作一般可在 1 小时内完成。

- 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。

## 四、注意事项（实验前必须首先阅读这部分!）

- 所有的离心步骤均在室温完成，使用转速可以达到 13,000 rpm 的传统台式离心机，如 Eppendorf 5415C 或者类似离心机。
- 开始实验前将需要水浴的物品先预热到 65℃ 备用。
- 需要自备 β-巯基乙醇。
- Buffer P3 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的 DNA 的量会有差异，一般 100mg 新鲜组织典型产量可达 3-25μg。
- 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。

## 五、操作步骤

\* 第一次使用前请先在 15ml 漂洗液 WB 中加入 60ml 无水乙醇!

\* 将 Buffer P1 放置在 65°C 水浴, 使用前加入  $\beta$ -巯基乙醇到终浓度 0.2%。

1. 加热 Buffer P1 到 65°C。
2. 取适量植物组织在研钵中加入液氮充分碾磨成细粉。
3. 转移细粉 (植物新鲜组织 100 mg 或干重组织 30 mg) 到一个 1.5ml 离心管, 不要解冻, 加入 550 $\mu$ l 65°C 预热 Buffer P1 (已经加入  $\beta$ -巯基乙醇至 0.2%) 和 4 $\mu$ l RNase A 剧烈涡旋振荡混匀 1 分钟, 室温放置 10 分钟。
4. 加入 130 $\mu$ l 的 Buffer P2, 充分混匀, 12000rpm 离心 3 分钟。
5. 小心吸取上清到一个分离柱 A, 注意不要吸到界面物质, 12,000 rpm 离心 1 分钟, 收集下液。
6. 加入 1.5 倍体积的 Buffer P3 立刻轻柔涡旋, 充分混匀。
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) 12,000 rpm 离心

1 分钟, 倒掉收集管中的废液。

8. 加入 700 $\mu$ l 漂洗液 WB (请先检查是否已加入无水乙醇!), 12,000 rpm 离心 1 分钟, 弃掉废液。
9. 加入 500 $\mu$ l 漂洗液 WB, 12,000 rpm 离心 1 分钟, 弃掉废液。
10. 将吸附柱 AC 放回空收集管中, 13,000 rpm 离心 3-5 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。
11. 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 50 $\mu$ l 洗脱缓冲液 EB (洗脱缓冲液事先在 65-70°C 水浴中预热), 室温放置 3-5 分钟, 12,000 rpm 离心 1 分钟收集 DNA。  
**洗脱体积越大, 洗脱效率越高, 可以 50  $\mu$ l 分两次洗脱, 可以提高洗脱效率。**
12. DNA 可以存放在 2-8°C, 如果要长时间存放, 可以放置在 -20°C。

## 六、疑难解答 (Trouble shooting)

出现的问题	可能的原因	建议解决方法
DNA 产量低	处理材料过量或者裂解不完全	使用适量的起始材料, 充分研磨或者匀浆
RNA 残留	植物含量 RNA 太丰富	在步骤 3 后裂解物中加 4 $\mu$ l RNase, 也可以多加到 8 $\mu$ l RNase
未提取到 DNA	漂洗液 WB 中忘记加无水乙醇	<b>第一次实验时, 在漂洗液 WB 中加入指定量无水乙醇</b>
洗脱下来的 DNA 溶液带颜色或膜上有明显的色素	漂洗次数不够	步骤 7 完成后, 加 500 $\mu$ l WB 或无水乙醇再漂洗一遍
	起始材料太多过量	减少起始处理材料, 不要过量
洗脱下来的 DNA 产量低	离心柱残留有较多乙醇或者底部不慎沾有乙醇	确保做了步骤 10, 否则残留乙醇会影响洗脱效率
	使用了水或者其它非最佳液体代替洗脱缓冲液	仔细阅读步骤 10 和只使用洗脱缓冲液 EB 洗脱
$A_{260}$ 吸光值异常偏高	一些硅基质膜成分一起洗脱下来, 干扰了吸光值	将洗脱的基因组 DNA 溶液 13,000rpm 再离心一分钟, 小心取上清使用
DNA 下游酶切不能切开或者酶切不完全	一些硅基质膜成分一起洗脱下来, 抑制了酶切反应	将洗脱的基因组 DNA 溶液 13,000rpm 再离心一分钟, 小心取上清使用
	离心柱残留有较多乙醇或者底部不慎沾有乙醇抑制了酶切反应	确保做了步骤 10, 然后空气中晾几分钟, 让残留乙醇挥发

### Product Use Limitation:

*This product is developed, designed and sold exclusively for research purpose and in vitro use only.*