

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
	裂解物和 Buffer P3 比例不对	精确估算裂解物离心上清的量，加准确体积的 Buffer P3
RNA 残留	植物含量 RNA 太丰富	在步骤 2 后裂解物中多加 RNase 至终浓度 200 μ g/ml，充分混匀。
未提取到 DNA	漂洗液 WB 中忘记加无水乙醇	第一次实验时，在漂洗液 WB 中加入指定量无水乙醇。
离心柱堵塞	研磨裂解不充分，团块多	参见步骤 3，加一个离心步骤去除
	裂解物太粘稠	减低起始材料量，不要处理过量
	离心力太小	加大离心力
洗脱下来的 DNA 溶液带颜色或者膜上有明显的色素残留	漂洗次数不够	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重沾有乙醇	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 11 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 4,000g 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 4,000g 再离心一分钟，小心取上清使用。

二、原理简介

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，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。

三、试剂盒特点

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 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！）

1. 所有的离心步骤均在室温完成，使用离心力可以达到13,000rpm的高速离心机。
2. 开始实验前将需要的水浴先预热到 65℃ 备用。
3. 需要自备 β -巯基乙醇。
4. 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。
5. 不同来源的植物组织材料中提取的DNA 的量会有差异，一般1g新

鲜组织典型产量可达30-250 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 $^{\circ}$ 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。
7. 在往吸附柱 AC 和分离柱 A 中加入液体时请沿内壁加入以免冲破膜。

五、操作步骤

* 第一次使用前请先在漂洗液 WB 中加入指定量无水乙醇!

* 将 Buffer P1 放置在 65 $^{\circ}$ C 预热,使用前加入 β -巯基乙醇到终浓度 0.2%。

1. 加热 Buffer P1 到 65 $^{\circ}$ C, 预热灭菌去离子水。
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 1g 或干重组织 300 mg) 到一个 50ml 离心管, 不要解冻, 迅速加入 5.5ml 65 $^{\circ}$ C 预热 Buffer P1(已经加入 β -巯基乙醇至 0.2%)和 40 μ lRNase A 剧烈涡旋振荡混匀 1 分钟, 室温放置 10 分钟。
4. 加入 1.3ml 的 Buffer P2, 充分混匀, 10,000 rpm 以上离心 10 分钟。
5. 小心吸取上清到一个分离柱 A(沿柱内壁加入), 注意不要吸到界面物质, 4,000 rpm 离心 3-5 分钟, 收集下液。

此步只为去除上清中可能出现的细胞碎片, 如果上清很清澈, 可以不进行此步, 直接进行步骤 6.分离柱 A 中的膜为纤维质膜, 在柱中可能出现卷曲、不平整。但不影响过滤。

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) 沿柱内壁加入到一个吸附柱 AC 中 (柱容 10ml,溶液太多可分两次加入), (吸附柱放入收集管中)静置 1 分钟, 10,000 rpm 离心 1 分钟, 倒掉收集管中的废液。
8. 将吸附柱移到新的收集管中并加入 7ml 漂洗液 WB (**请先检查是否已加入无水乙醇!**), 10,000 rpm 离心 1 分钟, 倒掉收集管中的废液。
9. 重复步骤 8。
10. 将吸附柱 AC 放回空收集管中, 10,000 rpm 离心 3 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, 敞开口室温放置 5-10 分钟, 让残留乙醇充分挥发, 在**吸附膜的中间部位**加 1-2ml 洗脱缓冲液 EB (洗脱缓冲液事先在 65-70 $^{\circ}$ C 水浴中预热,能提高洗脱效率), 室温放置 5 分钟, 12,000 rpm 离心 3 分钟。
洗脱体积越大, 洗脱效率越高, 如果需要产量高, 可增大洗脱体积或者将第一次洗脱下来的液体重新加回到吸附膜中进行二次洗脱, 如果需要 DNA 浓度较高, 可以适当减少洗脱体积。
12. 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。