天净沙系列

CAT#:211247

一部分常温运输和保存

一部分低温运输和保存

有效期一年

植物叶绿体DNA纯化试剂盒

Plant Chloroplast DNA Purification Kit

使用手册 V1.0

北京天净沙基因科技有限公司

网址：www.tjs.bio；电话：400-1078566；电邮：order@tjs.bio

产品及特点

本试剂盒是结合植物叶绿体纯化试剂盒和柱式植物 DNA 抽提试剂盒而推出的新兴产品，专门用于植物叶绿体 DNA 的快速提取。它具有下列特点：

1. 纯度高，不含污染和抑制剂，可以直接用于酶切、PCR、real-time PCR、multiplex PCR、RAPD、RFLP、AFLP、Southern Blotting、microsatellite analysis 等各种后续分子生物学实验，不会发生离心柱堵塞现象。
2. 产率一般在 1-2 μg/1 g 叶片样品。OD260/280 一般在 1.8 以上。DNA 片段长度一般在 40-50 Kb 左右。
3. 本产品足够 15 次提取，每次可处理 30 g 叶片。
4. 已经成功用于菠菜，大豆，莴笋，白菜，烟草和甜菜等双子叶植物，也适用于单子叶等其他植物（可能需要优化条件）。

规格及成分

试剂盒第一部分，编号 211247pt1，常温运输和保存。大扁盒包装。

成份	编号	规格	包装
叶绿体纯化匀浆液成分一	211255a1	250 mL×2	250 mL 本色瓶
Percoll	CAS:65455-52-9	60 mL	60 mL 本色瓶
带柄尼龙筛	211245d	1 个	自有包装
软毛笔	211245e	1 只	无包装
细胞器 DNA 纯化溶液 A	211254a	15 mL	15 mL 本色瓶
细胞器 DNA 纯化溶液 B	211254b	7.5 mL	10 mL 本色瓶
细胞器 DNA 纯化溶液 C	211254c	30 mL	30 mL 本色瓶
离心吸附柱	220144	15 套	自封袋
通用洗柱液	220143	15 mL	15 mL 本色瓶
DNA 洗脱液（基因组纯化专用）	220125	10 mL	10 mL 本色瓶
使用手册	211247sc	1 份	无

试剂盒第二部分，编号 211247pt2，低温运输，4℃保存。Logo 热封袋包装。

成份	编号	规格	包装
叶绿体纯化匀浆液成分二	211255a2	3 g	10 mL 本色瓶

运输及保存

常温运输和保存，但匀浆液成分二长期保存时需要放 4℃。保存期限一年。

自备物品

去离子水、氯仿、Waring 匀浆机、烧杯、量筒

使用方法

注意：叶绿体对温度高度敏感，所以整个操作必须在冰上或者在冷室进行，所用器皿和溶液均需要在 4℃预冷。离心时一定要在 4℃进行，离心力以 g 而不是 rpm 计算。如果需要研究

叶绿体的功能，提取还需要在昏暗的光线条件下进行。强烈建议用显微镜监控整个过程中叶绿体的回收情况。

一：叶绿体的纯化

1. 实验前 1-2 天将植物放在暗室培养以减少叶绿体中淀粉颗粒的形成，否则离心时这些颗粒很容易使叶绿体破裂。叶片在实验前需先用自来水洗净，再用蒸馏水淋洗，去掉多余水分。如果叶片采集后不能立即处理，则保存时需要保持叶片湿润，即使如此，叶片的放置时间也不能超过一天。
2. 计算所需匀浆液的体积。本试剂盒一次实验可处理 30 g 叶片，对植物，每克叶片需要准备 4 mL 匀浆液，则一次实验需准备 120 mL 匀浆液。对烟草和大豆，每克叶片需要 6 mL 匀浆液，则一次实验需准备 180 mL 匀浆液。为了保险最好可以多配 10%。
3. 实验当天制备匀浆液。制备方法是：将自备的去离子水与叶绿体纯化匀浆液成分一在干净的玻璃或塑料容器中按 4：1 的比例混合，然后在每 100 mL 混合液中加入匀浆液成分二干粉 0.1 g（终浓度为 0.1%），轻柔搅拌 10 分钟后，所得溶液即为匀浆液。冰上预冷待用。匀浆液只能当天使用，不能放置。
4. 预留 1.5 mL 匀浆液用于悬浮叶绿体，其余匀浆液转移到 Waring 匀浆机（即家用制备果汁的匀浆机）中，再快速将新鲜植物叶片的叶脉去除，再将叶片剪成 1-3 cm^2 大小的碎片，浸泡在匀浆机里面的匀浆液中。
5. 低速匀浆 10 秒，避免起泡沫。用玻璃棒把液面的叶碎片按入到匀浆机底部，再低速匀浆 10 秒。注意：理论上可用 Dounce 玻璃匀浆器，Polytron 匀浆机和研磨（加玻璃珠）等匀浆，但它们单次处理量小，需分成很多份处理后再汇集，非常不方便。
6. 用试剂盒提供的带柄尼龙滤筛过滤匀浆液，用预冷的 200 mL 量筒收集穿透液，再等分到 4 个预冷的 50 mL 的塑料离心管中（每个管中的穿透液不要超过 35 mL）。带柄尼龙滤筛洗涤干净后可反复使用。
7. 在水平转子离心机上 4℃ 200×g 离心 3 分钟（对菠菜，白菜和莴笋材料）或 400×g 离心 1 分钟（对甜菜材料），白色沉淀为未破裂的细胞或细胞核。其他植物材料则需要用户自己摸索最佳离心力。
8. 将上清液（含叶绿体）转移到一个新的、预冷的 50 mL 塑料离心管中。
9. 在水平转子离心机上 4℃ 1000×g 离心 7 分钟，小心弃上清，沉淀含叶绿体。
10. 在沉淀中加入第 4 步预留的 1.5 mL 预冷匀浆液，用软毛笔使叶绿体重悬，如果有白色淀粉沉淀，重悬时避免重悬白色淀粉。注意：重悬时不能要用枪头吹打，否则叶绿体容易破裂。

	11. 将 4 管叶绿体重悬液汇集（共约 6 mL），得到叶绿体粗提液。 12. 如果对叶绿体 DNA 是否含细胞核 DNA 的要求不高，则叶绿体粗提液可以直接用于叶绿体 DNA 纯化，具体操作是在水平转子离心机上 4℃ 1000×g 离心 7 分钟，小心弃上清，沉淀为叶绿体，直接用于 DNA 纯化（见第二步）。 13. 如果需要无细胞核 DNA 污染的叶绿体 DNA，则按以下流程操作：在 50 mL 塑料离心管中先加入 6 mL 匀浆液成分一和 4 mL 的 Percoll,充分混合均匀得 40%的 Percoll 溶液，在其液面上小心铺上 6 mL 的叶绿体粗提液，在水平转子离心机上 4℃ 1700×g 离心 6 分钟，管底绿色沉淀为完整的叶绿体，液面的绿色部分为破碎的叶绿体。小心将上清去除后，直接将沉淀（完整叶绿体）用于叶绿体 DNA 纯化（见第二步）。 **二：叶绿体 DNA 的纯化** 14. 将 600 μL 预热的溶液 A 加入到叶绿体沉淀中后充分吹打混匀。注意：溶液 A 和溶液 B 容易产生沉淀，溶液 B 十分粘稠，均需 65℃溶解并摇匀后待用。 15. 加 300 μL 预热的溶液 B，震荡混匀 10-30 秒。注意：溶液 B 粘稠，可采取称量方法称取 300 mg(约等于 300 μL)使用或将 1 mL 枪头剪去一截后再吸取 300 μL 使用。 16. 65℃放置 3-5 分钟。如果室温放置，DNA 产量会降低 10-20%。 17. 加入 200 μL 自备氯仿，震荡混匀 10-30 秒。12,000×g 室温离心 2 分钟。此时上清液将变得透明，中间层有白膜。小心转移上清液（约 0.8 mL）到一个新的 3-5 mL 离心管中，避免触及中间层的白膜，可留少量上清不取。注意：此步可以省略，但得到的 DNA 纯度偏低，杂质较多，但不影响 PCR 扩增。 18. 加入 1.5 倍体积（约 1.2 mL）的溶液 C，颠倒混匀后 12,000×g 离心 1 min，取上清转移 0.7 mL 到离心吸附柱中，室温放置至少 2 分钟。12,000×g 室温离心 1 分钟，DNA 将吸附在离心吸附柱的膜上，倒弃收集管中的穿透液。再将剩余的溶液按上步方法上柱。 19. 将 0.5 mL 通用洗柱液加入到吸附柱中，12,000×g 室温离心 1 分钟，弃穿透液。重复操作一次。空甩半分钟去除残留液体。 20. 将离心吸附柱放置在一新的 1.5 mL 塑料离心管中，加 50-100 μL DNA 洗脱液 2.0，室温放置 3-5 分钟。 21. 12,000×g 室温离心 1 分钟即得植物叶绿体 DNA 溶液，直接取 5-10 μL 电泳检测，其余放冰箱备用。
关联产品	植物叶绿体纯化试剂盒