# CTAB提取法

**1 实验目的**

本实验流程是适用于多糖多酚类植物RNA转录组、RNA-seq测序建库前期所用样品RNA提取的标准化操作流程（SOP），作为客户提供新鲜样品提取RNA的标准操作指南所涉及的生产试验条件及过程必须严格按照本实验流程进行。

**2适用范围**

本标准操作规程适用于多糖多酚类植物RNA提取，非此类样品RNA的提取流程与本标准操作规程不同，须按照其它样品RNA提取操作规程进行。

**3 实验原理**

总RNA提取的原理就是通过裂解液将细胞裂解，释放出RNA，并通过多次抽提去除蛋白、多糖多酚等杂质，最终获得高纯度的RNA的过程。

**4 实验仪器**

高速离心机、水浴锅、振荡器

5 试剂耗材

|  |  |
| --- | --- |
| 试剂 | 用量 |
| CTAB | 900ul |
| β-巯基乙醇 | 20ul |
| 氯仿：异戊醇(24:1) | 3ml |
| 异丙醇 | 700ul |
| 75%乙醇 | 2ml |

6 操作步骤

1. 取 900ul提取缓冲液和20uβ-巯基乙醇加入2ml离心管中，预热至 65℃。
2. 按照客户要求将样本用液氮迅速研磨至粉末状。
3. 迅速将50-100mg粉末状样品转入预热的提取缓冲液中，涡旋振荡器混匀，65℃水浴10min。
4. 水浴结束后，冷却至室温。
5. 向离心管中加入等体积氯仿：异戊醇(24:1)，涡旋振荡器充分混匀，冰浴10min。注：第一次加入氯仿：异戊醇(24:1)后，不能用涡旋振荡器充分混匀，因为65℃水浴时使EP管软化，盖子变松，剧烈震荡时会发生漏液，此时采取的震荡方式为用食指和拇指紧按EP管两端，摇晃混匀。
6. 离心管在4℃下13000rpm离心5min。
7. 取上清，转入新的2ml离心管，重复操作(5)、(6)。 注：如果中间层仍有物质，可以继续重复步骤（5）和（6），直至中间层较干净为止（但最多抽提4次，过柱时抽提3次，否组次数太多会降解）。
8. 取上清，转入新的1.5ml离心管（离心管上标明项目名称、样品名称和日期）中，加入等体积的异丙醇，颠倒混匀，-80 ºC放置20min。
9. 4℃，13000rpm离心10 min。弃掉上清，注意不要倒出沉淀。
10. 向RNA 沉淀中加入1ml 75％乙醇，颠倒混匀5s，4ºC，13000rpm离心5min，弃上清。
11. 重复步骤7
12. 4ºC，13000rpm离心1min，用枪头小心吸弃多余液体。

将RNA沉淀置于超净工作台吹干，约1-2min（不易太干，否则RNA很难溶解），用适量RNase-Free ddH2O溶解RNA沉淀。