# CTAB法标准化操作流程

### 1实验目的

提取样品DNA

### 2适用范围

本标准操作规程适用于植物和微生物的样本DNA提取，非此类样品DNA的提取流程与本标准操作规程不同，须按照其它样品DNA提取操作规程进行。

### 3实验原理

CTAB(Hexadecyl trimethyl ammonium Bromide，十六烷基三甲基溴化铵)，是一种阳离子去污剂，具有从低离子强度溶液中沉淀核酸与酸性多聚糖的特性。在高离子强度的溶液中(>0.7mol/L NaCl)，CTAB与蛋白质和多聚糖形成复合物，只是不能沉淀核酸。通过有机溶剂抽提，去除蛋白，多糖，酚类等杂质后加入异丙醇沉淀即可使核酸分离出来。

### 4实验仪器

高速离心机、水浴锅、振荡器、-20℃冰箱。

### 5试剂

|  |  |
| --- | --- |
| 试剂耗材 | 用量 |
| CTAB缓冲液 | 1000μl |
| 饱和酚/氯仿/异戊醇（25:24:1） | 约900μl |
| 氯仿/异戊醇（24:1） | 约800 |
| 溶菌酶 | 20μl |
| β-巯基乙醇 | 20μl |
| RNase A | 2μl |
| 异丙醇 | 约600μl |
| 75%乙醇 | 2ml |

2% CTAB缓冲液配方

配制规模：50ml

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 试剂名称 | 终浓度 | 用量 |
| CTAB固体 | 2% | 1g |
| Nacl固体 | 1.4mol/L | 4.09g |
| PVP固体 | 2% | 1g |
| 0.5M/L EDTA(PH 7.5) | 20mmol/L | 2mL |
| 1M/L Tris-Hcl(PH 8.0) | 100mmol/L | 5mL |

加ddH2O水到50ml。

**注意：**CTAB较难溶解，需65度加热溶解，并每隔30min摇晃试剂。有些组织不好破壁，可以用4% CTAB缓冲液裂解（只有CTAB和PVP加倍，其他试剂比例不变）。

### 6 操作步骤

1. 植物样品：把植物样品用液氮研磨，吸取1000μl裂解液至2.0ml EP管里，裂解液中加入20μl的β-巯基乙醇。把研磨好的样品约100mg加入裂解液中，65度水浴40min，期间每隔10min颠倒混匀一次，以使样品充分裂解。
2. 土壤、粪便样品：吸取1000μl裂解液至2.0ml EP管里，加入20μl溶菌酶和20μl的β-巯基乙醇，将约200mg的样品加入裂解液中，振荡混匀，65度水浴2h，期间每隔20min颠倒混匀一次，以使样品充分裂解。
3. 取上清至新的2.0mlEP管中，加等体积（约900μl）的酚（pH8.0）：氯仿：异戊醇（25：24：1），颠倒混匀，12000rpm离心10min。
4. 取上清至新的1.5mlEP管中，加等体积（约800μl）的氯仿：异戊醇（24:1），颠倒混匀，12000rpm离心10min
5. 吸取上清至1.5mL离心管里，加入3/4体积（约600μl）的异丙醇，上下摇晃，-20度沉淀30分钟。
6. 12000rpm离心10分钟，倒出液体，注意不要倒出沉淀。用1ml 75％乙醇洗涤2次，剩余的少量液体可再次离心收集，然后用枪头吸出。
7. 超净工作台吹干或者室温晾干（DNA样品不要过于干燥，否则很难溶解）
8. 加入50-100μl ddH2O溶解DNA样品，必要时可于55-60ºC下孵育10min助溶。

加RNase A 2μl消化RNA，37度放置15min。