

植物组织叶绿体 DNA 萃取试剂盒产品说明书（中文版）

主要用途

植物组织叶绿体 DNA 萃取试剂是一种旨在通过物理破壁和化学破膜及离心处理方法，从植物组织中分离出完整而纯化的叶绿体细胞器，然后进一步生物酶处理以获得高质量的叶绿体 DNA 的权威而经典的技术方法。该技术由大师级科学家精心研制、成功实验证明的。适合于菠菜、豌豆、莴苣、卷心菜、甜菜、烟草等各种新鲜植物组织，包括叶片 (leaf)、谷粒 (grain)、种子 (seed) 等叶绿体核酸成分的分离。用于高等植物不育性、叶绿体遗传等研究。适合于后续的杂交、克隆、酶切、PCR 分析等。产品即到即用，操作简易，性能稳定，无核酶污染，萃取纯度和产量皆高。

技术背景

叶绿体 (chloroplast) 是绿色植物进行光合作用和能量转化的重要细胞器。叶绿体是细胞质中的一种色素体，因含叶绿素而成绿色。叶绿体由外被 (envelope)、类囊体 (thylakoid) 和基质 (stroma) 组成。叶绿体 DNA 是一种闭合环状双股结构，含有 10 至 30 个基因，编码 200 个蛋白质。

产品内容

清理液 (Reagent A)	毫升
裂解液 (Reagent B)	毫升
净化液 (Reagent C)	毫升
强化液 (Reagent D)	毫升
保存液 (Reagent E)	毫升
破膜液 (Reagent F)	毫升
酶解液 (Reagent G)	微升
萃取液 (Reagent H)	毫升
浓缩液 (Reagent I)	毫升
助沉液 (Reagent J)	微升
沉淀液 (Reagent K)	毫升
纯化液 (Reagent L)	毫升
缓冲液 (Reagent M)	毫升
产品说明书	1 份

保存方式

保存净化液 (Reagent C)、酶解液 (Reagent G)、萃取液 (Reagent H) 和助沉液 (Reagent J) 在 -20℃ 冰箱里，其余的保存在 4℃ 冰箱里，有效保证 6 月

用户自备

15 毫升锥形离心管：用于叶绿体初步制备物存放的容器

50 毫升锥形离心管：用于植物组织收集、离心和清洗的容器

1.5 毫升离心管：用于保存叶绿体

尼龙丝或 60 微米尼龙网：用于去除植物裂解残渣

小型漏斗：用于过滤的装置

4℃台式离心机：用于沉淀细胞和分离细胞器成分

微型台式离心机：用于沉淀核酸

DOUNCE 匀浆器：用于裂解细胞

58℃恒温水槽：用于孵育反应物

涡旋震荡仪：用于混匀

实验步骤

一、物理匀浆法

实验开始前，将试剂盒里的**净化液 (Reagent C)**冻融，然后移出 xx 毫升**净化液 (Reagent C)**和 xx 毫升的**裂解液 (Reagent B)**到 15 毫升锥形离心管里，混匀后，标记为**裂解工作液**，置入冰槽里备用。然后进行下列操作。

1. 准备好新鲜的植物组织（叶片、谷粒、种子等），并称重以确定 1 克组织重量
2. （选择步骤）放进预冷的 50 毫升锥形离心管
3. （选择步骤）加入 xx 毫升**清理液 (Reagent A)**清洗 1 次
4. 用刀片切碎组织（注意：*建议去除叶茎*）
5. 放进一个预冷的 15 毫升锥形离心管
6. 加入预冷的 xx 毫升**裂解工作液**
7. 涡旋震荡 5 秒，充分混匀
8. 即刻放进预冷的 DOUNCE 匀浆器
9. 置于冰槽里用匀浆棒匀化组织（约 80 下）（注意：*参见注意事项 9*）
10. （选择步骤）准备 1 个小型漏斗，内衬尼龙丝或 60 微米尼龙网，置于 50 毫升锥形离心管上
11. （选择步骤）将所有组织匀浆液移到小型漏斗里过滤（注意：可以使用 4 层纱布替代）
12. 放进 4℃台式离心机离心 5 分钟，速度为 200g
13. 小心移出上清液（注意：*不要触碰沉淀物*）到另一个新的预冷的 15 毫升锥形离心管（如果跳过过滤步骤或上清液含有肉眼可见的残渣，重复离心 5 分钟一次，速度为 200g）——**此步骤去除细胞壁残渣、细胞核和未溶解的细胞**
14. 放进 4℃台式离心机离心 10 分钟，速度为 1000g
15. 小心抽去上清液，保留绿色沉淀颗粒，避免光照——**此步骤获得叶绿体沉淀物**（注意：*如果暂时停止操作，须暂时放进-70℃冰箱里*）
16. （选择步骤）进行叶绿素定量测定（建议使用植物叶绿体总蛋白定量检测试剂盒—16009）
17. 加入 xx 微升**破膜液 (Reagent F)**到叶绿体颗粒样品中
18. 涡旋震荡 15 秒，混匀颗粒群
19. 转入 1.5 毫升离心管
20. 放进 37℃恒温水槽孵育 15 分钟
21. 加入 xx 微升**酶解液 (Reagent G)**
22. 用 200 微升枪头上下抽吸混匀

23. 放进微型台式离心机瞬时离心 5 秒钟，速度为 500g（或 2000RPM，例如 eppendorf 5415）
24. 放进 58℃ 恒温水槽孵育 2 小时
25. 置于室温下冷却 15 分钟，直至处于室温状态（或置于冰槽里 15 至 30 秒）
26. 加入 xx 微升**萃取液（Reagent H）**（注意：使用前摇匀）
27. 涡旋震荡 5 秒
28. 放进微型台式离心机离心 5 分钟，速度为 16000g（或 13000RPM，例如 eppendorf 5415）
29. 移出上层液相溶液到新的 1.5 毫升离心管（注意：切莫触碰液相交界面上的膜状物）
30. 加入 xx 微升**浓缩液（Reagent I）**
31. 加入 xx 微升**助沉液（Reagent J）**
32. 加入 xx 微升**沉淀液（Reagent K）**
33. 在涡旋震荡仪上震荡 5 秒，充分混匀
34. 放进微型台式离心机离心 15 分钟，速度为 16000g（或 13000RPM，例如 eppendorf 5415）（注意：离心前做好方位标记，以便离心后观察管底沉淀颗粒）
35. 小心抽掉上清液
36. 加入 xx 毫升**纯化液（Reagent L）**
37. 放进微型台式离心机离心 5 分钟，速度为 16000g（或 13000RPM，例如 eppendorf 5415）
38. 小心抽掉上清液
39. 空气中晾干沉淀颗粒群
40. 加入 xx 微升**缓冲液（Reagent M）**
41. 溶解后放进 -20℃ 冰箱长期保存或移出 2 微升进行 PCR 反应

二、化学处理法

实验开始前，将试剂盒里的**净化液（Reagent C）**冻融，然后移出 xx 毫升**净化液（Reagent C）**和 xx 毫升的**裂解液（Reagent B）**到 15 毫升锥形离心管里，混匀后，标记为**裂解工作液**，置入冰槽里备用。然后进行下列操作。

1. 准备好新鲜的植物组织（叶片、谷粒、种子等），并称重以确定 1 克组织重量
2. （选择步骤）放进预冷的 50 毫升锥形离心管
3. （选择步骤）加入 xx 毫升**清理液（Reagent A）**清洗 1 次
4. 移入一个液氮冻存管
5. 即刻放进液氮罐过夜
6. 次日从液氮罐里取出，即刻（最快速度）碾碎组织成粉末（注意：切莫使组织冻融）
7. 放进一个 15 毫升锥形离心管
8. 加入预冷的 xx 毫升**裂解工作液**
9. 涡旋震荡 5 秒，充分混匀
10. 在冰槽里孵育 2 分钟，期间涡旋震荡 5 秒一次
11. 加入预冷的 xx 微升**强化液（Reagent D）**
12. 涡旋震荡 5 秒，充分混匀
13. 在冰槽里孵育 5 分钟，期间涡旋震荡 5 秒二次（注意：参见注意事项 10）
14. 加入预冷的 xx 毫升**保存液（Reagent E）**，轻轻摇动试管混匀
15. （选择步骤）准备 1 个小型漏斗，内衬尼龙丝或 60 微米尼龙网，置于 50 毫升锥形离心管上
16. （选择步骤）将所有组织裂解液移入到小型漏斗里过滤（注意：可以使用 4 层纱布替代）
17. 放进 4℃ 台式离心机离心 5 分钟，速度为 200g

18. 小心移出上清液（注意：不要触碰沉淀物）到另一个新的预冷的 15 毫升锥形离心管（如果如果跳过滤步骤或上清液含有肉眼可见的残渣，重复离心 5 分钟一次，速度为 200g）——此步骤去除细胞壁残渣、细胞核和未溶解的细胞
19. 放进 4℃ 台式离心机离心 10 分钟，速度为 1000g
20. 小心抽去上清液，保留绿色沉淀颗粒，避免光照——此步骤获得叶绿体沉淀物（注意：如果暂时停止操作，须暂时放进 -70℃ 冰箱里）
21. （选择步骤）进行叶绿素定量测定（建议使用植物叶绿体总蛋白定量检测试剂盒—16009）
22. 加入 xx 微升破膜液（Reagent F）到叶绿体颗粒样品中
23. 涡旋震荡 15 秒，混匀颗粒群
24. 转入 1.5 毫升离心管
25. 放进 37℃ 恒温水槽孵育 15 分钟
26. 加入 xx 微升酶解液（Reagent G）
27. 用 200 微升枪头上下抽吸混匀
28. 放进微型台式离心机瞬时离心 5 秒钟，速度为 500g（或 2000RPM，例如 eppendorf 5415）
29. 放进 58℃ 恒温水槽孵育 2 小时
30. 置于室温下冷却 15 分钟，直至处于室温状态（或置于冰槽里 15 至 30 秒）
31. 加入 xx 微升萃取液（Reagent H）（注意：使用前摇匀）
32. 涡旋震荡 5 秒
33. 放进微型台式离心机离心 5 分钟，速度为 16000g（或 13000RPM，例如 eppendorf 5415）
34. 移出上层液相溶液到新的 1.5 毫升离心管（注意：切莫触碰液相交界面上的膜状物）
35. 加入 xx 微升浓缩液（Reagent I）（注意：充分融化和混匀浓缩液（Reagent I））
36. 加入 xx 微升助沉液（Reagent J）
37. 加入 xx 微升沉淀液（Reagent K）
38. 在涡旋震荡仪上震荡 5 秒，充分混匀
39. 放进微型台式离心机离心 15 分钟，速度为 16000g（或 13000RPM，例如 eppendorf 5415）（注意：离心前做好方位标记，以便离心后观察管底沉淀颗粒）
40. 小心抽掉上清液
41. 加入 xx 毫升纯化液（Reagent L）
42. 放进微型台式离心机离心 5 分钟，速度为 16000g（或 13000RPM，例如 eppendorf 5415）
43. 小心抽掉上清液
44. 空气中晾干沉淀颗粒群
45. 加入 xx 微升缓冲液（Reagent M）
46. 溶解后放进 -20℃ 冰箱长期保存或移出 2 微升进行 PCR 反应

注意事项

1. 本产品为 10 次操作（1 克植物组织）
2. 建议使用新鲜植物样品，暗室 4℃ 冰箱里过夜
3. 植物样品务必避光，以防止淀粉聚集
4. 叶绿体操作均须在 4℃ 或以下状态下进行
5. 操作时，须无菌操作，避免污染母液，尤其是裂解液（Reagent B）和保存液（Reagent E）
6. 建议使用足够的组织量

7. 建议植物组织使用物理法组织匀浆器操作为首选；德国的 **BRAUN** 细胞匀浆器最为理想
8. 建议严格控制操作时间
9. 通常匀化次数为 80 下（或组织块状消失为止）达到 80%的组织细胞裂解为理想状态，但不同的组织类型会存在差异。用户可以通过显微镜观察 3 微升匀浆物的组织细胞裂解程度：完整组织细胞呈现发亮的圆环。低于 50%可以增加匀化次数
10. 通常孵育 5 分钟达到 80%的组织细胞裂解为理想状态，但不同的组织类型会存在差异。用户可以通过显微镜观察 3 微升裂解物的组织细胞裂解程度：完整组织细胞呈现发亮的圆环。低于 50%可以增加孵育时间和涡旋震荡次数
11. 试剂中的溶液使用前摇匀；**酶解液（Reagent G）** 需放进 37℃冻融少许；为避免反复冻融，建议适量分装
12. 通常 1 克植物组织中提取的叶绿体 DNA 达 1 至 10 微克
13. 如果需要获得99%以上纯度的叶绿体DNA，建议使用高多糖/酚植物组织叶绿体DNA高纯分离试剂盒— 16011.3.2
14. 本公司提供系列植物叶绿体分析技术产品

质量标准

1. 本产品经鉴定性能稳定
2. 本产品经鉴定无核酶污染
3. 本产品经鉴定萃取产量和纯化程度高
4. 本产品经鉴定无基因组 DNA 污染