

· 技术方法 ·

## 一种改良的植物DNA提取方法

李金璐<sup>1, 2†</sup>, 王硕<sup>1, 2†</sup>, 于婧<sup>2, 3†</sup>, 王玲<sup>1†</sup>, 周世良<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>东北林业大学园林学院, 哈尔滨 150040; <sup>2</sup>中国科学院植物研究所系统与进化植物学国家重点实验室, 北京 100093

<sup>3</sup>中国科学院大学生命科学学院, 北京 100049

**摘要** 植物组织中含有大量多糖、多酚、酯类等次生代谢产物, 要从中提取高质量的DNA比较困难。针对这一情况, 该文提出一种改良CTAB植物DNA提取方法(mCTAB), 并以10种常见植物为实验材料, 与4种常用的植物DNA提取试剂盒作对比。结果表明, mCTAB法提取的DNA产率高且质量好, PCR扩增成功率也较高, 而提取成本显著低于DNA提取试剂盒, 可有效用于植物DNA条形码等研究的植物DNA提取。

**关键词** DNA条形码, 改良CTAB法, 植物DNA提取, 提取方法

李金璐, 王硕, 于婧, 王玲, 周世良 (2013). 一种改良的植物DNA提取方法. 植物学报 48, 72–78.

DNA是基本遗传物质, 是遗传信息的载体。一定数量及高质量的DNA样品是进行限制性酶切、PCR扩增、分子杂交、遗传多态性分析以及基因组学等分子生物学研究的基础。因此, 获取高质高量的DNA显得极为重要。

植物DNA的提取方法有很多, 传统的方法有CTAB法(Doyle and Doyle, 1987)、SDS法(蔡朝辉等, 2000)等。CTAB法和SDS法都是在裂解植物细胞的基础上, 多次利用有机溶剂进行抽提, 使蛋白质等沉淀于有机试剂中, 而核酸保留在水相, 从而达到分离核酸的目的。国内外生物公司开发了多种商品化的植物DNA提取试剂盒, 包含提取植物DNA所需的试剂和必要的耗材, 可直接用于提取高质量的DNA。植物DNA提取试剂盒有很多种, 常见的有北京天根生化科技有限公司的植物基因组DNA提取试剂盒(DP305)、北京博迈德科技发展有限公司的广谱植物基因组DNA快速提取试剂盒(DN15)、Omega Bio-Tek公司的Plant DNA Mini Kit(D3485)、QIAGEN公司的DNeasy Plant Mini Kit(69104)、美国MOBIO强力植物DNA提取试剂盒Power Plant™ DNA Isolation Kit(13200-50)等。不同的植物DNA提取试剂盒, 分离DNA的原理也不同。有的利用核酸的分子量差异分

离DNA, 有的利用特异性基质与DNA结合从而达到分离DNA的目的, 如离子交换柱、磁珠等(孙璐宏等, 2010)。由于DNA提取试剂盒具有快速、方便, 无需酚、氯仿抽提, 避免了有机溶剂的污染等优点, 在经费充足的情况下通常采用此方法。

植物细胞有细胞壁, 含有较多的多糖、多酚、酯类等次生代谢产物。不同植物中次生代谢产物的种类和含量差异很大, 有时同种植物不同器官或组织的次生代谢产物的种类和含量也不一样, 导致获取高质量的DNA有一定的难度(李丹和凌定厚, 2000)。针对某个特殊物种优化的DNA提取方法不一定适用于其它物种。传统的CTAB法是目前应用最广泛的DNA提取方法, 但由于植物材料在化学成分、组织结构等方面有差异, 提取效果时常欠佳, 在使用上受到一定的限制(罗立明等, 2003), 因此迫切需要一种简便、高效、经济且通用性较好的植物DNA提取方法。

我们从长期植物DNA提取实践中总结出一种较为普遍适用的植物DNA改良CTAB提取方法(modified CTAB method, mCTAB)。本文将mCTAB与4种常用的植物DNA提取试剂盒进行对比, 分析各自的优缺点, 供相关人员在提取植物DNA时参考使用。

收稿日期: 2012-03-20; 接受日期: 2012-08-30

基金项目: 科技部科技基础性工作专项(No.2011FY120200-6)、高技术研究发展计划(No.2012AA021602)、国家科技支撑计划(No.2012BAC01B05-6)和东北林业大学研究生科技创新基金

† 共同第一作者。

\* 通讯作者。E-mail: slzhou@ibcas.ac.cn

# 1 材料与方法

## 1.1 材料

选取10种常见植物(表1), 包含苔藓植物、蕨类植物、裸子植物、基部被子植物、单子叶植物、蔷薇类植物、菊类植物等各大分支的成员(Chase and Reveal, 2009), 也包含乔木、灌木、藤本、多年生草本、一年生草本等不同的生活型, 所选植物有一定的代表性。这些植物的DNA提取难易程度不一。10种植物样品均采自中国科学院植物研究所植物园, 数字影像信息及凭证标本存放于中国科学院植物研究所标本馆(PE)。采集10种植物材料的新鲜叶片, 于40°C烘干后用硅胶保存备用。

## 1.2 DNA提取

分别采用mCTAB和4种国内外常用的植物DNA提取试剂盒提取10种植物的DNA。这4种植物DNA提取试剂盒分别为Omega Bio-Tek公司的Plant DNA Mini Kit(D3485)、QIAGEN公司的DNeasy Plant Mini Kit(69104)、北京博迈德科技发展有限公司的广谱植物基因组DNA快速提取试剂盒(DN15)和北京天根生化科技有限公司的植物基因组DNA提取试剂盒(DP305)。本实验中4个公司的试剂盒分别用I、II、III和IV代替, 顺序与在本文中的出现顺序没有对应关系。

称取100 mg植物干材料, 加入少量石英砂研磨成细粉末状, 将粉末平均分配到5个2.0 mL离心管

中。分别用5种提取方法提取DNA。4种试剂盒提取DNA的方法严格按照试剂盒的操作说明进行。mCTAB提取DNA分为18个步骤。(1) 称取20 mg植物干材料, 加入少量石英砂, 研磨成细粉末状, 将粉末转移到2.0 mL的离心管中(这一步骤前面已经完成)。(2) 加入1 mL预冷的缓冲液A(表2), 混匀后冰浴15分钟; 冰浴过程中颠倒混匀2–3次。(3) 7 000 ×g离心10分钟, 弃上清。(4) 重复步骤(2)和(3), 直至上清不黏稠。(5) 加入0.7 mL缓冲液B(表3), 混匀后65°C水浴90–120分钟, 水浴过程中颠倒混匀数次, 颠倒混匀时操作需轻缓。(6) 10 000 ×g离心10分钟, 吸上清并置于新的2.0 mL离心管中(如果需要, 使用沉淀从步骤(5)开始进行二次提取)。(7) 加入0.7 mL氯仿异戊醇溶液(氯仿:异戊醇=24:1,v/v), 颠倒混匀10分钟。(8) 10 000 ×g离心10分钟, 吸上清并置于新的1.5 mL离心管中。(9) 重复步骤(7)和(8), 直到离心后两个液面之间没有沉淀。(10) 加入0.5 mL预冷异丙醇, 轻轻混匀, –20°C放置20分钟。(11) 10 000 ×g离心10分钟, 弃上清, 再短暂离心收集剩余液体, 用移液器吸除剩

表2 缓冲液A配方(100 mL)

Table 2 Buffer A recipe (for 100 mL)

Stock	Amount	Final concentration
1.0 mol·L <sup>-1</sup> Tris-HCl (pH8.0)	10 mL	0.1 mmol·L <sup>-1</sup>
0.5 mol·L <sup>-1</sup> EDTA-Na <sub>2</sub>	1 mL	5 mmol·L <sup>-1</sup>
5.0 mol·L <sup>-1</sup> NaCl	5 mL	0.25 mmol·L <sup>-1</sup>
PVP-40T (add before using)	2 g	2% (w/v)
dH <sub>2</sub> O	84 mL	–

表3 缓冲液B配方(100 mL, 加dH<sub>2</sub>O定容)

Table 3 Buffer B recipe (for 100 mL, bring the volume to 100 mL by adding dH<sub>2</sub>O)

Stock	Amount	Final concentration
1.0 mol·L <sup>-1</sup> Tris-HCl (pH8.0)	10 mL	100 mmol·L <sup>-1</sup>
0.5 mol·L <sup>-1</sup> EDTA-Na <sub>2</sub>	5 mL	25 mmol·L <sup>-1</sup>
5.0 mol·L <sup>-1</sup> NaCl	28 mL	1.4 mmol·L <sup>-1</sup>
CTAB	3 g	3% (w/v)
Bisulfate (add before using)	1 g	1% (w/v)
Ascorbic acid	1 g	1%
PVP-40T (add before using)	2 g	2% (w/v)
β-mereaptoethanol	100 μL	0.1% (v/v)
(add before using)		

表1 样品信息

Table 1 Information of samples

No.	Taxon	Voucher specimen (preserved in PE)
1	<i>Tortula schmidii</i> (Müll. Hal.) Broth.	BOP016341
2	<i>Matteuccia struthiopteris</i> (L.) Tod.	BOP016342
3	<i>Pinus tabulaeformis</i> Carrière	BOP016343
4	<i>Magnolia x soulangeana</i> Soul.-Bod.	BOP016344
5	<i>Vitis vinifera</i> L.	BOP016345
6	<i>Rosa chinensis</i> Jacq.	BOP016346
7	<i>Amaranthus retroflexus</i> L.	BOP016347
8	<i>Helianthus x laetiflorus</i> Pers.	BOP016348
9	<i>Indocalamus tessellatus</i> (Munro) Keng f.	BOP016349
10	<i>Cymbidium tracyanum</i> L. Castle	BOP016350

余液体。(12) 加入0.1 mL  $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  RNase,  $37^\circ\text{C}$  放置30–60分钟。(13) 加入0.1 mL去离子水、0.1 mL  $5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  NaCl, 0.8 mL预冷95%乙醇, 轻轻混匀。(14)  $10\ 000 \times g$ 离心10分钟, 弃上清。(15) 加入0.5 mL 75%乙醇, 轻轻弹起沉淀,  $10\ 000 \times g$ 离心2分钟, 弃上清。(16) 重复步骤(15)。(17) 风干乙醇, 加入0.1 mL TE溶解DNA。(18) 测定DNA的浓度和纯度。DNA如需立即使用贮存于 $4^\circ\text{C}$ 。短期贮存于 $-20^\circ\text{C}$ , 长期贮存于 $-80^\circ\text{C}$ 。

### 1.3 DNA产率和质量检测

#### 1.3.1 琼脂糖凝胶电泳检测

用1%琼脂糖凝胶电泳检测5种提取方法提取的DNA的片段大小、降解情况及浓度。取1  $\mu\text{L}$  DNA原液, 加9  $\mu\text{L}$  点样缓冲液, 混匀后点入1%琼脂糖凝胶, 分别用10、25和50 ng的 $\lambda$ DNA为标准,  $5 \text{ V} \cdot \text{cm}^{-1}$ 电泳30分钟。在紫外凝胶成像仪上观察并拍照。

#### 1.3.2 分光光度计检测

取1  $\mu\text{L}$  DNA原液, 用微量分光光度计(美国Nano-Drop 2000)测定5种方法提取的DNA的OD值及 $A_{260/280}$ 值。根据分光光度计测定的OD值计算DNA的产率。

#### 1.3.3 PCR检测

将5种方法提取的DNA原液稀释到 $50 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ , 用植物DNA条形码候选片段(Kress et al., 2005; CBOL Plant Working Group, 2009; China Plant BOL Group et al., 2011)进行PCR扩增。所用引物为: rbcL aF/R (Kress and Erickson, 2007)、trnH/psbA (Kress et al., 2005)、matK 472F/1248R (Yu et al., 2011)及ITS1/ITS4 (Henrion et al., 1992)。

PCR扩增采用10  $\mu\text{L}$  反应体系, 其中包括1  $\mu\text{L}$   $10\times$  PCR buffer(含 $\text{MgCl}_2$ ), 1  $\mu\text{L}$   $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  dNTPs, 0.5  $\mu\text{L}$   $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  forward primer, 0.5  $\mu\text{L}$   $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  reverse primer, 0.25 U Taq DNA polymerase, 1  $\mu\text{L}$  template DNA, 5.9  $\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O。

PCR扩增反应在C1000™ Thermal Cycler (BIO-RAD, USA)上进行。PCR扩增程序为:  $94^\circ\text{C}$ 预变性4分钟;  $94^\circ\text{C}$ 变性30秒,  $52^\circ\text{C}$ 退火40秒,  $72^\circ\text{C}$ 延伸1分钟, 35个循环;  $72^\circ\text{C}$ 延伸10分钟;  $10^\circ\text{C}$ 降温10分钟。

PCR扩增产物用1%琼脂糖凝胶电泳检测, 紫外凝胶成像仪观察并拍照。

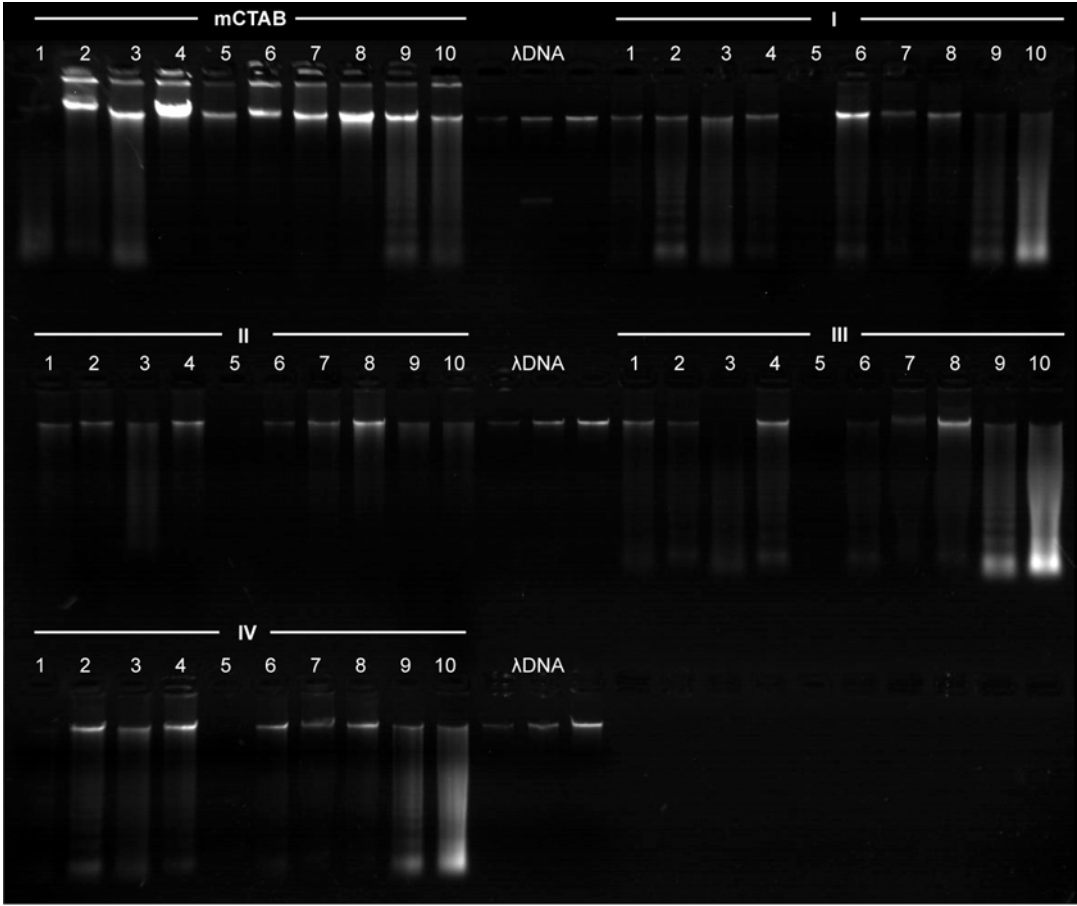
## 2 结果与讨论

### 2.1 DNA产率

因细胞裂解方法和后续操作中捕获DNA的方法不同, 不同的DNA提取方法产率不同。从DNA电泳条带亮度可以大致判断DNA产率的高低。本研究所用的5种方法中, mCTAB提取的DNA其电泳条带明显亮于其它方法提取的DNA的电泳条带(图1), 说明mCTAB提取的DNA的产率最高。该检测结果得到了分光光度计检测结果的证实(表4)。通过对比分光光度计检测得到的4种试剂盒提取DNA的产率可以看出, 试剂盒II和试剂盒III提取的DNA的产率较高, 试剂盒IV的产率次之, 试剂盒I的产率最低。5种方法中, mCTAB提取的DNA产率高于4种试剂盒的DNA产率, 10种植物材料DNA产率的平均值比各试剂盒方法提取DNA产率的平均值高出1倍多。对于5号植物材料葡萄而言, 由于其多糖和多酚等次生物质含量较高, 这些次生物质包裹着DNA, 使葡萄DNA的提取较为困难。由图1可以看出, mCTAB提取的葡萄DNA呈现一条清晰的电泳条带, 基本无降解现象; 而用4种试剂盒提取的葡萄DNA没有形成清晰的电泳条带。从表4可以看出, 5种方法中mCTAB提取的葡萄DNA的产率最高, 4种试剂盒的产率均较低。由此可以看出, 对于DNA提取难度较高的材料, mCTAB的提取效果较好, 而4种试剂盒的提取效果均不理想。

### 2.2 DNA质量

从琼脂糖凝胶电泳检测结果来看(图1), 5种方法提取的DNA基本上都有1条高分子量条带, 说明5种DNA提取方法都能够提取相对完整的DNA。用分光光度计检测DNA的纯度, 高纯度DNA的 $A_{260/280}$ 比值应在1.8–2.0之间。当 $A_{260/280}$ 小于1.8时, DNA样品中可能存在蛋白质污染; 当 $A_{260/280}$ 大于2.0时, DNA样品中RNA的含量较高(李荣华等, 2009)。从表5可以看出, 不同方法提取的DNA在纯度上有一定差异。从 $A_{260/280}$ 检测值可以看出, mCTAB提取的DNA质量较好, 用4种试剂盒提取的DNA质量较差, 试剂盒I提取的DNA, RNA的含量较高( $A_{260/280} > 2.0$ ), 试剂盒II、III和



**图1** 用5种方法提取的10种植物的DNA琼脂糖凝胶电泳检测结果  
λDNA的量从左到右分别为10、25和50 ng。1–10为样品编号(同表1)。mCTAB表示改良CTAB法。I、II、III和IV分别代表4个公司的DNA提取试剂盒。

**Figure 1** Agarose gel profiles of DNAs extracted from 10 species using five methods  
The quantity of the λDNA markers is 10, 25 and 50 ng respectively from left to right. The numbers from 1 to 10 are the samples in Table 1. mCTAB is modified CTAB protocol. The numbers from I to IV are the kits of four companies.

**表4** 用分光光度计计算的10种植物的DNA产率( $\text{ng}\cdot\text{mg}^{-1}$ )  
**Table 4** Yield of DNA extracted from 10 samples using five methods, estimated using spectrophotometer ( $\text{ng}\cdot\text{mg}^{-1}$ )

Sample	mCTAB	I	II	III	IV
1	423.0	149.5	189.5	159.5	61.5
2	1 099.5	158.0	363.0	152.0	318.5
3	845.5	343.0	280.5	111.5	205.0
4	1 319.0	257.5	235.0	254.5	264.0
5	367.0	80.5	89.5	166.0	100.5
6	597.0	165.5	786.5	245.0	109.0
7	1 626.0	200.0	186.5	167.5	96.5
8	1 372.0	331.0	545.0	866.0	211.5
9	677.0	112.5	325.0	439.5	325.5
10	823.5	143.5	731.0	1 092.0	863.5
Mean	915.0	194.1	373.2	365.4	255.6

I、II、III和IV分别代表4个公司的DNA提取试剂盒。  
The numbers from I to IV are the kits of four companies.

**表5** 用5种方法提取10种植物的DNA纯度( $A_{260/280}$ )  
**Table 5** Purity of DNA extracted from 10 species using five methods ( $A_{260/280}$ )

Sample	mCTAB	I	II	III	IV
1	1.80	2.74	1.66	1.69	1.60
2	1.89	2.91	1.74	1.50	1.74
3	1.80	2.13	1.84	1.62	1.77
4	1.90	2.36	1.82	1.75	1.73
5	1.66	4.00	1.45	1.02	1.45
6	1.87	3.08	1.68	1.15	1.66
7	1.68	2.50	1.74	1.81	1.64
8	1.64	2.10	1.28	1.28	1.39
9	1.83	2.75	1.79	1.77	1.73
10	1.87	2.87	1.87	1.83	1.83

I、II、III和IV分别代表4个公司的DNA提取试剂盒。  
The numbers from I to IV are the kits of four companies.

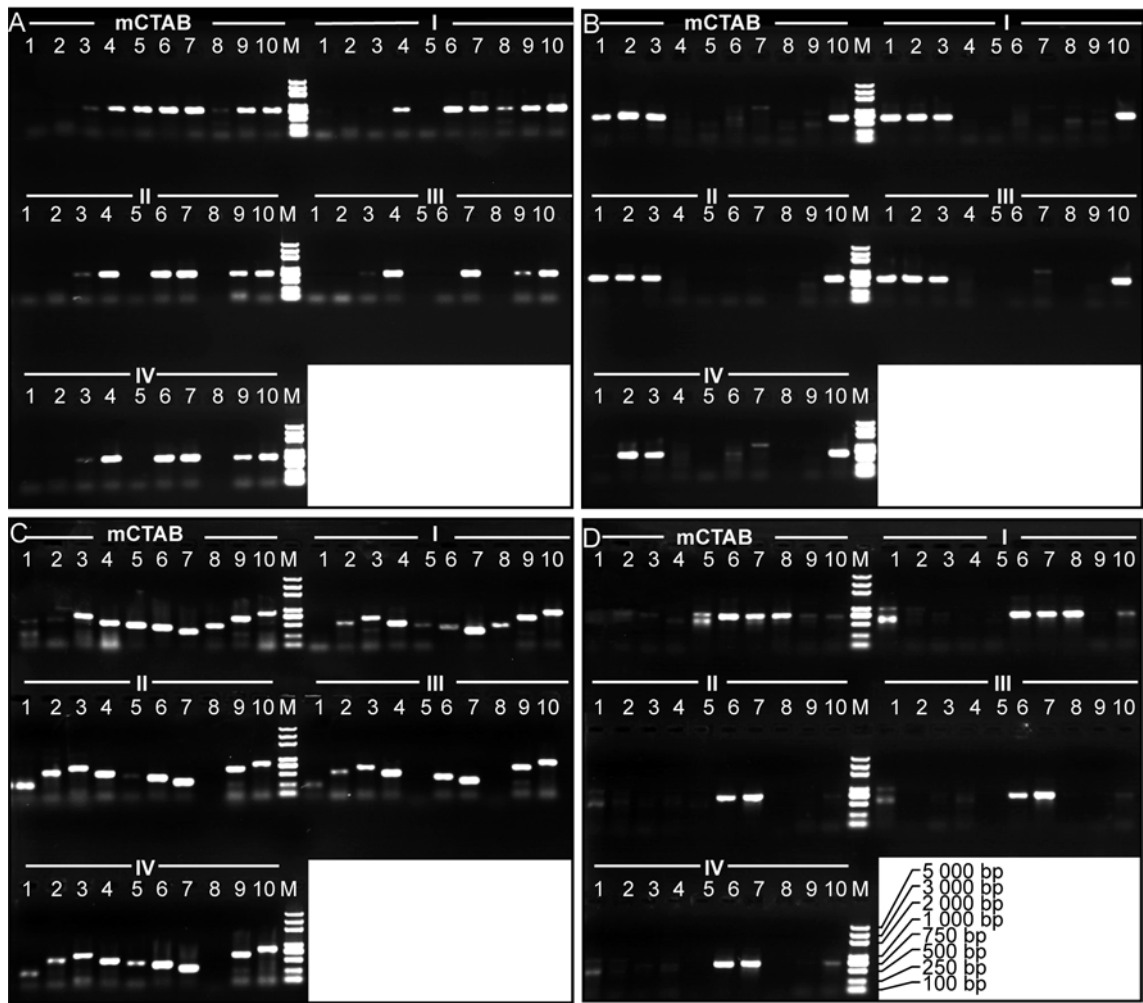


图2 用4对引物扩增的4种DNA条形码常用片段的PCR扩增情况(用5种方法提取的10种植物的DNA)

(A) *matK472F/1248R*; (B) *rbcLaF/R*; (C) *trnH/psbA*; (D) *ITS1/ITS4*。1–10为样品编号(同表1)。mCTAB表示改良CTAB法。I、II、III和IV分别表示4个公司的DNA提取试剂盒。M: DNA分子量标准

**Figure 2** Agarose gel profiles of four DNA fragments suggested for DNA barcoding (DNA was extracted from 10 species using five methods)

(A) *matK472F/1248R*; (B) *rbcLaF/R*; (C) *trnH/psbA*; (D) *ITS1/ITS4*. The numbers from 1 to 10 are the samples in Table 1. mCTAB is modified CTAB protocol. The numbers from I to IV are the kits of four companies. M: DNA marker

IV提取的DNA含有蛋白质杂质(多数DNA样品 $A_{260/280} < 1.8$ )。由此可见,5种提取方法中采用mCTAB提取的DNA质量最高。

PCR扩增对DNA模板的质量要求较高,因此PCR扩增成功率成为评判DNA质量的重要依据之一。从图2可以看出,以5种方法提取的DNA为模板进行的PCR扩增,均获得了较清晰的扩增图谱。相比而言,以mCTAB提取的DNA为模板进行的PCR扩增条带清

晰,成功率最高,4种试剂盒的成功率略低于mCTAB。4个片段中,*rbcLaF/R*和*trnH/psbA*各种模板的PCR扩增结果基本一致,*matK472F/1248R*和*ITS1/ITS4* mCTAB提取的DNA的PCR扩增成功率高于4种试剂盒提取的DNA的PCR扩增成功率。

### 2.3 成本核算

在科研经费有限的情况下,DNA的提取成本是科研人

员必须考虑的因素之一。经过核算, mCTAB提取DNA的成本最低, 为单个样品0.6元; 试剂盒I和II的成本为单个样品5元; 试剂盒III的成本为单个样品11元; 试剂盒IV的成本最高, 为单个样品30元。由此表明, 使用mCTAB提取DNA可显著降低科研成本。

综上所述, mCTAB提取的植物DNA具有产率高、质量较好、PCR扩增成功率高、成本低、通用性好五大优点, 能满足一般分子生物学研究DNA提取的需要, 特别适合科研经费紧缺和需大批量提取植物DNA时使用。相比之下, DNA提取试剂盒包含了提取植物DNA所需的试剂, 无需酚、氯仿抽提, 环境比较友好, 操作相对简单、快捷, 多数情况下能获得需要的DNA。由于其产率低、成本高、通用性差(刘塔斯等, 2005), 对于常规植物材料DNA的提取不合算, 但在经费充裕而时间紧迫时可适当选用。

我们的mCTAB主要改进了以下几个方面: (1) 在DNA释放之前用缓冲液A洗去绝大部分的次生代谢产物, 防止其和DNA形成复合体; (2) 在缓冲液B添加的还原剂不仅保护了DNA免受氧化, 还促进了细胞裂解, 释放更多的DNA; (3) 将CTAB调到更合适的浓度; (4) 及时消除RNA的干扰。但是mCTAB可能在下列情况下提取效果不佳: (1) CTAB依赖型次生代谢产物释放; (2) DNA迅速降解。第1种情况建议使用基于磁珠的DNA提取法; 第2种情况建议用新鲜材料在液氮中研磨, 低温下操作。

## 参考文献

- 蔡朝辉, 李萍, 董婷霞, 詹华强 (2000). 贝母分子生物学鉴定方法的研究. *药学学报* **35**, 309–312.
- 李丹, 凌定厚 (2000). 五种提取马尾松基因组DNA方法的比较. *植物学通报* **17**, 168–173.
- 李荣华, 夏岩石, 刘顺枝, 孙莉丽, 郭培国, 缪绅裕, 陈健辉 (2009). 改进的CTAB提取植物DNA方法. *实验室研究与探讨* **28**(9), 14–16.
- 刘塔斯, 林丽美, 龚力民, 胡胜全, 王燕 (2005). 分子标记中植物DNA提取方法的研究进展. *中南药学* **3**, 370–373.
- 罗立明, 欧阳叶新, 胡鸿钧 (2003). 海洋单细胞四片藻基因组DNA的微量提取. *武汉植物学研究* **21**, 295–300.
- 孙璐宏, 鲁周民, 张丽 (2010). 植物基因组DNA提取与纯化研究进展. *西北林学院学报* **25**, 102–106.
- CBOL Plant Working Group (2009). A DNA barcode for land plants. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**, 12794–12797.
- Chase MW, Reveal JL (2009). A phylogenetic classification of the land plants to accompany APG III. *Bot J Linn Soc* **161**, 122–127.
- China Plant BOL Group, Li DZ, Gao LM, Li HT, Wang H, Ge XJ, Liu JQ, Chen ZD, Zhou SL, Chen SL, Chen SL, Yang JB, Fu CX, Zeng CX, Yan HF, Zhu YJ, Sun YS, Chen SY, Zhao L, Wang K, Yang T, Duan GW (2011). Comparative analysis of a large dataset indicates that internal transcribed spacer (ITS) should be incorporated into the core barcode for seed plants. *Proc Natl Acad Sci USA* **108**, 19641–19646.
- Doyle JJ, Doyle JL (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull* **19**, 11–15.
- Henrion B, Letacon F, Martin F (1992). Rapid identification of genetic variation of ectomycorrhizal fungi by amplification of ribosomal RNA genes. *New Phytol* **122**, 289–298.
- Kress WJ, Erickson DL (2007). A two-locus global DNA barcode for land plants: the coding *rbcl* gene complements the non-coding *trnH-psbA* spacer region. *PLoS One* **2**, e508.
- Kress JW, Wurdack KJ, Zimmer EA, Weigt LA, Janzen DH (2005). Use of DNA barcodes to identify flowering plants. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**, 8369–8374.
- Yu J, Xue JH, Zhou SL (2011). New universal *matK* primers for DNA barcoding angiosperms. *J Syst Evol* **49**, 176–181.

## A Modified CTAB Protocol for Plant DNA Extraction

Jinlu Li<sup>1, 2†</sup>, Shuo Wang<sup>1, 2†</sup>, Jing Yu<sup>2, 3†</sup>, Ling Wang<sup>1†</sup>, Shiliang Zhou<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>College of Landscape Architecture, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China; <sup>2</sup>State Key Laboratory of Systematic & Evolutionary Botany, Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093, China; <sup>3</sup>College of Life Sciences, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

**Abstract** It is very important but usually difficult to extract high quality DNA from plants for molecular work since there exist a great deal of polysaccharides, hydroxybenzenes, esters and other secondary metabolites. In this paper we provide a simple modified CTAB (mCTAB) protocol for extracting plant DNA. The mCTAB method protocol includes 18 steps. (1) Weigh ca. 20 mg of dry plant tissue and ground into powder with sand using a mortar or a pestle. Remove the powder into a 2.0 mL microcentrifuge tube. (2) Add 1.0 mL pre-cooled buffer A (Table 2) to the tube, mix well and incubate the tube on ice for 15 min. Mix sample 2–3 times during incubation by inverting the tube. (3) Centrifuge the tube at 7 000  $\times g$  for 10 min. Discard the supernatant liquid by pouring it out of the tube. (4) Repeat step 2 and 3 until the supernatant is not viscous. (5) Add 0.7 mL buffer B (Table 3), mix well and incubate at 65°C for 90–120 min. Mix the sample several times during incubation by inverting the tube. (6) Centrifuge at 10 000  $\times g$  for 10 min, remove the supernatant to a new microcentrifuge tube. The precipitate is reusable from step 5 if necessary. (7) Add 0.7 mL CI (chloroform: isoamyl alcohol=24:1, v/v), mix it well for 10 min by inverting tube gently. (8) Centrifuge at 10 000  $\times g$ , for 10 min, carefully remove the supernatant to a new 1.5 mL microcentrifuge tube. (9) Repeat step 7 and 8 until no precipitate appearing between the two layers of liquid after centrifuging. (10) Add 0.5 mL pre-cooled isopropanol, carefully mix well. Incubate at –20°C for 20 min. (11) Centrifuge at 10 000  $\times g$  for 10 min, discard the supernatant, centrifuge the tube briefly to collect the remaining liquid and remove it by pipetting. (12) Add 0.1 mL RNase (100 mg·L<sup>-1</sup>) and incubate at 37°C for 30–60 min. (13) Add 0.1 mL ddH<sub>2</sub>O, 0.1 mL 5 mol·L<sup>-1</sup> NaCl and 0.8 mL pre-cooled ethanol (95%), carefully mix well. (14) Centrifuge at 10 000  $\times g$  for 10 min, discard the supernatant. (15) Add 0.5 mL 75% ethanol, re-suspend the pellet, centrifuge at 10 000  $\times g$  for 2 min, discard the supernatant. (16) Repeat step 15. (17) Add 0.1 mL TE to dissolve DNA after ethanol has evaporated. (18) Estimate the concentration and the purity of the DNA solution. Store it at 4°C for immediate use, at –20°C for short time storage and –80°C for long time storage. We compared our protocol with four frequently used and commercially available kits. The result showed that our mCTAB method yielded much more DNA of high quality that is suitable for PCR amplification but with much lower cost.

**Key words** DNA barcoding, mCTAB, plant DNA extraction, protocol

Li JL, Wang S, Yu J, Wang L, Zhou SL (2013). A modified CTAB protocol for plant DNA extraction. *Chin Bull Bot* 48, 72–78.

<sup>†</sup> These authors contributed equally in this paper

\* Author for correspondence. E-mail: slzhou@ibcas.ac.cn