

基因组 DNA 的提取

第一节 概述

基因组 DNA 的提取通常用于构建基因组文库、Southern 杂交(包括 RFLP)及 PCR 分离基因等。利用基因组 DNA 较长的特性,可以将其与细胞器或质粒等小分子 DNA 分离。加入一定量的异丙醇或乙醇,基因组的大分子 DNA 即沉淀形成纤维状絮团飘浮其中,可用玻棒将其取出,而小分子 DNA 则只形成颗粒状沉淀附于壁上及底部,从而达到提取的目的。在提取过程中,染色体会发生机械断裂,产生大小不同的片段,因此分离基因组 DNA 时应尽量在温和的条件下操作,如尽量减少酚/氯仿抽提、混匀过程要轻缓,以保证得到较长的 DNA。一般来说,构建基因组文库,初始 DNA 长度必须在 100kb 以上,否则酶切后两边都带合适末端的有效片段很少。而进行 RFLP 和 PCR 分析, DNA 长度可短至 50kb,在该长度以上,可保证酶切后产生 RFLP 片段(20kb 以下),并可保证包含 PCR 所扩增的片段(一般 2kb 以下)。

不同生物(植物、动物、微生物)的基因组 DNA 的提取方法有所不同;不同种类或同一种类的不同组织因其细胞结构及所含的成分不同,分离方法也有差异。在提取某种特殊组织的 DNA 时必须参照文献和经验建立相应的提取方法,以获得可用的 DNA 大分子。尤其是组织中的多糖和酶类物质对随后的酶切、PCR 反应等有较强的抑制作用,因此用富含这类物质的材料提取基因组 DNA 时,应考虑除去多糖和酚类物质。

本实验以水稻幼苗(禾本科)、李(苹果)叶子、动物肌肉组织和大肠杆菌培养物为材料,学习基因组 DNA 提取的一般方法。

第二节 从植物组织提取基因组 DNA

一、材料

水稻幼苗或其它禾本科植物,李(苹果)幼嫩叶子。

二、设备

移液器,冷冻高速离心机,台式高速离心机,水浴锅,陶瓷研钵,50ml 离心管(有盖)及 5ml 和 1.5ml 离心管,弯成钩状的小玻棒。

三、试剂

免责声明: 以上资料来源于网络、专业书籍、发表论文、学术期刊且不限于上述媒体,由钟鼎生物专业技术人员整理汇总,所有整理的实验方法和技术路线以及理论说明,其目的在于帮助科研工作者解决实验等各种困难,钟鼎生物对上述技术资料不具备任何专利保护和所有权,也不对其可靠性、真实性承担任何责任,特此声明。

- 1、提取缓冲液 I：100mmol/L Tris·Cl, pH8.0, 20mmol/L EDTA, 500mmol/L NaCl, 1.5% SDS。
- 2、提取缓冲液 II：18.6g 葡萄糖，6.9g 二乙基二硫代碳酸钠，6.0gPVP，240ul 巯基乙醇，加水至 300ml。
- 3、80:4:16/氯仿:戊醇:乙醇
- 4、RnaseA 母液：配方见第一章。
- 5、其它试剂：液氮、异丙醇、TE 缓冲液，无水乙醇、70%乙醇、3mol/L NaAc。

四、操作步骤：

（一）水稻幼苗或其它禾木科植物基因组 DNA 提取

1. 在 50ml 离心管中加入 20ml 提取缓冲液 I，60℃水浴预热。
2. 水稻幼苗或叶子 5-10g，剪碎，在研钵中加液氮磨成粉状后立即倒入预热的离心管中，剧烈摇动混匀，60℃水浴保温 30-60 分钟(时间长,DNA 产量高)，不时摇动。
3. 加入 20ml 氯仿/戊醇/乙醇溶液，颠倒混匀(需带手套，防止损伤皮肤)，室温下静置 5-10 分钟,使水相和有机相分层(必要时可重新混匀)。
4. 室温下 5000rpm 离心 5 分钟。
5. 仔细移取上清液至另一 50ml 离心管,加入 1 倍体积异丙醇,混匀,室温下放置片刻即出现絮状 DNA 沉淀。
6. 在 1.5ml eppendorf 中加入 1ml TE。用钩状玻璃棒捞出 DNA 絮团,在干净吸水纸上吸干,转入含 TE 的离心管中,DNA 很快溶解于 TE。
7. 如 DNA 不形成絮状沉淀,则可用 5000rpm 离心 5 分钟,再将沉淀移入 TE 管中。这样收集的沉淀,往往难溶解于 TE,可在 60℃水浴放置 15 分钟以上,以帮助溶解。
8. 将 DNA 溶液 3000rpm 离心 5 分钟,上清液倒入干净的 5ml 离心管。
9. 加入 5 μ l RNaseA(10 μ g/ μ l), 37℃ 10 分钟,除去 RNA(RNA 对 DNA 的操作、分析一般无影响,可省略该步骤)。
10. 加入 1/10 体积的 3mol/L NaAc 及 2 \times 体积的冰乙醇,混匀,-20℃放置 20 分钟左右,DNA 形成絮状沉淀。
11. 用玻棒捞出 DNA 沉淀,70%乙醇漂洗,再在干净吸水纸上吸干。
12. 将 DNA 重溶解于 1ml TE, -20 贮存。
13. 取 2 μ l DNA 样品在 0.7% Agarose 胶上电泳,检测 DNA 的分子大小。同时取 15 μ l 稀释

免责声明：以上资料来源于网络、专业书籍、发表论文、学术期刊且不限于上述媒体，由钟鼎生物专业技术人员整理汇总，所有整理的实验方法和技术路线以及理论说明，其目的在于帮助科研工作者解决实验等各种困难，钟鼎生物对上述技术资料不具备任何专利保护和所有权，也不对其可靠性、真实性承担任何责任，特此声明。

20 倍, 测定 OD₂₆₀/OD₂₈₀, 检测 DNA 含量及质量。

[注意] 5g 样品可保证获得 500 μ g DNA, 足供 RFLP、PCR 等分析之用。

(二). 从李(苹果)叶子提取基因组 DNA

1. 取 3-5 克嫩叶, 液氮磨成粉状。
2. 加入提取缓冲液 II 10ml, 再研磨至溶浆状。10000rpm, 10min。
3. 去上清液, 沉淀加提取液 I 20ml, 混匀。65 $^{\circ}$ C, 30-60min, 常摇动。
4. 同本节(一)中步骤 3-13 操作。

第三节 从动物组织提取基因组 DNA

一、材料

哺乳动物新鲜组织。

二、设备

移液管、高速冷冻离心机、台式离心机、水浴锅。

三、试剂

- 1、分离缓冲液: 10mmol/L Tris·Cl pH7.4, 10mmol/L NaCl, 25mmol/L EDTA。
- 2、其它试剂: 10% SDS, 蛋白酶 K (20mg/ml 或粉剂), 乙醚, 酚:氯仿:异戊醇(25:24:1), 无水乙醇及 70%乙醇, 5mol/L NaCl, 3mol/L NaAc, TE。

四、操作步骤:

1. 切取组织 5g 左右, 剔除结缔组织, 吸水纸吸干血液, 剪碎放入研钵(越细越好)。
2. 倒入液氮, 磨成粉末, 加 10ml 分离缓冲液。
3. 加 1ml 10% SDS, 混匀, 此时样品变得很粘稠。
4. 加 50 μ l 或 1mg 蛋白酶 K, 37 $^{\circ}$ C 保温 1-2 小时, 直到组织完全解体。
5. 加 1ml 5mol/L NaCl, 混匀, 5000rpm 离心数秒钟。
6. 取上清液于新离心管, 用等体积酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)抽提。待分层后, 3000rpm 离心 5 分钟。
7. 取上层水相至干净离心管, 加 2 倍体积乙醚抽提(在通风情况下操作)。

免责声明: 以上资料来源于网络、专业书籍、发表论文、学术期刊且不限于上述媒体, 由钟鼎生物专业技术人员整理汇总, 所有整理的实验方法和技术路线以及理论说明, 其目的在于帮助科研工作者解决实验等各种困难, 钟鼎生物对上述技术资料不具备任何专利保护和所有权, 也不对其可靠性、真实性承担任何责任, 特此声明。

8. 移去上层乙醚,保留下层水相。
9. 加 1/10 体积 3mol/L NaAc, 及 2 倍体积无水乙醇颠倒混合沉淀 DNA。室温下静止 10-20 分钟, DNA 沉淀形成白色絮状物。
10. 用玻棒钩出 DNA 沉淀,70%乙醇中漂洗后,在吸水纸上吸干,溶解于 1ml TE 中,-20℃保存。
11. 如果 DNA 溶液中有不溶解颗粒,可在 5000rpm 短暂离心,取上清; 如要除去其中的 RNA, 可加 5 μ l RNaseA(10 μ g/ μ l), 37℃保温 30 分钟, 用酚抽提后, 按步骤 9-10 重沉淀 DNA。

第四节 细菌基因组 DNA 的制备

一、材料

细菌培养物。

二、设备

移液管, 高速冷冻离心机, 台式离心机, 水浴锅。

三、试剂

- 1、CTAB/NaCl 溶液: 4.1g NaCl 溶解于 80ml H₂O,缓慢加入 10g CTAB,加水至 100ml。
- 2、其它试剂: 氯仿:异戊醇(24:1), 酚:氯仿:异戊醇(25:24:1), 异丙醇, 70% 乙醇, TE, 10% SDS, 蛋白酶 K (20mg/ml 或粉剂), 5mol/L NaCl。

四、操作步骤:

1. 100ml 细菌过夜培养液, 5000rpm 离心 10 分钟, 去上清液。
2. 加 9.5ml TE 悬浮沉淀, 并加 0.5ml 10% SDS, 50 μ l 20mg/ml(或 1mg 干粉)蛋白酶 K, 混匀, 37℃保温 1 小时。
3. 加 1.5ml 5mol/L NaCl, 混匀。
4. 加 1.5ml CTAB/NaCl 溶液, 混匀, 65℃保温 20 分钟。
5. 用等体积酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)抽提, 5000rpm 离心 10 分钟, 将上清液移至干净离心管。
6. 用等体积氯仿:异戊醇(24:1)抽提, 取上清液移至干净管中。
7. 加 1 倍体积异丙醇, 颠倒混合, 室温下静止 10 分钟, 沉淀 DNA。
8. 用玻棒捞出 DNA 沉淀, 70%乙醇漂洗后, 吸干,溶解于 1ml TE, -20℃保存。如 DNA 沉淀无

免责声明: 以上资料来源于网络、专业书籍、发表论文、学术期刊且不限于上述媒体, 由钟鼎生物专业技术人员整理汇总, 所有整理的实验方法和技术路线以及理论说明, 其目的在于帮助科研工作者解决实验等各种困难, 钟鼎生物对上述技术资料不具备任何专利保护和所有权, 也不对其可靠性、真实性承担任何责任, 特此声明。

法捞出,可 5000rpm 离心,使 DNA 沉淀。

9. 如要除去其中的 RNA, 可以按本章第三节中操作步骤处理。

第五节 基因组 DNA 的检测

上述方法得到的 DNA 一般可以用作 Southern, RFLP、PCR 等分析。由于所用材料的不同,得到的 DNA 产量及质量均不同,有时 DNA 中含有酚类和多糖类物质,会影响酶切和 PCR 的效果。所以获得基因组 DNA 后,均需检测 DNA 的产量和质量。

1. DNA 溶液稀释 20-30 倍后,测定 OD260 /OD280 比值,明确 DNA 的含量和质量。
2. 取 2-5 μ l 在 0.7% agarose 胶上电泳,检测 DNA 的分子大小。
3. 取 2 μ g DNA, 用 10 单位(U)HindIII酶切过夜, 0.7% agarose 胶上电泳,检测能否完全酶解(做 RFLP, DNA 必须完全酶解)。

如果 DNA 中所含杂质多,不能完全酶切,或小分子 DNA 多,影响接续的分析和操作,可以用下列方法处理:

- (1) 选用幼嫩植物组织,可减少淀粉类的含量。
- (2) 酚:氯仿抽提,去除蛋白质和多糖。
- (3) Sepharose 柱过滤,去除酚类、多糖和小分子 DNA。
- (4) CsCl 梯度离心,去除杂质,分离大片段 DNA(可用作文库构建)。