

动物基因组 DNA 的提取

[实验原理]

在 EDTA 和 SDS 等去污剂存在下, 用蛋白酶 K 消化细胞, 随后用酚抽提, 可以得到哺乳动物基因组 DNA, 用此方法得到的 DNA 长度为 100-150 kb, 适用于 L 嘴菌体构建基因组文库和 Southern 分析。

通过本实验了解并掌握提取基因组 DNA 的原理和步骤, 以及相对分子质量较大的 DNA 的琼脂糖凝胶电泳技术。

[仪器、材料与试剂]

(一)仪器

- 1.台式离心机
- 2.玻璃匀浆器
3. 高压灭菌锅
4. 恒温水浴

(二)材料

1. 1.5mL 微量离心管
2. 微量取样器和吸头
3. 无菌过滤器(一次性)
4. 10 mL 注射器
5. 鼠肝
6. 三羟甲基氨基甲烷(Tris)
- 7.十二烷基硫酸钠(SDS)
8. 乙二胺四乙酸(EDTA)

9. 蛋白酶 K

10. RNA 酶

11. DNA 相对分子质量标准物, DNA / EcoRI+HindⅢ相对分子质量标准物

(三)试剂

1、1.5 mol / L NaCl

2、0.5 mol / L Tris·HCl pH8.0

3. 0.5 mol / L EDTA pH8.0

4. 3 mol / L NaAc pH5.2

以上均高压灭菌。

5. 蛋白酶 K 10mg / mL 配好后用一次性过滤器过滤, -20 保存(教师配制)

6.组织匀浆液 100mmol / LNaCl, 10mmol / LTris·HCl(pH 8.0), 0.25mmol /

LEDTA(pH8.0)

7. 酶解液 200mmol / LNaCl, 20mmol / L Tris·HCl(pH 8. 0), 50mmol / LEDTA(PH

8.0), 200~g / mL 蛋白酶 K, 1%SDS

8. 无 DNA 酶的 RNA 酶 : 将胰 RNA 酶溶解于 10mmol / L Tris.HCl(pH7.5)、15 mmol / L NaCl 溶液中, 浓度 10mg / mL, 于 100℃水浴处理 15min, 以降解 DNA 酶, 缓慢冷

却到室温, -20℃保存

9. TE 缓冲液 : 10mmol / LTris·HCl(pH8.0), 25 mmol / LEDTA(pH8.0)

10. 平衡酚(pH8.0): 氧仿: 异戊醇=25: 24: 1<体积比)

11. 氧仿: 异戊醇=24: 1(体积比)

12. 5xTBE 5. 4gTris, 2. 75g 硼酸 2mL 0.5mol / L EDTA(pH8.0), 加水到 100mL;

13. 6x 上样缓冲液 o. 25%溴酚蓝, 40%(W / V)蔗糖水溶液

14. λ DNA / EcoRI+ / HindIII 相对分子质量标准物片段(bp)21 227, 5148, 4 973, 4 268, 3 530, 2 027, 1 904, 1 584, 1 315, 947, 831, 564, 125

[实验步骤]

本实验在无液氮的条件下，制备鼠肝 DNA，与有液氮条件下相比，产量和质量都有所下降。整个操作过程中，应尽量避免 DNA 酶的污染，特 g4 注重动作温和，减少对 DNA 的机械损伤。

1、取 0.2g 鼠肝，用冰冷的生理盐水洗 3 次，然后置于 2.0mL 匀浆液中，用玻璃匀浆器匀浆至无明显组织块存在(冰浴操作，切勿将细胞破碎，可镜检观察)。

2、将组织细胞移至 1.5ml 离心管中，50000rpm 离心 30-60sec，(尽可能在低温下操作)，弃上清，若沉淀中血细胞较多，可再加入 1 倍于细胞体积的匀浆液洗一次。

3、沉淀加 0.8mL 无菌水迅速吹散，分两管，再加 0.4mL 酵解液，翻转混匀(动作一定要轻)55°C水浴处理 12-18 h;

4、沉淀加 RNase 至终浓度 200 μ g / mL, 37°C水浴 1 h;

5、加入等体积酚 / 氯仿 / 异戊醇抽提一次，(慢慢旋转混匀，倾斜使两相接触面增大)。4°C、10min、10000rpm 离心;

6、有时如果 DNA 含量过高，水相在下层，实验时应注意观察。用扩口吸头移出含 DNA 的水相(注意勿吸出界面中蛋白沉淀)，加等体积氯仿 / 异戊醇，4°C、

10 000rpm 离心 10min (若界面或水相中蛋白含量多，可重复 1. 6 操作)。

7、用扩口吸头小心吸出上层含 DNA 的水相，加 1 / 10 体积的 NaAc，小心混匀(要充分)，再向每管中加入 2.5 倍体积的无水乙醇，-20 过夜。

8、12 000rpm 离心 19min, 弃上清, 75%冷乙醇洗涤一次, 12000rpm 离心 15min 室温干燥(不要大干, 否则 DNA 不易溶解), 加入适量 TE 缓冲液, 存放于 4°C, 轻摇溶解过夜, 即可得到实验动物基因组 DNA。

9、电泳鉴定 DNA, 由于基因组 DNA 相对分子质量较大, 用 0.3%的琼脂糖凝胶电泳鉴定, 先在底部铺一层 1%的支持胶, 凝固后再铺上一层 0.3%琼脂糖凝胶, 插上梳子(梳子不能碰到支持胶)。取 1.5μL 溶解的 DNA、1μL 上样缓冲液和 35μl 无菌水混匀后小心上样(可在另一孔加 DNA 相对分子质量标准), 观察基因组 DNA 大小, 用溴化乙锭染色观察结果。

[注意事项]

- 1、操作过程尽量在低温下进行, 避免 DNA 降解。
- 2、琼脂糖凝胶脆弱, 应小心操作。
- 3、提取得到的基因组 DNA 应为单一条带, DNA 降解可形成弥散带型。