



DNA的制备 (浓盐法)

实验目的

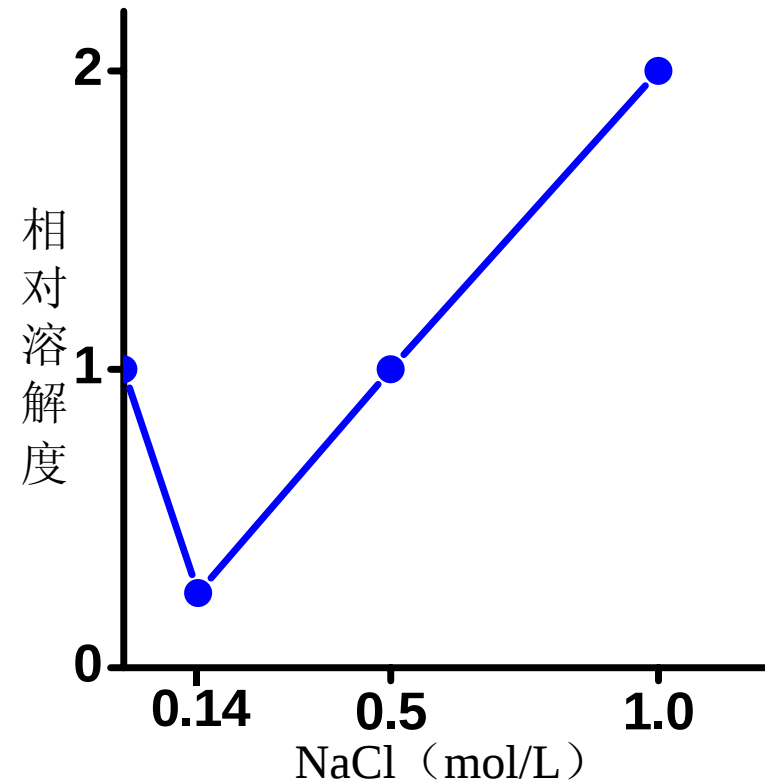
学习从肝中提取DNA的方法。

(一) 实验原理

- 1. 选材：选择含DNA多的，而脱氧核糖核酸活性又低的组织（淋巴组织，胸腺，脾脏，肝脏）。
- 2. DNA容易变性，所以要避免机械振荡，避免极端的物理、化学因素的影响，抑制核酸酶的作用。
- 3. 提取液中加入柠檬酸钠和EDTA使其与脱氧核糖核酸酶的辅因子钙，镁离子结合，从而抑制核酸酶的活性；SDS可以破坏细胞膜，也可使核酸酶失去活性。
- 4. 浓盐法-**DNP**的提取

DNA-蛋白质 (DNP) 的提取

- 真核细胞DNA与蛋白质结合成核蛋白 (DNP)，RNA与蛋白质结合成RNP，而且DNP和RNP常常混在一起。
- 在0.14mol/L的氯化钠溶液中，RNP的溶解度相当大，而DNP的溶解度仅为在水中的溶解度的1%；当氯化钠的浓度达到1mol/L的时候，RNP的溶解度小，而DNP的溶解度比在水中的溶解度大2倍。所以常选用0.14mol/L的氯化钠溶液提取RNP，而选用1mol/L的氯化钠溶液提取DNP。



DNP在NaCl中的溶解度

(二) 大分子DNA的提取一般步骤:

1.材料的选择

2.细胞破碎

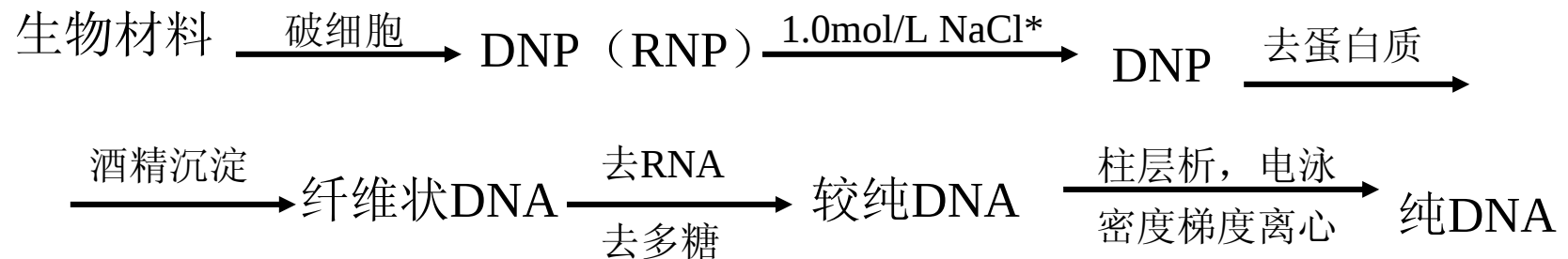
3.DNA-蛋白质 (DNP) 的提取—去除RNA

4.去蛋白质:SDS ;苯酚法 ;氯仿法; 酚:氯仿:异戊醇=25:24:1

5.沉淀DNA

6.去杂质

7.进一步纯化



*原核生物的DNA是裸露的, 与蛋白质结合不多, 分离纯化要简单些。

经常采用三种方法去除蛋白

- 用**SDS**等去污剂使蛋白质变性，可以直接从生物材料中提取**DNA**
- 苯酚法：用含水的酚溶液沉淀蛋白质和**DNA**，分层、离心蛋白变性，因而抑制了核酸酶活性，并且操作过程比较缓和，可以得到较好的**DNA**制品
- 用含辛醇或异戊醇的氯仿振荡核蛋白，使乳化，离心除蛋白，**DNA**在上层水相，用乙醇沉淀上层，可将**DNA**沉淀出来

(三) 实验操作

- 材料：兔肝
- 方法：

80g兔肝，剪碎

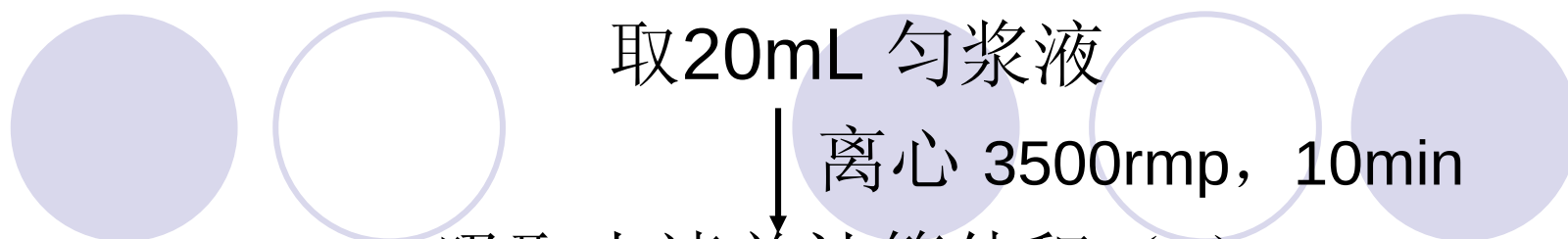


用预冷 $1\times$ SSC洗2—3次



加入160ml预冷 $1\times$ SSC,匀浆

(以上统一做)



吸取上清并计算体积 (V)

沉淀悬于5倍体积的0.15M NaCl-0.1M Na₂EDTA
(pH8.0), 边搅边滴加5%的SDS, 直至SDS
终浓度达1%, 充分搅拌

剧烈搅拌下缓慢加入NaCl, 使其终浓度达1mol/L

充分搅拌30min, 直到完全溶解

加入等体积的氯仿/异戊醇，振荡20min

6000rpm10min

用滴管吸取上层水相于小烧杯中

缓慢加入2倍体积的预冷95%乙醇，用玻棒沿一个方向连续搅拌

将玻棒分别放入70% 75% 95% 100%乙醇洗一次

用1mL/1.5ml蒸馏水使DNA溶解

（四）实验注意事项

- 防止**DNA**的降解：
- $1\times$ SCC中含有柠檬酸钠，和其他溶液中含有的EDTA，可以抑制核酸酶的活性。
- 在低温下进行操作，提取过程中避免加热、强酸、强碱、和剧烈振荡。
- 加氯仿/异戊醇除蛋白一步，剧烈振荡可使部分**DNA**断裂，影响产量；若振荡不够，有蛋白污染。所以大家要小心操作。



抑制DNase:

可加柠檬酸钠、EDTA等金属螯合剂；或加去污剂十二烷基硫酸钠（SDS）；或加蛋白变性剂。

抑制RNase:

- 实验器皿高温，或高压灭菌，不能高压灭菌的用 具用0.1%二乙基焦碳酸盐（diethyl pyrocarbonate, DEPC）处理。
- 加强的蛋白变性剂如硫氰酸胍、异硫氰酸胍等。
- 加核糖核酸酶阻抑蛋白（RNasin）等RNase的抑制剂。