

DNA的分离提取及含 量测定

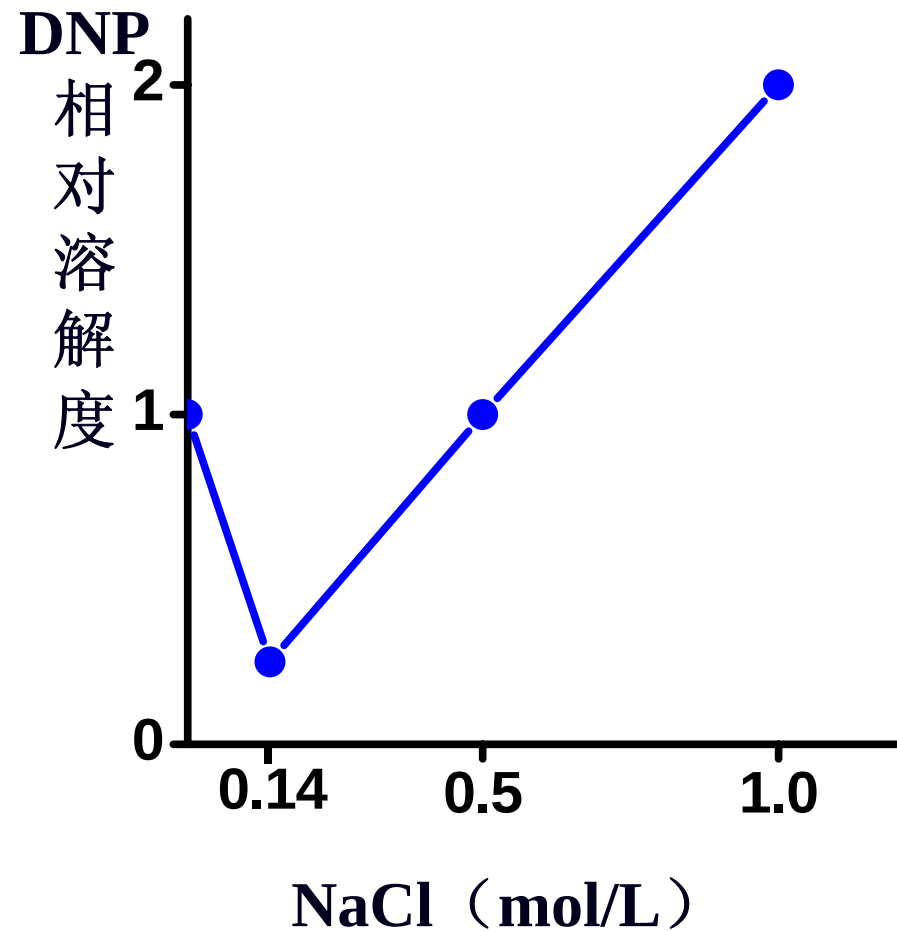
实验目的

- 掌握从动物组织中提取**DNA**的方法
- 学习二苯胺法测定**DNA**含量的原理和方法

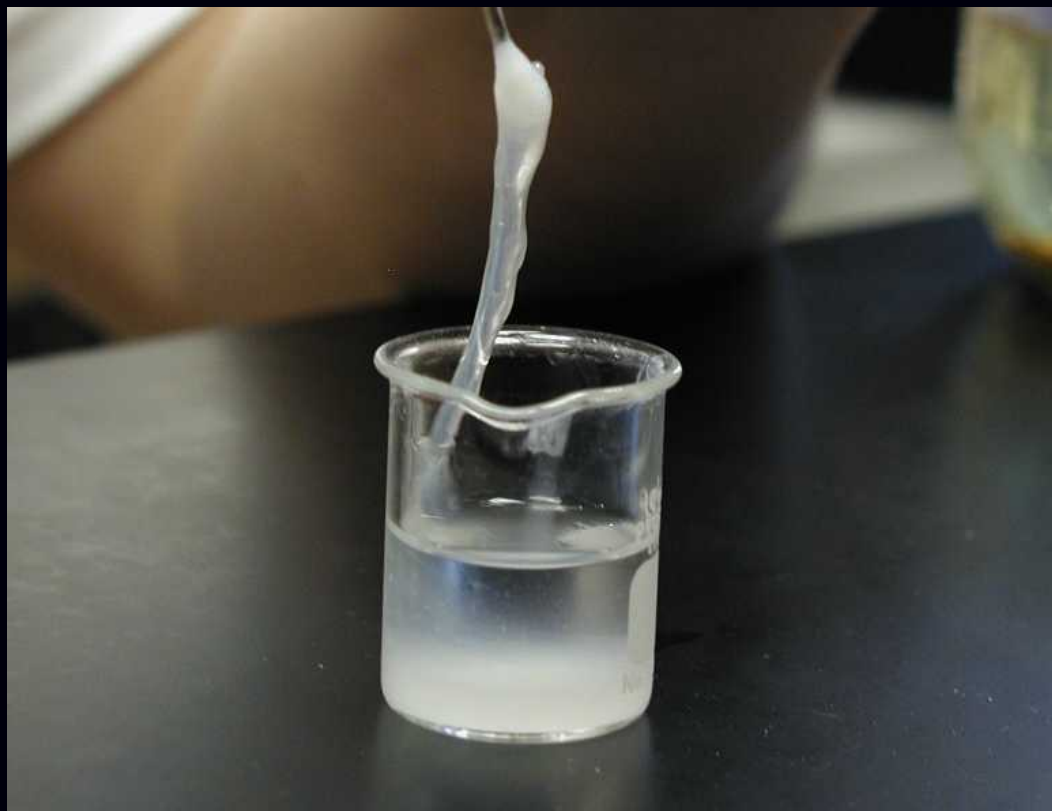
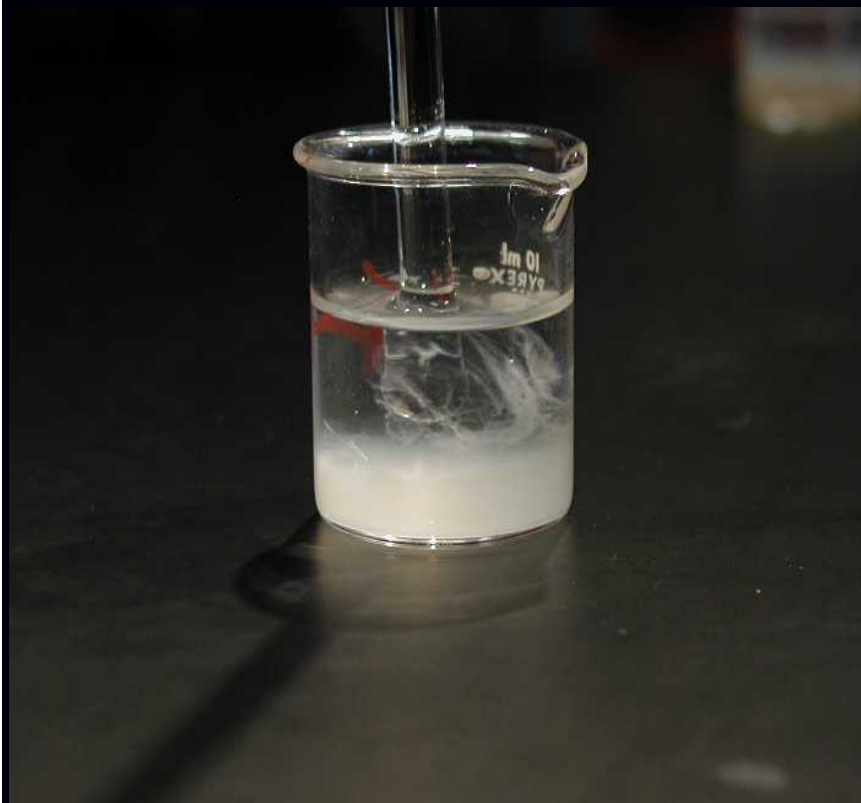
实验原理

- 取材原则：DNA含量高，DNA酶活性低
- 实验条件：避免机械振荡；防止过酸、过碱对磷酸二酯键的破坏；抑制核酸酶：柠檬酸钠、EDTA；SDS
- 改变盐浓度提取：**0.15mol/L NaCl** 沉淀DNP，**1mol / L NaCl**溶解DNP，氯仿振荡抽提去除蛋白质，乙醇沉淀DNA

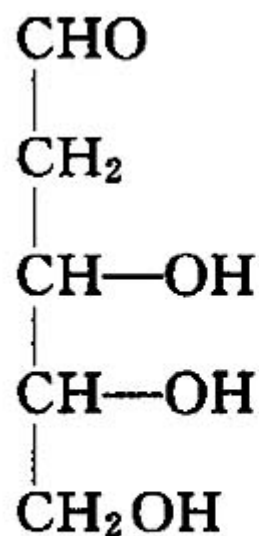
真核细胞DNA与蛋白质结合成核蛋白
(DNP)，RNA与蛋白质结合成RNP，可利用DNP和RNP在不同浓度NaCl中溶解度的不同来分离DNP和RNP。



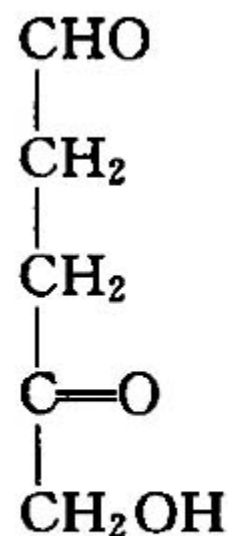
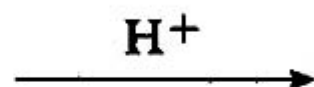
分离沉淀DNA



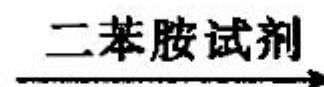
DNA含量的测定——二苯胺法



D-2-脱氧核糖



ω -羟基- γ -酮基戊醛



蓝色化合物

595nm

实验操作

兔肝200g/班，去脂，剪碎



400ml冷1xSSC，5'，2-3次



400ml冷1xSSC匀浆1-2'



20ml匀浆液/组（记录实际体积）



离心：5000rpm，4℃，15'

↓ 记录上清体积

沉淀 + 5V 0.15mol/L NaCl-0.1mol/LNa₂EDTA



搅拌，滴加5%SDS→1%



搅拌，加固体NaCl → 1mol/L



搅拌30' → NaCl 全溶



等V氯仿/异戊醇（24：1），振荡20'



离心：5000rpm，4℃，15'



转移水相→250ml烧杯



搅动，加2V冷95%乙醇



70%乙醇



95%乙醇



100%乙醇



5ml蒸馏水

绘制 DNA的标准工作曲线

试剂	管号					
	1	2	3	4	5	6
DNA标准溶液 (1mg/ml)(ml)	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
水(ml)	2	1.8	1.6	1.4	1.2	1.0
DNA的最终浓度 (μ g/ml)	0	100	200	300	400	500

- 向各管中加入**4ml**二苯胺试剂，混合均匀。
- 将上述各管放入沸水浴中精确反应**10'**，冷却。
- **595nm**波长下测每管的吸收值。
- 将各管在**595nm**下的吸收值对加入的**DNA**的 μg 数作图，应得一条通过零点的直线。

兔肝DNA样品中DNA含量的测定

- 2ml兔肝DNA溶液+ 4ml二苯胺试剂
- 沸水浴中精确加热10', 冷却
- 用管1做空白对照测该管在595nm下的光吸收值。

根据DNA的标准工作曲线, 计算所制备的DNA样品中的DNA含量。

$$\text{DNA} = \frac{y \times N}{C} \times 100\%$$

- **y**——由样品**O.D**值从标准工作曲线上查得的**DNA**的量；
- **C**——测定所用**DNA**样品液的毫升数；
- **N**——**DNA**样品液的总体积。

思考题

- 肝细胞的匀浆液（含0.5mol/L氯化钠-0.015mol/L柠檬酸钠，pH7.0）经离心为什么保留沉淀而不要上清液？为什么提取液（如匀浆液）中要加入柠檬酸钠和EDTA？
- 在DNA制备过程中为什么要加入SDS？
- 在DNA制备过程中为什么要加入氯仿-异戊醇？
- 结合本人实际操作的体会，讨论在提取过程中应如何避免大分子DNA的降解和断裂？