

实验五 植物总DNA的提取及测定

河南科技学院

园艺植物遗传育种教研室

一、实验目的

- 掌握用**CTAB**法提取植物总**DNA**的方法和基本原理。
- 学习利用紫外分光光度法测定**DNA**溶液的浓度。

二、实验原理

- 通常采用机械研磨的方法破碎植物的组织和细胞，由于植物细胞匀浆含有多种酶类(尤其是氧化酶类)对**DNA**的抽提产生不利的影响，在抽提缓冲液中需加入抗氧化剂或强还原剂(如巯基乙醇)以降低这些酶类的活性。在液氮中研磨，材料易于破碎，并减少研磨过程中各种酶类的作用。
- **CTAB, SDS**等离子型表面活性剂，能溶解细胞膜和核膜蛋白，使核蛋白解聚，从而使**DNA**得以游离出来。

再加入苯酚和氯仿等有机溶剂，能使蛋白质变性，并使抽提液分相，因核酸(DNA、RNA)水溶性很强，经离心后即可从抽提液中除去细胞碎片和大部分蛋白质。上清液中加入异丙醇或乙醇使DNA沉淀，沉淀DNA溶于双蒸水或TE溶液中，即得植物总DNA溶液。之后可加入RNA酶降解其中的RNA，再用氯仿除去RNA酶，得到较纯的DNA制剂。

- **DNA**的吸收光谱峰在**260 nm**处，据计算，测定此波长下**DNA**溶液的**OD**值，当**OD260=1**时，双链**DNA**含量约为**50 μg/ml**，据此可用紫外分光光度计测定溶液中**DNA**含量。
- 由于蛋白质的吸收峰在**280 nm**处，在测定**DNA**含量时，还常计算**OD260/OD280**之值，如该值为**1.8-2.0**时，认为已达到较高的纯度，如低于此值，表明其内含杂质较多，可能影响酶切反应。

三、实验材料

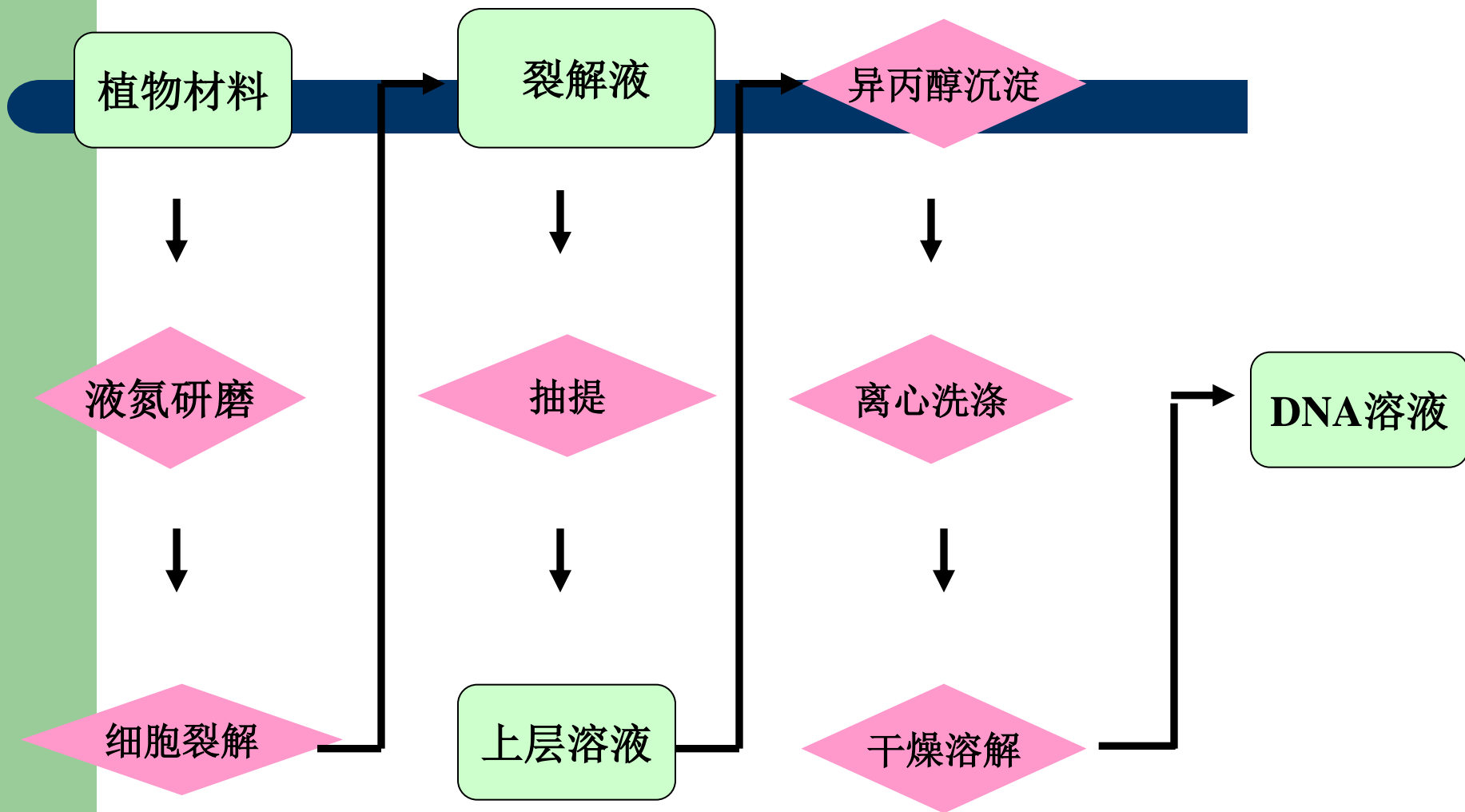
三色堇的幼嫩叶片

四、实验器具、药品试剂

水浴锅，研钵，微量移液器，枪头，离心管，台式离心机，液氮，恒温箱，标签纸，紫外分光光度计，磁力搅拌机，剪刀等。

2% CTAB抽提缓冲溶液，异丙醇，氯仿-异戊醇等

CTAB法流程图



五、实验方法

1. DNA的提取

- (1) **2%CTAB**抽提缓冲液在**65℃**水浴中预热。
- (2)取少量叶片（约**0.2 g**）置于研钵中，用液氮磨至粉状；
- (3) 在液氮挥发将尽而植物组织尚未解冻时迅即加入**700 μ l**的**2%CTAB**抽提缓冲液，轻轻搅动；
- (4) 将磨碎液分倒入**1.5 ml**的灭菌离心管中，磨碎液的高度约占管的三分之二；
- (5) 置于**65℃**的水浴槽或恒温箱中，每隔**10 min**轻轻摇动，**40 min**后取出；

- (6) 冷却**2 min**后，加入氯仿-异戊醇（**24: 1**）至满管，剧烈振荡**2~3 min**，使两者混合均匀；
- (7) 放入离心机中**10 000 rpm**离心**10 min**，与此同时，将**600 μl**的异丙醇加入另一新的灭菌离心管中；
- (8) 用移液器轻轻地吸取上清液，转入含有异丙醇的离心管内，将离心管慢慢上下摇动**30 sec**，使异丙醇与水层充分混合至能见到**DNA絮状物**；

- (9) 10000 rpm离心1 min后，立即倒掉液体，注意勿将白色DNA沉淀倒出，将离心管倒立于铺开的纸巾上；
- (10) 60 sec后，直立离心管，加入720 μl 的75%乙醇及80 μl 5 M的醋酸钠，轻轻转动，用手指弹管尖，使沉淀与管底的DNA块状物浮游于液体中；
- (11) 放置30 min，使DNA块状物的不纯物溶解；
- (12) 10000 rpm离心1 min后，倒掉液体，再加入800 μl 75%的乙醇，将DNA再洗 30 min；

- (13) **10000 rpm**离心**30 sec**后，立即倒掉液体，将离心管倒立于铺开的纸巾上；数分钟后，直立离心管，干燥**DNA**（自然风干或用风筒吹干）；
- (14) 加入**50 μ l 0.5 \times TE(含RNase)**缓冲液，使**DNA**溶解，置于**37 $^{\circ}$ C**恒温箱约**15 h**，使**RNA**消解；
- (15) 置于**-20 $^{\circ}$ C**保存、备用。

称取样品，液氮研磨，加入预热的(65℃) CTAB及β-巯基乙醇



保温1h,期间不停的摇匀



吸取上清液,移至新的离心管中,加入等体积氯仿: 异戊醇 (24: 1), 轻缓颠倒混匀,10000rpm,10min



取上清液, 移至新的离心管中,加等体积氯仿: 异戊醇,颠倒混匀, 10000rpm,10min



取上清液, 加入0.6-0.7V的异丙醇 (预冷), 后4℃ /-20℃保温沉淀



10000rpm,10min离心取沉淀, 70%乙醇清洗两次, 吹干



用TE溶解DNA,然后低温保存

2. DNA浓度的测定

- 取提取的DNA溶液2 μl (约100-200 ng)至一干净的离心管，加入198 μl 蒸馏水稀释。先200 μl 蒸馏水至比色杯，进行紫外光空白测定，然后倒掉蒸馏水，加入200 μl 已稀释的DNA溶液，测定260 nm及280 nm的光吸收值（OD260及OD280），计算DNA浓度及OD260/OD280比值。计算公式如下：
- $\text{dsDNA} = 50 \times (\text{OD260}) \times \text{稀释倍数}$
- 以上浓度单位为 $\mu\text{g} / \text{ml}$

六、注意事项

- (1) 叶片磨得越细越好。
- (2) 移液器的使用。
- (3) 由于植物细胞中含有大量的**DNA**酶，因此，除在抽提液中加入**EDTA**抑制酶的活性外，第一步的操作应迅速，以免组织解冻，导致细胞裂解，释放出**DNA**酶，使**DNA**降解。

七、作业

- (1) 本实验所得的植物总DNA制剂中含有哪些遗传物质？
- (2) 在DNA抽提过程中造成DNA分子断裂的主要因素有哪些？
- (3) 本实验中所用到下列试剂的作用各是什么？
CTAB, 氯仿, 异丙醇, 75%乙醇, EDTA, 巯基乙醇