



实 验



肝脏DNA提取

实验目的

- 掌握基因组**DNA**提取的原理和实验操作细节；
- 熟悉实验动物的取材方法及组织匀浆制备方法；
- 了解试剂盒提取质粒**DNA**方法和原理，离心机的分类；

一般过程

- 破碎细胞
- 提取核蛋白
- DNA核蛋白和RNA核蛋白分离
- 蛋白和核酸分离





原则

- 低温：抑制DNA酶的活性
- 操作柔和：防止DNA断链

DNA分离纯化的原理

- DNA或DNP在0.14MNaCl盐溶液中溶解度很低，而RNA则溶于0.14MNaCl盐溶液，利用这一性质可将生物组织中的DNA与RNA分开



- DNA在生物体内是与蛋白质形成复合物的形式存在的，因此提取脱氧核糖核蛋白复合物-DNP后，必须将其中蛋白去除
- 其中蛋白质部分可用SDS使之变性除去（同时破坏核酸分解酶）。



- 进一步纯化则利用**氯仿-异戊醇**震荡除蛋白，震荡时，蛋白质变性，形成凝胶，并与DNA分开，DNA则留在水层中。
- 利用DNA不溶于**乙醇**，因而用乙醇将DNA 从溶液中沉淀出来。

离心机的使用

- 平衡
- 对称放入，盖上盖
- 设定转速、时间
- 离心开始
- 完全停止后开盖





实验步骤

- 1、取新鲜猪肝4g，用0.14mol/L NaCl — 0.15mol/L EDTA溶液洗去血液，**剪碎**。加入10ml 0.14mol/L NaCl — 0.15mol/L EDTA溶液，置匀浆器中**研磨**。（初步破碎细胞）。（已做）



- 2、取一支5mlEP管，装入糊状物（基本装满），离心5min（10000rpm），弃去上清液
- 沉淀用0.14mol/l NaCl-0.15mol/l EDTA溶液洗2次。每次加入溶液后用吸管吹打均匀再离心（同上），直到上清液无血细胞。
- 弃上清液，所得沉淀为DNP（DNA蛋白复合物）粗制品



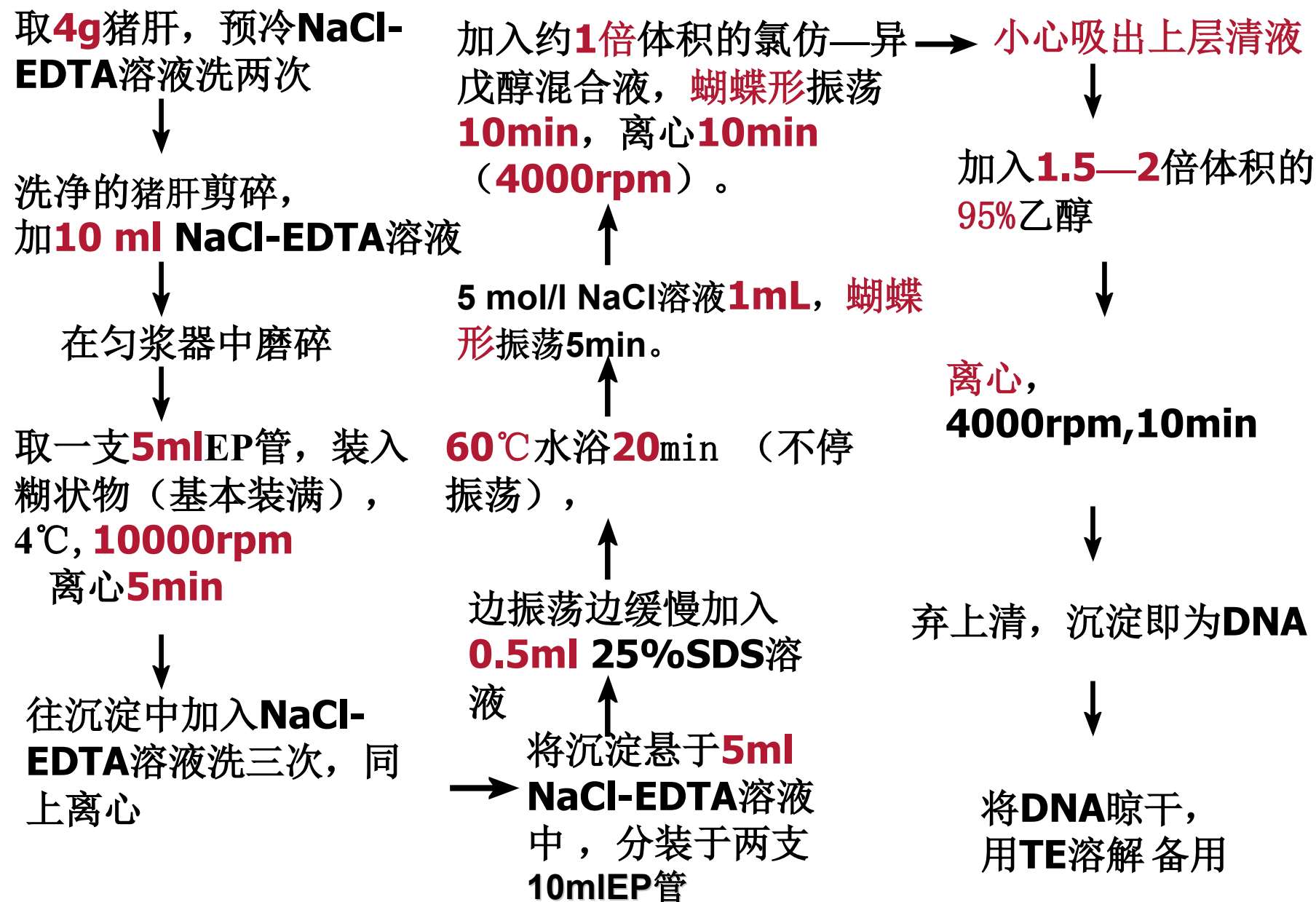
- 3、向上述沉淀物加入0.14mol/L NaCl — 0.15mol/L EDTA溶液 5ml，分装于2支10mlEP管，然后每管滴加25%SDS溶液1.0mL，边加边振荡。加毕，置60℃水浴 10min （不停振荡），直至溶液变得粘稠并略透明，取出冷却至室温。此步骤使核酸与蛋白质分离。



- 4、每管加入5 mol/1 NaCl溶液1mL，**蝴蝶形**振荡5min。加入约1倍体积的**氯仿—异戊醇**混合液，**蝴蝶形**振荡10min，**离心10min**（4000rpm）。
- 此步骤后溶液分三个相：上层水相（DNA）；中层变性蛋白质相；下层有机相和残余的RNA。



- 5、吸出上清液，弃去沉淀。
向上清液中缓慢加入1.5—2
倍体积的95%乙醇，DNA沉淀
析出，[离心（4000rpm）
10分钟]
- 用玻棒搅出的丝状物则为粗
DNA



核酸含量测定

将样品配置成5-50ug/ml的核酸溶液。与紫外分光光度计上测定260nm和280nm吸收值，计算核酸浓度和两者吸收比值。

RNA浓度 (ug/ml) = $O.D_{260} / (0.024 \times L)$ × 稀释倍数

DNA浓度 (ug/ml) = $O.D_{260} / (0.020 \times L)$ × 稀释倍数

$O.D_{260}$: 260nm处光吸收值

L: 比色皿的厚度 (cm)

0.024: 每ml溶液内1ugRNA的光密度

0.020: 每ml溶液内1ugDNA的光密度

思考题

1. 核酸提取中**SDS**、氯仿-异戊醇各有什么作用？
2. 核酸定量测定方法有几种？
3. 核酸分离过程应该注意些什么？
4. 结合本人操作的体会，试述在提取过程中应如何避免大分子**DNA**的降解和断裂？
5. 核酸提取过程中，除去杂蛋白的方法主要有哪几种？