

DNA 分离纯化

一、准备工作

乙醇、0.1M 柠檬酸钠(含 10%乙醇)、75%乙醇、8mM NaOH

二、操作步骤

1. 样品加氯仿分层后，移去上层水相，用乙醇沉淀中间层和有机相中的 DNA。每一使用 1ml TRIzol 加 0.3ml 无水乙醇混匀，室温放置 3min，2-8°C 不超过 2000×g 离心 5min
2. 移去上清，（如需分离蛋白质，可保留，进一步操作见后）用含 10%乙醇的 0.1M 柠檬酸钠洗涤 DNA 沉淀。每一用 1ml TRIzol 加入 1ml 柠檬酸钠，室温放置 30min，2-8°C 2000×g 离心 5min，弃上清，重复一次
3. 用 75%乙醇再洗一遍 DNA 沉淀，每一用 1ml TRIzol 加入 1.5-2 ml 75%乙醇，室温放置 10-20min(时时颠倒混淆) 2-8°C 2000×g 离心 5min，弃上清
4. 室温放置晾干 DNA 5-15min，用灭菌 ddH₂O 溶解 DNA。从 50-70mg 组织或者 10⁷ 细胞中分离的 DNA 溶于 300-600μl 水，DNA 的浓度通常为 0.2-0.3μg/μl。提出取得的 DNA 沉淀不易溶于水和 Tris 缓冲液中，建议用微弱的碱溶解，8mM NaOH 的 pH 值为 9，溶解 DNA 后可用 TE，HEPES 调节 pH。从某些样品（尤其是组织）中提出取得的 DNA 中可能包含一些胶状不溶物，可大于 12000×g 离心 10min 除去
5. DNA 的定量：采用 nandrop 定量。根据 DNA 产量可估计细胞数，人，大鼠，小鼠 1×10⁶ 二倍体细胞含 DNA 的量分别为 7.1μg, 6.5μg, 5.8μg
6. 预先期待产量：1mg 组织或者 1×10⁶ 细胞提出取得 DNA 分别为肝和肾 3-4μg 骨骼肌，脑组织，胎盘 2-3μg 人，大鼠，小鼠培养细胞（1×10⁶）5-7μg 成纤维细胞 5-7μg

注意：

- 1) DNA 在中间层和有机相中时可在 2-8°C 保存留宿；
- 2) DNA 沉淀在 75%乙醇中 2-8°C 可保存几个月；

- 3) DNA 在 8mM NaOH 溶液中 4°C 可放置留宿, 如长期保存需用 HEPES 调节 pH 至 7-8 而且加 EDTA 至 1mM, 可置于 4°C 或者 -20°C 长期保存。

三、 常见问题分析

- 1) 得率低:
 - a) 样品匀浆和裂解的不彻底;
 - b) 终极得到的 DNA 沉淀没有完全溶解。
- 2) $A_{260}/A_{280} < 1.70$:
 - a) 检测吸光度时, 样品没有溶于水, 而溶于了 TE 中;
 - b) 酚除去的不彻底, 可用 0.1M 柠檬酸钠 (含 10% 乙醇) 再洗一遍 DNA 沉淀。
- 3) DNA 降解:
 - a) 组织取出后没有立即处理或者冷冻;
 - b) 待提出取得 RNA 的样品没有保存于 -60 至 -70°C, 而保存在了 -5 至 -20°C;
 - c) 样品匀浆时使用了高速匀浆仪。
- 4) RNA 污染:
 - a) 氯仿分层后水相去除的不干净;
 - b) DNA 沉淀用 0.1M 柠檬酸钠 (含 10% 乙醇) 洗的不彻底。