

水稻叶片高质量 DNA 抽提

High-quality DNA Extraction from Rice Leaves

吴昊, 陈太钰, 林拥军, 陈浩*

作物遗传改良国家重点实验室, 华中农业大学, 武汉

*通讯作者邮箱: hchen@mail.hzau.edu.cn

引用格式: 吴昊, 陈太钰, 林拥军, 陈浩. (2018). 水稻叶片高质量 DNA 抽提. *Bio-101* e1010102. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010102.

How to cite: Wu, H., Chen, T. Y., Lin, Y. J. and Chen, H. (2018). High-quality DNA extraction from rice leaves. *Bio-101* e1010102. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010102. (in Chinese)

实验原理: 植物体内的 DNA 通常在细胞核中以核蛋白的形式存在, 利用阳离子去垢剂 CTAB (hexadecyltrimethylammonium bromide, 十六烷基三甲基溴化铵) 与剧烈的高低温差破坏细胞膜结构使这些核蛋白释放出来。利用氯仿等有机试剂去除蛋白、多糖、酚类等杂质, 且 DNA 在高盐 (1 M NaCl 溶液) 条件下可溶, 最后使用高浓度酒精溶液重新沉淀获得高质量的植物基因组 DNA。

实验目的: 大量提取植物基因组 DNA, 可用于 Southern blot 分析, 对转基因植株进行外源基因插入拷贝数和整合模式检测等。

关键词: 总 DNA, 大样抽提, Southern blot

材料与试剂

1. 10 ml 离心管
2. 水稻叶片
3. CTAB 粉末 (Bio Basic Inc. GB0308BJ011J)
4. Tris-HCl, pH 8.0 (进口分装)
5. EDTA, pH 8.0 (国药)
6. NaCl (国药集团有限公司, 分析纯)
7. 异戊醇
8. 液氮
9. 氯仿/异戊醇 (24:1)

10. 10% CTAB
11. RNase
12. 75%乙醇
13. 琼脂糖
14. 1.5x CTAB (见溶液配方)
15. 10% CTAB (见溶液配方)
16. 1% CTAB (见溶液配方)
17. 氯仿/异戊醇 24:1(体积比) (见溶液配方)
18. 1 M NaCl 溶液 (见溶液配方)
19. TE buffer (见溶液配方)

仪器设备

1. 水浴锅
2. 通风橱
3. 离心机

实验步骤

1. 取 1 g 生长旺盛的水稻植株叶片，于液氮中迅速研磨成粉。
注意：请用冰盒取样，如不能立即抽提可保存于-20 °C。建议取样后尽快抽提，避免样品 DNA 降解。将粉末转移至 10 ml 离心管中，加入 2 ml (枪头需提前划好刻度以免因受热后吸取过量)煮沸的 1.5x CTAB (保持高温)。
2. 65 °C 温浴 30 min。
3. 检查样品顺序，在通风橱内加入等体积 (氯仿腐蚀性很强且易挥发，对移液器损害很大，可使用玻璃滴管) 的氯仿/异戊醇 (V/V=24:1)，盖紧管盖，仔细检查保证每个离心管不漏液，轻缓颠倒混匀 25 min，3,000 rpm 离心 15 min。
4. 打开管盖，转移上清液于另一 10 ml 离心管中，加入 1/10 体积 (约 200 μ l) 的 10% CTAB (提前于 65 °C 温浴)，再加入等体积的氯仿/异戊醇 (V/V=24:1)，轻缓颠倒混匀 20 min，3,000 rpm 离心 15 min。
5. 用移液器吸上清 (如果使用 1 ml 的枪头，需提前剪去大约 7 mm 的枪尖，吸取上清

- 时会更加平缓) 转移到于离心管, 加入 5 ml 1% CTAB, 充分混合均匀后, 静置 10 min 看见离心管中絮状 DNA 聚集, 3,000 rpm 离心 15 min。
6. 弃上清, 每管加入 1 ml 1 M NaCl 溶液和 1 μ l 100 μ g/ml RNase (可根据所需量提前配好 Mixture), 65 °C 溶解 1 d。
 7. 加入 3 ml -20 °C 预冷的无水乙醇 (95%乙醇也可), 充分混合均匀后可见絮状 DNA 沉淀。
 8. 用枪头将 DNA 沉淀转至新的 1.5 ml 离心管中, 用 75%的乙醇洗涤沉淀, 10,000 rpm 离心 5 min。
 9. 弃上清, 晾干后溶于 50 μ l-100 μ l TE 中, 溶解至少 1 周。
注: 如果需要较长时间保存 DNA 用 TE 溶解; 如果仅较短时间保存 DNA 可直接用灭菌双蒸水溶解。
 10. 取 1 μ l DNA 溶液用于 0.8%琼脂糖凝胶电泳检测提取的基因组 DNA 质量, 剩余 DNA 于-20 °C 保存备用。

溶液配方

1. 1.5x CTAB

15 g	CTAB 粉末 (Bio Basic Inc. GB0308BJ011J)
75 ml	1 M Tris-HCl, pH 8.0 (进口分装)
30 ml	0.5 M EDTA, pH 8.0 (国药)
61.4 g	NaCl (国药集团有限公司, 分析纯)

 定容 1 L, 搅拌溶解 2 h
2. 10% CTAB

100 g	CTAB 粉末
40.95 g	NaCl

 定容 1 L, 搅拌溶解过夜, 使用前 65 °C 水浴预热
3. 1% CTAB

10 g	CTAB 粉末
50 ml	1 M Tris-HCl, pH 8.0
20 ml	0.5 M EDTA, pH 8.0

 定容 1 L, 搅拌均匀

4. 氯仿/异戊醇 24:1 (体积比)

在 500 ml 氯仿中加入 22 ml 异戊醇

5. 1 M NaCl 溶液

NaCl 58.44 g, 加双蒸水溶解, 定容 1 L, 分装后灭菌

6. TE buffer

5 ml 1 M Tris-HCl, pH 8.0

1 ml 0.5 M EDTA, pH 8.0

加双蒸水溶解, 定容 500 ml, 分装后灭菌