

2 ml 离心管法快速制备水稻高质量总 DNA

符德保, 龙湍, 杨莹, 吴昌银*

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: cywu@mail.hzau.edu.cn

引用格式: 符德保, 龙湍, 杨莹, 吴昌银. (2018). 2 ml 离心管法快速制备水稻高质量总 DNA. *Bio-101* e1010106. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010106.

实验原理: CTAB (hexadecyltrimethylammonium bromide, 十六烷基三甲基溴化铵), 是一种阳离子去污剂, 它与 DNA 结合形成的复合物在高盐溶液中可溶并且稳定存在。在粉碎后的植物叶片组织中加入含有 CTAB 的抽提缓冲液, 可以保持 DNA 溶解于水相。用氯仿除去蛋白质, 多糖和酚类等有机杂质后, 在水相中加入异丙醇即可将纯度较高的 DNA 沉淀出来。

实验目的: 快速制备少量可用于酶切连接反应的水稻总 DNA。

关键词: 水稻, 叶片, 抽提, 高质量 DNA

材料与试剂

1. CTAB (Bio Basic Inc., Canada)
2. NaCl (国药试剂)
3. EDTA (天津市天力化学试剂有限公司)
4. Tris (Angus Chemical Company, USA)
5. HCl (国药试剂)
6. RNase A (Invitrogen, USA)
7. β -巯基乙醇 (Sigma, USA)
8. 三氯甲烷 (国药试剂)
9. 异丙醇 (国药试剂)
10. 液氮 (武汉液氮厂)
11. 95%乙醇 (国药试剂)
12. CTAB 抽提缓冲液 (见溶液配方)

13. TE 缓冲液 (见溶液配方)

仪器设备

1. 台式离心机 (Beckman, USA)
2. 电热恒温培养箱 (SKP-02.3000, 黄石市恒丰医疗器械有限公司)
3. 冰箱 (BCD-243K F&R, 新飞)

实验步骤

1. 在苗期收获适量水稻叶片于-20 °C 冰箱保存备用。
2. 将叶片在液氮中磨碎, 转移 1/4 到 1/3 管量的粉末到 2 ml 离心管中。
3. 向每管样品中加入 800 μ l CTAB 抽提缓冲液, 振荡 1 min, 65 °C 温育 10-15 min。
4. 加 0.7 倍体积三氯甲烷(600 μ l), 剧烈振荡 1 min。
5. 12,000 rpm 离心 10 min, 将上清液(500 μ l)转移的新的 1.5 ml 离心管中。
6. 加 0.7 倍体积异丙醇(350 μ l), 颠倒混匀, 12,000 rpm 离心 10 min。
7. 倒上清液, 加 70%乙醇 1 ml 洗沉淀。
8. 倒乙醇, 在超净台上将沉淀吹干, 加 50 μ l TE 溶解。
9. 用 1%(w/v)琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量(选做)。

注意事项

1. 用本法抽提的 DNA 质量较高, 但有部分降解是正常现象 (图 1)。一般主带处未降解的完整 DNA 浓度约为 140-200 ng/ μ l (与上样量有关)。

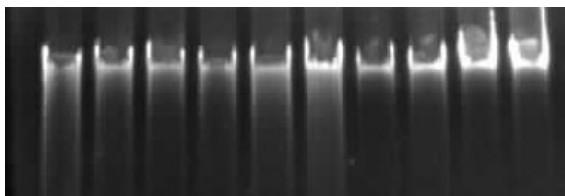


图 1. 2 ml 离心管法抽提的 DNA 电泳检测图

2. 在-70 °C 超低温冰箱保存样品, 磨样前叶片不冻融可以显著提高 DNA 质量。
3. 叶片粉末磨得越细, 最后抽提到的 DNA 质量越好, 产量越高。

溶液配方

1. CTAB 抽提缓冲液

2% (w/v) CTAB

1.42 mol/L NaCl

20 mmol/L EDTA

100 mmol/L Tris, pH 8.0

使用前加 1/80 体积 RNase A, 0.2% (v/v) β -巯基乙醇

2. TE 缓冲液

10 mmol/L Tris, pH 8.0

1 mmol/L EDTA