

CTAB 法提取草莓 DNA

DNA Extraction from Strawberry with CTAB

魏灵芝, 毛文文, 李冰冰, 贾文锁*

果树系, 园艺学院, 中国农业大学, 北京

*通讯作者邮箱: jjaws@cau.edu.cn

引用格式: 魏灵芝, 毛文文, 李冰冰, 贾文锁. (2018). CTAB 法提取草莓 DNA. *Bio-101* e1010219. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010219.

How to cite: Wei, L. Z., Mao, W. W., Li, B. B. and Jia, W. S. (2018). DNA extraction from strawberry with CTAB. *Bio-101* e1010219. Doi: 10.21769/BioProtoc. 1010219.

摘要: 植物DNA的提取通常采用液氮研磨的方法破碎植物组织和细胞, 通常需在抽提缓冲液中加入巯基乙醇以降低植物细胞匀浆中的多种氧化酶类对DNA抽提的影响。CTAB (十六烷基三甲基溴化铵) 是阳离子去污剂, 可溶解细胞膜, 它能与核酸形成复合物, 在高盐溶液中可溶, 当盐溶液浓度降低到一定程度时从溶液中析出, 通过高速离心既可将CTAB与核酸的复合物与蛋白、多糖类物质分离, 然后将CTAB与核酸的复合物沉淀重新溶解于高盐溶液中, 再加入乙醇使核酸沉淀, 再将沉淀DNA的溶于TE溶液中, 即得草莓组织总DNA溶液。DNA的光谱吸收峰在260 nm处, 蛋白的吸收峰在280 nm处, 测定DNA含量时, 通常计算OD₂₆₀/OD₂₈₀比值, 该值为1.8-2.0时, DNA纯度较高, 可进行后续PCR试验。

关键词: 草莓, CTAB, DNA

材料与试剂

1. 枪头
2. 离心管
3. 草莓组织
4. β -巯基乙醇
5. 液氮
6. 氯仿
7. 异戊醇

8. 异丙醇
9. NaAc
10. 乙醇
11. Tris-HCl (pH 8.0) (Solarbio, catalog number: T1140)
12. Na₂-EDTA
13. CTAB
14. PVP
15. NaCl
16. RNase (Takara, catalog number: 2311A)
17. RNase-TE 溶液 (见溶液配方)
18. CTAB 缓冲液 (见溶液配方)

仪器设备

1. 研磨用具
2. 移液枪
3. 水浴锅或烘箱
4. 离心机
5. -20 °C 冰箱
6. NanoDrop 超微量核酸蛋白测定仪
7. 电泳仪
8. 高压灭菌锅

实验步骤

1. 在 CTAB 缓冲液中加入 β-巯基乙醇 (终浓度为 0.2%)，使用前 65 °C 预热。
2. 称取 100 mg 草莓果肉组织/50 mg 叶片组织，液氮研磨成粉末，装入预冷的 2 ml 离心管中。
3. 加入 500 μl 预热的 CTAB，混匀，65 °C 温育 1 h，期间每 15 min 颠倒混匀。
4. 冷却到室温，加入 500 μl 氯仿:异戊醇 (24:1) 抽提，10,000 x g 离心 10 min，抽取上清液。
5. 上清液加入等体积 (500 μl) 的氯仿:异戊醇 (24:1) 再次抽提，10,000 x g 离心

- 10 min，再次吸取上清液。
6. 加入 2/3 体积的-20 °C预冷的异丙醇，1/10 体积的 3 M NaAc (pH=5.4)，轻轻混匀，-20 °C沉淀 1 h。
 7. 10,000 x g 离心 10 min，弃上清。
 8. 加入 500 μ l 70%乙醇洗涤沉淀，10,000 x g 离心 10 min，弃上清。
 9. 重复步骤 8。
 10. 放置 10 min，待残存乙醇挥发完全，加入 50 μ l 含 RNase (30 μ l/ml) 的 TE 溶液，37 °C 温育 30 min。
 11. 用 NanoDrop 超微量核酸蛋白测定仪测定 DNA 溶液在波长 230 nm，260 nm 和 280 nm 处的吸收值并获得 DNA 浓度。取 2 μ l DNA 溶液进行琼脂糖凝胶电泳，查看 DNA 完整性，-20 °C 保存。

溶液配方

1. RNase-TE 溶液

Tris-HCl (pH 8.0) 终浓度 10 mM 500 μ l

Na₂-EDTA 终浓度 1 mM 100 μ l

加水至 50 ml 高压灭菌，室温保存

2. CTAB 缓冲液

1 M Tris-HCl (pH 8.0) 10 ml

0.5 M Na₂-EDTA (pH 8.0) 4 ml

CTAB 2 g

PVP 2 g

NaCl 8.19 g

定容至 100 ml，高压灭菌，室温避光保存，用前按体积比加入 3%的 β -巯基乙醇