

植物 DNA 提取方法

方法一：

- 1.取两片幼嫩新鲜叶片，置于预冷的研钵中，倒入适量液氮，迅速研磨成粉末状，随后加入 3ml 预热的 2%CTAB 抽提缓冲液和 50ul 抗氧化剂 2-巯基乙醇，继续研磨成略有流动性的糊状或粥状，转入 1.5ml 的离心管中，于 65°C 水浴锅中保温约 60min。
- 2.待混合物冷却至室温后加入等 600ul 的 CI（氯仿：异戊醇=24：1）溶液混匀，轻轻颠倒离心管几次使管内混合物成乳浊液，常温下 10000rpm 离心 10min,取上清液转入另一干净的离心管中。
- 3.重复步骤（2）一次。
- 4.取步骤（3）上清液加入 2.5 倍体积无水乙醇，仔细混匀，-20 冰箱 30min 以上，沉淀 DNA 4°C，12000rpm 离心 10min。
- 5.弃去上层有机溶剂，加 500ul75%乙醇洗涤沉淀，4°C下 8000rpm 离心 5min,弃去上清，洗涤沉淀 3 次。
- 6.倒置或者 37 度培养箱烘干。
- 7.加 50ulTE 缓冲液溶解 DNA，于-20°C冷藏备用。

方法二：

1. 在 50ml 离心管中加入 20ml 提取缓冲液 I，60°C水浴预热。
2. 植物 5-10g, 剪碎, 在研钵中加液氮磨成粉状后立即倒入预热的离心管中, 剧烈摇动混匀, 60°C水浴保温 30-60 分钟(时间长,DNA 产量高), 不时摇动。

3. 加入 20ml 氯仿/戊醇/乙醇溶液, 颠倒混匀(需带手套, 防止损伤皮肤), 室温下静置 5-10 分钟, 使水相和有机相分层(必要时可重新混匀)。
4. 室温下 5000rpm 离心 5 分钟。
5. 仔细移取上清液至另一 50ml 离心管,加入 1 倍体积异丙醇,混匀,室温下放置片刻即出现絮状 DNA 沉淀。
6. 在 1.5mleppendorf 中加入 1ml TE。用钩状玻璃棒捞出 DNA 絮团,在干净吸水纸上吸干,转入含 TE 的离心管中,DNA 很快溶解于 TE。
7. 如 DNA 不形成絮状沉淀,则可用 5000rpm 离心 5 分钟, 再将沉淀移入 TE 管中。这样收集的沉淀,往往难溶解于 TE,可在 60°C水浴放置 15 分钟以上, 以帮助溶解。
8. 将 DNA 溶液 3000rpm 离心 5 分钟,上清液倒入干净的 5ml 离心管。
9. 加入 5 μ lRNaseA(10 μ g/ μ l), 37°C 10 分钟, 除去 RNA(RNA 对 DNA 的操作、分析一般无影响, 可省略该步骤) 。
10. 加入 1/10 体积的 3mol/L NaAc 及 2 \times 体积的冰乙醇,混匀,-20°C放置 20 分钟左右,DNA 形成絮状沉淀。
11. 用玻棒捞出 DNA 沉淀,70%乙醇漂洗,再在干净吸水纸上吸干。
12. 将 DNA 重溶解于 1ml TE, -20 贮存。
13. 取 2 μ lDNA 样品在 0.7% Agarose 胶上电泳, 检测 DNA 的分子大小。同时取 15 μ l 稀释 20 倍, 测定 OD260/OD280, 检测 DNA 含量及质量。

方法三:

植物 DNA 的 SDS 提取法:

试验试剂:

- 1、研磨缓冲液: 称取 59.63gNaCl, 13.25g 柠檬酸三钠, 37.2gEDTA - Na 分别溶解后合并为一, 用 0.2mol/L 的 NaOH 调至 pH7.0, 并定容至 1000ml。
- 2、10×SSC 溶液: 称取 87.66gNaCl 和 44.12g 柠檬酸三钠, 分别溶解, 一起定容至 1000ml。
- 3、1×SSC 溶液: 用 10×SSC 溶液稀释 10 倍。
- 4、0.1×SSC 溶液: 用 1×SSC 溶液稀释 10 倍。
- 5、Rnase 溶液: 用 0.14mol/LNaCl 溶液配制成 25mg/ml 的酶液, 用 1mol/LHCl, pH 至 5.0, 使用前经 80°C水浴处理 5min (以破坏可能存在的 Dnase) 。
- 6、氯仿 - 异戊醇: 按 24ml 氯仿和 1ml 异戊醇混合。
- 7、5mol/L 高氯酸钠溶液: 称取 $\text{NaClO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 70.23g, 先加入少量蒸馏水溶解再容至 100ml。
- 8、SDS (十二烷基硫酸钠) 化学试剂的重结晶: 将 SDS 放入无水酒精中达到饱和为止, 然后在 70 ~ 80°C的水浴中溶解, 趁热过滤, 冷却之后即将滤液放入冰箱, 待结晶出现再置室温下凉干待用。
- 9、1mol/LHCl。
- 10、0.2mol/LNaOH。
- 11、二苯胺乙醛试剂: 1.5g 二苯胺溶于 100ml 冰醋酸中, 添加 1.5ml 浓硫酸, 装入棕色瓶, 贮存暗处, 使用时加 0.1ml 乙醛液 [浓乙醛: $\text{H}_2\text{O} = 1: 50$

(V / V)] 。

12、1.0mol/L 高氯酸溶液 (HClO₄) 。

13、0.05mol/LNaOH。

14、DNA 标准液：取标准 DNA25mg 溶于少量 0.05mol.L-1NaOH 中，再用 0.05mol/LNaOH 定容至 25ml，后用移液管吸取此液 5ml 至 50ml 容量瓶中，加 5.0ml1mol/LHClO₄，混合冷却后用 0.5mol/LHClO₄ 定容至刻度，则得 100μg/ml 的标准溶液。

实验步骤：

- 1、称取植物幼嫩组织 10g 剪碎置研钵中，加 10ml 预冷研磨缓冲液并加入 0.1g 左右的 SDS，置冰浴上研磨成糊状。
- 2、将匀浆无损转入 25ml 刻度试管中加入等体积的氯仿 - 异戊醇混合液，加上塞子，剧烈振荡 30s，转入离心管，静置片刻以脱除组织蛋白质。以 4000rpm 离心 5min。
- 3、离心形成三层，小心地吸取上层清液至刻度试管中，弃去中间层的细胞碎片、变性蛋白质及下层的氯仿。
- 4、将试管置 72°C 水浴中保温 3min (不超过 4min) ，以灭活组织的 DNA 酶，然后迅速取出试管置冰水浴中冷却到室温，加 5mol/L 高氯酸钠溶液〔提取液：高氯酸钠溶液 = 4: 1 (V / V) 〕，使溶液中高氯酸钠的最终浓度为 1mol/L。
- 5、再次加入等体积氯仿 - 异戊醇混合液至大试管中，振荡 1min，静置后在室温下离心 (4000rpm) 5min，取上清液置小烧杯中。

- 6、用滴管吸 95% 的预冷乙醇，慢慢地加入烧杯中上清液的表面上，直至乙醇的体积为上清液的两倍，用玻璃棒轻轻搅动。此时核酸迅速以纤维状沉淀缠绕在玻璃棒上。
- 7、然后加入 0.5ml 左右的 10×SSC，使最终浓度为 1×SSC。
- 8、重复第 6 步骤和第 7 步骤即得到 DNA 的粗制品。
- 9、加入已处理的 Rnase 溶液，使其最后的作用浓度为 50 ~ 70μg/ml，并在 37°C 水浴中保温 30min，以除去 RNA。
- 10、加入等体积的氯仿 - 异戊醇混合液，在三角瓶中振荡 1min，再除去残留蛋白质及所加 Rnase 蛋白，室温下以 4000rpm 离心 5min，收集上层水溶液。
- 11、再按 6、7 步骤处理即可得到纯化的 DNA 液。

方法四：

改进的 SDS 法提取植物叶片基因组 DNA

- 1、取指甲大小的植物叶片，置于研钵中，加入适量液氮，用研棒磨成粉末（越细越好）。
- 2、将粉末移入 1.5 ml 离心管，加入 DNA 提取洗涤液 1.5 ml，轻轻颠倒混匀。
- 3、8000 rpm 离心 10 min，弃上清，加入洗涤液 1 ml，混匀，8000 rpm 离心 10min，弃上清，共洗涤 2 遍。
- 4、加入预热的 DNA 裂解液 500 μL，用牙签轻轻搅拌均匀，置 65°C 水浴 30 min。

- 5、水浴后立即加入苯酚/氯仿/异戊醇 500 μL ，颠倒数次，这时溶液变为乳白色，10000 rpm 离心 5min，取上清液至新的 1.5ml 离心管中。
- 6、加入 55 μL 醋酸钾，颠倒混匀，10000 rpm 离心 10min，取上层清液转移至新的 1.5ml 离心管中。
- 7、加入异丙醇 300 μL ，室温 30 min 或 -20°C 放置 2 hr，12000 rpm 离心 10min，弃上清，取沉淀，加入 500 μL 70%乙醇，室温放置 2 min，12000 rpm 离心 5 min，弃上清，取沉淀。
- 8、加入 30 μL 含 5 g/ml RNase 的 TE 缓冲液， 37°C 水浴放置 1hr。
- 9、离心 30 s 后，取 10 μL 于 0.8%琼脂糖凝胶上进行电泳鉴定。

方法五：

植物 DNA 的 CTAB 提取法：

- 1、称取新鲜叶片 2-3g，剪碎放入研钵中，在液氮中研磨成粉末。
- 2、将粉末转移到加有 7ml 经预热的 $15\times$ CTAB 提取缓冲液 15ml 离心管中，迅速混匀后置于 65°C 水浴中，温育 30min。
- 3、取出离心管，冷却至室温，加入氯仿/异戊醇(24:1)，充分混匀，室温下 2300 转离心 20min。
- 4、将上清转移至另一新的 15ml 离心管中，加入 1/10 体积 10%的 CTAB 和等体积的氯仿/异戊醇。充分混匀，2300rpm 离心 20min。
- 5、转移上清至另一新的 15ml 离心管中，加入等体积 1%的 CTAB 沉淀缓冲液，轻轻摇晃至形成 DNA 絮状沉淀。1000rpm 离心 10min，使 DNA 沉淀于管底。

- 6、加入 1.5-2ml 的 1mol/LNaCl 及 5 μ lRNase 置于 56 $^{\circ}$ C水浴中过夜。
- 7、待 DNA 完全溶解后，加 2-3ml4 $^{\circ}$ C预冷的 95%的冰乙醇使 DNA 沉淀，挑出 DNA，置于 15ml 离心管中，用 70%乙醇清洗 30min。
- 8、离心机甩 5s，倒出 70%乙醇，再用 95%乙醇浸泡 5min，倒出 95%乙醇，在超净工作台上吹干。
- 9、将风干的 DNA 直接在 4 $^{\circ}$ C保存备用或溶于 100 μ lTE 溶液中于-20 $^{\circ}$ C保存。