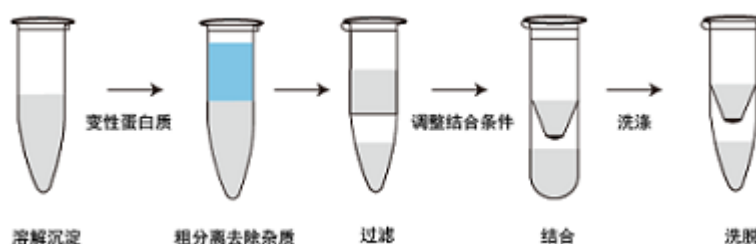


Gd200 组织研磨仪在动物基因组 DNA 提取中的应用

在分子生物学领域, 提取高质量的基因组 DNA 是试验成功的前提, 那么如何提取高质量的基因组 DNA, 下面就将介绍动物组织基因组总 DNA 提取的一种方法, 包括实验原理、实验步骤、注意事项以及常见问题解析。



1. 实验材料

动物组织或培养的细胞, 液氮, 裂解缓冲液, 3mol/L 的 NaAc 溶液 (pH5.2), 70% 及 100% 的乙醇, TE 溶液 (pH 8.0), 25:24:1 的苯酚/氯仿/异丙醇, 冰上预冷的 PBS (样本为细胞才需要), 水浴锅或温箱 (调至 50°C)。

2. 实验步骤

2.1. 样本处理

2.1.1. 动物组织

方法一：手工裂解

(1) 切取一小块组织 (0.2~1.0 g, 尽量去除纤维结缔组织) 并称重, 尽量剪碎后放入研钵。

(2) 加入少量液氮使研钵及组织初步冷冻, 然后用枪头或小木棒移动一下组织, 防止其黏在研钵上。

(3) 再次加入液氮, 使组织尽可能冻脆, 然后在液氮即将挥发完的时候开始迅速研磨。

(4) 将组织粉末倒入装有裂解缓冲液 (每 100mg 组织 1.2mL) 的离心管中。

方法二：GD200 组织研磨仪自动裂解

- (1) 切取一小块组织 (0.2~1.0 g, 尽量去除纤维结缔组织) 并称重, 尽量剪碎后放入 2ml 离心管。
- (2) 加入少量裂解子到离心管, 并将离心管放到冷冻适配器中。
- (3) 将冷冻适配器放入到液氮罐内冷冻。
- (4) 将冷冻适配器放置到 GD200 研磨仪, 按转速 2000RPM, 研磨 2 分钟
- (5) 将有裂解缓冲液 (每 100mg 组织 1.2mL) 的加入到离心管中。

2.1.2. 培养细胞

- (1) 将细胞粗略计数后收集至离心管, 5°C 500 g 离心 5 min, 去上清。
- (2) 加入等量预冷的 PBS 吹打匀后, 5°C 500 g 离心 5min, 弃上清。
- (3) 重复 (2) 步一次。
- (4) 每 10⁸ 个细胞加入 1mL 裂解缓冲液 (最少 0.3mL)

2.2. 消化

将上述离心管盖紧后放置于 50°C 水浴锅或温箱中 (有条件可轻微摇动)。12~18 h 后溶液应呈黏稠状。

2.3. 核酸抽提

- (1) 加入与水相等体积的饱和酚/氯仿/异丙醇溶液, 并上下倒置混匀。1700g 离心 5 min。
- (2) 将上层水相小心吸出至另一新离心管中。
- (3) 重复上述的两步。
- (4) 加入 0.1 倍体积的 3 mol/L 的 NaAc 溶液及 2 倍体积的 100%乙醇, 轻轻转动离心管至溶液混匀, -20°C 放置 10~20 min, DNA 沉淀形成白色丝状物。
- (5) 用玻棒挑出 DNA 沉淀, 70%乙醇中漂洗并晾干后, 加入 TE 溶液 (每 0.1g 组织或 10⁸ 个细胞加 0.2 mL), 彻底溶解后 -20°C 保存。

3. 关键因素

- (1) 如果样品是肝组织，注意在取材的时候不要被胆囊污染，因为其中含有大量消化酶。
- (2) 第一次加入液氮时不能太多，防止组织紧紧黏附在研钵上，影响研磨；第二次加入液氮要比较多，使组织尽可能冻硬冻脆，才能研磨粉碎，而且动作要迅速，防止 DNA 被降解。
- (3) 蛋白质一定要去除干净，防止其干扰后续的酶切，必要时重复用蛋白酶 K 消化。
- (4) 用酚/氯仿抽提时应避免剧烈振荡，防止基因组 DNA 断裂成小片段。
- (5) 第二次酚/氯仿抽提时应避免吸到下层的有机相。
- (6) 70%乙醇漂洗完后应尽可能晾干，以免抑制后续反应。
- (7) 要避免对高分子量 DNA 的剪切，可将最后上层的水相 DNA 溶液用 TE 缓冲液作两次透析，每次 24h 以上。以除去有机溶剂和盐。
- (8) 除去残留的 RNA，加入 0.1% 的 SDS 和 1 μ g/mL 无 DNA 酶的 RNase，37 $^{\circ}$ C 温育 1h，重复核酸抽提的步骤。
- (9) 最后一步溶解 DNA 沉淀时可置于 65 $^{\circ}$ C 帮助溶解。

4. 常见问题

- (1) 有机相与水相不能均匀分开，一般是由于 DNA 浓度太高或还残留着大量细胞的残存成分。此时应加入适量裂解缓冲液稀释。
- (2) 最后如果没有 DNA 出现，则将溶液与 2000g 离心 3min。若还无 DNA，则可能由于之前没有消化完全，可以适当增加裂解缓冲液的量。也有可能是 DNA 在某一步中已被降解。