

碱裂解法提取DNA

1.裂解

- 1.1 每 10^7 个细胞或50 mg组织样本加入1 mL 裂解液
- 1.2 剧烈涡旋30 s 后 56°C 孵育30 min

2.除RNA

- 2.1 加入RNase A至终浓度 $50\ \mu\text{g}/\text{mL}$ ， 37°C 孵育1 h

3.除蛋白

- 3.1 补加蛋白酶K至终浓度 $100\ \mu\text{g}/\text{mL}$ ， 56°C 水浴振荡孵育1 h（细胞样本）或3 h（组织样本）

4.抽提

- 4.1 加入等体积酚:氯仿:异戊醇，温和颠倒混匀15次（勿涡旋！）
- 4.2 $12000\ \text{g} \times 15\ \text{min}$ ， 4°C 离心
- 4.3 用宽口吸头缓慢移取上层水相，用等体积氯仿:异戊醇再抽提一次

5.沉淀

- 5.1 转移水相至新管，加入1/10体积3 M 醋酸钠溶液，轻柔混匀
- 5.2 加2.5倍体积预冷无水乙醇， -20°C 静置1h
- 5.3 $5000\ \text{g} \times 10\ \text{min}$ ， 4°C 离心，弃上清

6.洗涤

- 6.1 加入1 mL 预冷的75%乙醇洗涤沉淀
- 6.2 $7500\ \text{g} \times 5\ \text{min}$ ， 4°C 离心（重复洗涤一次）

7.溶解

- 7.1 开盖室温干燥沉淀5 min， $50\ \mu\text{L}$ TE缓冲液溶解DNA

常见问题解析

1. DNA得率低如何解决？

- ①样本问题：未使用新鲜样本（样本离体后需用液氮速冻并保存在 -80°C ）；细胞数量不足（血液 $<1\text{mL}$ 、培养细胞 $<10^6$ 或组织 $<20\text{ mg}$ ）；样本裂解不完全；组织块未充分研磨（粒径需 $<50\text{ }\mu\text{m}$ ），需在液氮中充分研磨；
- ②沉淀不充分：乙醇温度过高（ $>-10^{\circ}\text{C}$ ）或加入醋酸钠后未混匀。

2. A260/A280值异常原因？

- ①比值 <1.7 ：蛋白质残留，组织样本可增加蛋白酶K消化时间至过夜；
- ②比值 >2.0 ：RNA污染，确认RNase A的活性及用量。

3. 提取的基因组DNA为何无法电泳出清晰条带？

- ①过度降解：将DNA从样本中提取出来后未进行速冻处理，通常处于室温大于30 min会降解50%以上，需保存在 -20°C ；
- ②操作损伤：使用移液器吹打的次数大于3次会导致高分子量DNA发生断裂；
- ③溶解不当：没有使用TE缓冲液溶解提取的DNA，用超纯水作溶剂会导致DNA酸性水解。

参考文献

- [1] Birnboim HC, Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA [J]. *Nucleic Acids Res*, 1979, 7(6): 1513-1523.