

TRIzol法提取DNA

1.裂解

- 1.1 每 10^7 个细胞或50mg组织样本加入1 mL TRIzol
- 1.2 剧烈涡旋1min 后室温静置5 min

2.抽提

- 2.1 加入0.2倍TRIzol体积的氯仿，手动颠倒15次
- 2.2 $12000\text{ g} \times 15\text{ min}$ ， 4°C 离心

3.沉淀

- 3.1 离心后,吸取有机相至新的离心管中,加入等体积预冷无水乙醇,轻柔颠倒离心管10次,室温静置混合液3 min;
- 3.2 $2000\text{ g} \times 5\text{ min}$ ， 4°C 离心

4.洗涤

- 4.1 丢弃离心后上清，1 mL DNA洗涤液覆盖沉淀，缓慢旋转离心管5次沿管壁洗涤沉淀
- 4.2 $7500\text{ g} \times 5\text{ min}$ ， 4°C 离心（重复洗涤一次）

5.除RNA

- 5.1 加入 $200\text{ }\mu\text{L}$ 8 mM NaOH溶液重悬沉淀
- 5.2 加入 $2\text{ }\mu\text{L}$ DNase-free RNase A（10 mg/mL）， 37°C 温浴30 min

6.最终沉淀

- 6.1 加入 $20\text{ }\mu\text{L}$ 3M醋酸钠混匀
- 6.2 加入 $500\text{ }\mu\text{L}$ 预冷无水乙醇， -20°C 静置60 min
- 6.3 $5000\text{ g} \times 10\text{ min}$ ， 4°C 离心，弃上清

7.溶解

- 7.1 加入1mL预冷的75%乙醇， $7500\text{ g} \times 10\text{ min}$ ， 4°C 离心，弃上清
- 7.2 开盖室温干燥沉淀5min， $50\text{ }\mu\text{L}$ TE缓冲液溶解DNA

常见问题解析

1. DNA溶液A260/A280值<1.7怎么办？

蛋白质污染DNA，可能原因在于：（1）中层蛋白层的塌陷（常见于脂肪/脑组织），吸取有机相时吸入了蛋白，解决方案：①预离心加固层：加入氯仿后先4℃，3000 g离心5 min，再12000 g离心；②界面锁定术：可在吸取前加入100 μL缓冲液（0.1 M Tris-HCl pH 8.0 + 24%蔗糖），形成致密隔离层；③吸头改良：使用侧孔钝头吸头（孔径0.5 mm，减少吸力扰动）；（2）也可能是样品裂解时加入的TRIzol试剂的量偏少，造成蛋白变性不充分，可再次对DNA溶液进行苯酚/氯仿抽提，以除去蛋白；（3）还可能是裂解匀浆后未静置五 min，裂解不充分，直接开始了下一步实验。

2. DNA沉淀呈胶状难以溶解怎么解决？

①可加TE缓冲液后于65℃温浴60 min助溶；②多糖/蛋白复合物包裹DNA，解决方案：梯度洗涤法：第一洗：0.1 M柠檬酸钠+0.5% SDS，第二洗：0.1 M柠檬酸钠+10%乙醇，可使用酶解辅助：溶解时添加几丁质酶（植物）或透明质酸酶（动物），终浓度0.5 U/μL，也可物理破胶：液氮速冻3 s后37℃瞬融，循环3次。

3. 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℃）；细胞数量不足（血液<1 mL，培养细胞<10⁶或组织<20 mg）；样本裂解不完全；组织块未充分研磨（粒径需<50 μm），需在液氮中充分研磨；②沉淀不充分：乙醇温度过高（>-10℃）或醋酸钠未混匀。

参考文献

[1] Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction [J]. *Anal Biochem*, 1987, 162(1): 156-159.