**实验一** **CTAB法提取植物基因组DNA**

**一、实验目的**

学习从植物组织中（幼叶）提取基因组DNA的基本原理和方法。

**二、实验原理**

采用机械研磨的方法破碎植物的组织和细胞，由于植物细胞匀浆含有多种酶类（尤其是氧化酶类），其对DNA的抽提产生不利的影响，所以在抽提缓冲液中需加入抗氧化剂或强还原剂（如巯基乙醇）以降低这些酶类的活性。在液氮中研磨，材料易于破碎，并减少研磨过程中各种酶类的作用。

CTAB(hexadecyltrimethylammonium bromide,十六烷基三甲基溴化铵)，是一种阳离子去污剂，可溶解细胞膜并与核酸形成复合物。该复合物在高盐的溶液中（>0.7mol/L NaCl）是可溶的，通过有机溶剂抽提，去除蛋白、多糖、酚类等杂质后加入乙醇沉淀（CTAB能溶于乙醇）即可使核酸分离出来。CTAB溶液在低于15度时会形成沉淀洗出，因此再将其加入冰冷的植物材料中之前必须预热（65度），且离心温度不要低于15度。

**三、实验材料及仪器用具**

1. 实验材料

拟南芥幼嫩叶片

2. 实验试剂

（1）1M Tris-HCL（pH8.0）

121.1g Tris溶于800ml无菌水中，加浓HCL调pH到8.0，定容至1L，高压灭菌。

（2）0.5M EDTA（pH8.0）

186.1g EDTA-Na·2H2O溶于800ml无菌水中，需用磁力搅拌器剧烈搅动，用NaOH调pH值到8.0（约20g），定容至1L，高压灭菌。

（3）3.5M NaCL

204.75g NaCL溶于1L无菌水中，高压灭菌。

（4）10% CTAB溶液

10gCTAB溶于80ml无菌水中，定容至100mL，高压灭菌。

（5）DNA提取液（500ml）

|  |  |
| --- | --- |
| 3.5M NaCL | 200ml |
| Tris-HCL | 50ml |
| EDTA | 50ml |
| 10%CTAB | 100ml |
| Water | 100ml |

（6）氯仿-异戊醇（24:1体积比）

（7）RNAaseA

（8）异丙醇

（9）无水乙醇

（10）3M醋酸钠

（11）1×TE缓冲液

3. 实验仪器：

液氮罐、1.5ml离心管、1.5ml离心管架、恒温水浴摇床、枪及枪头（1ml和200ul）、离心机（转速可调至4000rpm和10000rpm）、剪刀

**四、实验步骤**

1、取幼嫩的植物叶片（3-5g）剪碎液氮研磨成粉，转入1.5ml离心管内。加入等体积的65℃预热的DNA提取缓冲液置于65℃的恒温水浴摇床上1-2h(1.5h)。

2、加入等体积的氯仿：异戊醇(24：1)，轻轻上下颠倒5分钟，静置5分钟，之后于12000rpm离心10分钟。

3、吸取上层水相，重复步骤2一次。

4、吸取上层水相，加入预冷2/3体积的异丙醇，轻缓颠倒2分钟并置-20℃冰箱内10min，待DNA沉淀后于12000rpm离心收集，收集的DNA于70%乙醇中洗2-3次。将弃去乙醇风干后的DNA加适量水使其溶解。

5、待DNA完全溶解后加入1-2μlRNAse A（10mg/ml），37℃保温1h以除去DNA中的RNA。

6、于Eppendorf管中加入1mL氯仿：异戊醇（24：1）轻轻上下颠倒10分钟后10000rpm离心10分钟。

7、吸取上层水相并先后加入1/10体积的3M醋酸钠及2倍总体积的预冷的无水乙醇，接着置于-20℃冰箱，10分钟后10000rpm离心10分钟，弃去无水乙醇，加入70％乙醇洗涤2-3次，风干，最后将DNA溶于适量（200-500μl） TE中。

8、待DNA完全溶解后进行1%琼脂糖凝胶电泳，检查DNA的质量并据已知的DNA 分子量标准估计其浓度。调整浓度后的DNA置于-20℃备用。

**五、注意事项**

1. 叶片磨得越细越好。

2. 移液器的使用。

3. 由于植物细胞中含有大量的DNA酶，因此，除在抽提液中加入EDTA抑制酶的活性外，第一步的操作应迅速，以免组织解冻，导致细胞裂解，释放出DNA酶，使DNA降解。