# SDS法标准化操作流程

### 1 实验目的

提取样品DNA

### 2 适用范围

本标准操作规程适用于动物和微生物的样本DNA提取，非此类样品DNA的提取流程与本标准操作规程不同，须按照其它样品DNA提取操作规程进行。

### 3 实验原理

SDS是阴离子表面活性剂，溶解膜蛋白破坏细胞膜，使蛋白变性沉淀下来。

### 4 实验仪器

高速离心机、水浴锅、振荡器、-20℃冰箱。

### 5 试剂耗材

|  |  |
| --- | --- |
| 试剂 | 用量 |
| 1% SDS裂解液 | 550μl |
| 0.5M/L EDTA | 150μl |
| Proteinase K | 50μl |
| 溶菌酶 | 30μl |
| RNase A | 2μl |
| 5M/L NaCl | 200μl |
| 氯仿/异戊醇（24:1） | 约800μl |
| 异丙醇 | 约600μl |
| 75%乙醇 | 2ml |

1%SDS裂解液配方：

配制规模：50ml

|  |  |
| --- | --- |
| 试剂名称 | 用量 |
| 1M/L Tris-Hcl | 500μl |
| 5M/L NaCl | 200μl |
| 0.5M/L EDTA | 1ml |
| 10% SDS | 5ml |

**注意：**10%SDS最后加入，避免出现大量泡沫，定容时注意泡沫，等泡沫消了后再定容

### 6 操作步骤

1. 向1.5ml EP管中加入150μl EDTA（0.5M/L，pH8.0），取液氮中研磨好的组织（50mg），加入550μl 1% SDS裂解液，混匀后加入50μl Proteinase K，30μl溶菌酶，颠倒混匀，55℃孵育2h，期间可以轻柔涡旋帮助完全裂解。
2. 加入2μl RNase A，颠倒混匀后37℃温育15min。
3. 12000rpm离心5min，吸取上清至新的1.5mlEP管中，加入200μl蛋白沉淀液（5M NaCl），轻柔涡旋10sec，-20℃放置5min，12000rpm离心10min。
4. 吸取上清至新的1.5mlEP管中，12000rpm离心5min，管底可能还有微量蛋白沉淀。
5. 吸取上清至新的2.0mlEP管中，加入等体积（约800μl）氯仿：异戊醇（24:1），12000rpm离心10min。
6. 吸取上清至新的1.5mlEP管中，加入3/4体积（600μl）的异丙醇，混匀-20℃放置20min后，12000rpm离心10min。
7. 倒出液体，注意不要倒出沉淀。用1ml 75％乙醇洗涤两次，剩余的少量液体可再次离心收集，然后用枪头吸出。
8. 超净工作台吹干或者室温晾干**（DNA样品不要过于干燥，否则很难溶解）**
9. 加入50-100μlTE溶解DNA样品，振荡器助溶。

注意事项：

Tris水饱和酚容易被空气氧化而变成粉红色的，这样的酚容易降解DNA，一般不可以使用。平时保存在4℃冰箱中，使用时，打开盖子吸取后迅速加盖，这样可使酚不变质，可用数月。