# 月桂酸钠法提取标准化操作流程

### 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多糖多酚含量较高的植物或真菌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试剂

|  |  |
| --- | --- |
| 试剂 | 用量 |
| 月桂酸钠缓冲液 | 750μl |
| 饱和酚：氯仿：异戊醇（25:24:1） | 750μl |
| 氯仿 | 900μl |
| 异丙醇 | 约1.6ml |
| TE | 约1.1ml |
| 75%乙醇 | 4ml |
| NaAc(3M/L) | 70μl |
| RNase(0.1mg/mL) | 5μL |

月桂酸钠缓冲液配方

配置规模50ml

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 试剂 | 终浓度 | 用量 |
| 月桂酸钠 | 1% | 0.5g |
| NaCl | 100mmol/L | 0.29g |
| Tris-Hcl (1M/L) | 100mmol/L | 5ml |
| EDTA (0.5M/L) | 20mmol/L | 2ml |
| ddH2O |  | 40ml |
| HCl |  | pH调至8.0 |

### 4 操作步骤

1）将750μl月桂酸钠缓冲液加入灭过菌的2mL离心管中，再将研磨过的粉末样品约50mg加入裂解液中，反复缓慢的摇匀；

2）加入等体积（750μl）酚：氯仿：异戊醇（25:24:1），反复缓慢的摇匀；

3）12000 rpm，4℃离心20min后取出，小心吸取上清液约1.2mL于2mL离心管中；

4）向上述离心管中加入3/4体积（约900μl）的异丙醇，上下缓慢颠倒数次，有白色絮状沉淀析出，颠倒时注意往一个方向，防止沉淀散开，不利于后续实验；

5）将白色絮状沉淀用枪头从离心管中轻轻挑出，至于2mL EP管中；

6）向上述2mL EP管中加入1mL 75%乙醇洗涤两次

7）风干，使残存的75%乙醇全部挥发干净，这个过程中要经常拿出观察，防止过度干燥，不利于后面溶解；

8），向2mLEP管中加入900μlLTE缓冲液（pH8.0），放置于65℃恒温箱中，期间轻微弹匀，使DNA充分溶解；

9） DNA完全溶解后，加入5μL RNase(0.1mg/mL)， 37℃放置30min，消化RNA。

10）待RNA消化完成后，向EP管中加入等体积（0.9mL）氯仿，轻轻摇匀；

11）4℃，12000 rpm高速离心15min

12） 吸取700μl上清置于1.5ml新EP管中，加入1/10体积(约70μl)NaAc(3M/L)溶液，轻轻摇匀

13）向上述EP管中加入等体积（700μl）异丙醇，轻轻摇匀后，于-20℃静置20min；

14）4℃，12000 rpm高速离心15min，弃上清

15）将得到的白色沉淀以75%乙醇洗涤两次，去除残留的乙醇

16）风干，使残存的75%乙醇全部挥发干净，该过程中要经常拿出观察，防止过度干燥，不利于后面溶解

17）加入200μL TE（pH8.0）溶解。