# STE方法提取

### 1实验目的

提取样品DNA

### 2适用范围

此方法适用于细菌和水体微生物的提取。（如果样品用滤膜吸附，可剪碎滤膜后直接操作）

### 3实验原理

溶菌酶是一种能水解致病菌中黏多糖的碱性酶,主要通过破坏[细胞壁](http://baike.baidu.com/view/42836.htm" \t "_blank)，导致细胞壁破裂内容物逸出而使细菌溶解。SDS是一种已知的能够使[蛋白质变性](http://baike.baidu.com/view/81898.htm" \t "_blank)的去污剂, 在核酸抽提操作中破坏细胞壁及裂解核酸：蛋白复合物。在较高温度下，破坏蛋白质与DNA的结合，使DNA释放出来。

### 4实验仪器

高速离心机、水浴锅、振荡器、-20℃冰箱。

### 5试剂

|  |  |
| --- | --- |
| 试剂耗材 | 用量 |
| STE缓冲液 | 600μl |
| 10% SDS | 100μl |
| 蛋白酶K | 10μl |
| 溶菌酶 | 60μl |
| 饱和酚 | 750μl |
| 氯仿：异戊醇（24:1） | 700μl |
| RNase A | 2μl |
| 异丙醇 | 450μl |
| 75%乙醇 | 2ml |

STE缓冲液配方

配置规模：50ml

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 试剂 | 终浓度 | 用量 |
| NaCl | 5M/L | 1ml |
| Tris-Hcl | 1M/L | 500μl |
| EDTA | 0.5M/L | 100μl |

### 6操作步骤

1. 取2mlEP管，将菌液离心沉淀两次，沉淀后的量大约10mg左右，（沉淀量少的话可再次离心沉淀）弃上清后加入600μl STE混匀。
2. 加入60μl溶菌酶，37℃水浴30分钟，期间要颠倒混匀。
3. 加入100μl 10%SDS和10μl蛋白酶K，混匀后65℃水浴20-30分钟。期间要颠倒混匀。
4. 12000转离心10分钟，取上清。加入等体积酚（约750μl）混匀。
5. 12000转离心10分钟，取上清，加入等体积氯仿异戊醇（24:1）（约700μl）。
6. 12000转离心10分钟，取上清。

**注：**如果蛋白沉淀较多可再加入等体积氯仿异戊醇（24:1）。12000转离心10分钟离心后取上清，（如果离心后蛋白层不明显，可忽略此步）

1. 加入3/4体积异丙醇（约450μl），-20℃沉淀30分钟。
2. 12000转离心10分钟，弃上清，用75%乙醇清洗沉淀两次。

放置干燥后加入50μl-100μl超纯水和2μlRNA酶，溶解后37℃ 15分钟消化RNA，放置-20度保存。