

A person wearing a blue surgical gown, a white face mask, and a blue hairnet is working in a laboratory. The person is looking down at something on a table. The background is a blurred laboratory setting with various pieces of equipment.

动物肝脏中DNA的提取和定量测定



一. 实验目的

- 1、掌握浓盐法从动物组织中提取DNA的原理与技术
- 2、掌握二苯胺法测定DNA含量的原理和方法



二. 实验原理

核酸和蛋白质在生物体中常以核蛋白（DNP/RNP）的形式存在，其中DNP能溶于水及高浓度盐溶液，但在0.14M的盐溶液中溶解度很低，而RNP则可溶于低盐溶液，因此可利用不同浓度的NaCl溶液将其从样品中分别抽提出来。

将抽提得到的DNP用SDS处理可将其分离成DNA和蛋白质，用氯仿-异戊醇将蛋白质沉淀除去可得DNA上清，加入冷乙醇即可将其呈纤维状析出。

DNA遇二苯胺（沸水浴）会生成蓝色物质，因此可用二苯胺鉴定DNA并通过分光光度计测定光吸收值对DNA含量进行定量测定。



三.实验耗材

1. 猪肝
2. 0.1mol/L NaCl-0.05mol/L 柠檬酸钠溶液 (pH6.8)
3. 95%乙醇 (A.R.)
4. NaCl固体 (A.R.)
5. 5%SDS溶液 (5g SDS 定容至100ml)
6. V(氯仿): V(异戊醇) 20: 1的混合液
7. DNA标准溶液 (取DNA钠盐用5mmol/L的NaOH配成200ug/L的溶液)
8. 二苯胺溶剂 (纯二苯胺1g溶于100ml冰醋酸 (A.R.) 再加入10ml过氯酸 (A.R.浓度>60%) 混匀待用。临用前加入1ml 1.6%乙醇溶液)
3. DNA样液 (将实验1提取的DNA粗品用蒸馏水溶解, 定容至25ml, 控制其DNA含量在100ug/ml左右)

四.实验器材

匀浆器 量筒 离心机 离心管 试管 吸管 恒温水浴锅坐标纸 试管 吸管 722型分光光度计



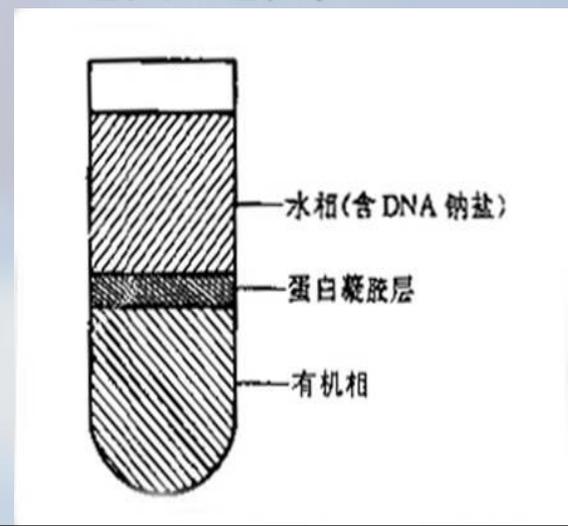
五. 实验操作

1、称猪肝4g，用匀浆器磨碎（冰浴），加入8ml 0.1mol/L NaCl-0.05mol/L柠檬酸钠缓冲液研磨三次，然后倒出匀浆物，匀浆物在4000r/min下离心10min沉淀中再加入12.5ml缓冲液，于4000r/min离心20min；弃上清，取沉淀。



2. 在沉淀中加入20ml柠檬酸钠缓冲液、10.5ml 氯仿-异戊醇混合液、2ml SDS，振荡30min，然后缓慢加入固体NaCl（约1.8g），使其最终浓度为1mol/L。将其在3500r/min离心20min，取上清水相。

3. 在上述水相溶液中加入等体积冷乙醇，边加边用玻棒慢慢搅动，将缠绕在玻棒上的凝胶状物用滤纸吸去多余的乙醇，即得DNA粗品。用蒸馏水溶解并定容至25ml。





4. 标准曲线的绘制

按表1加入各种试剂，混匀，于60° C恒温水浴45min，冷却后，在595nm波长下于分光光度计比色测定，以吸光度对DNA浓度作图，制作标准曲线。

	0	1	2	3	4	5
标准DNA溶液/ml	0.0	0.4	0.8	1.2	1.6	2.0
蒸馏水/ml	2.0	1.6	1.2	0.8	0.4	0
二苯胺试剂/ml	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0
A _{595nm}						



5.样品的测定

取DNA样液1.0ml，加入蒸馏水1.0ml，混匀。然后准确加入二苯胺试剂4.0ml，混匀，于60°C恒温水浴45min，冷却后，595nm波长下于分光光度计比色测定，根据所测的吸光度对照标准曲线求得DNA的质量（ug）。

6.计算100g猪肝中DNA含量

$$w = m_1 / m_2 \times 100\%$$

w : DNA的质量分数（%）

m₁: 样液中测得的DNA的质量（ug）

m₂: 样液中所含样品的质量（ug）



思考题

实验中的乙醇、SDS、氯仿-异戊醇、NaCl、柠檬酸分别有什么作用？