

DNA的粗提取、纯化与鉴定

一. 实验方法、原理:

1. DNA粗提取方法:

DNA的溶解性: 利用在0.14mol/L的NaCl溶液中, DNA溶解度最低, 而蛋白质等其他成分的溶解度高, 使DNA与其它成分分离, 形成沉淀 (DNA) 析出, 过滤, 得到粗提取的DNA。

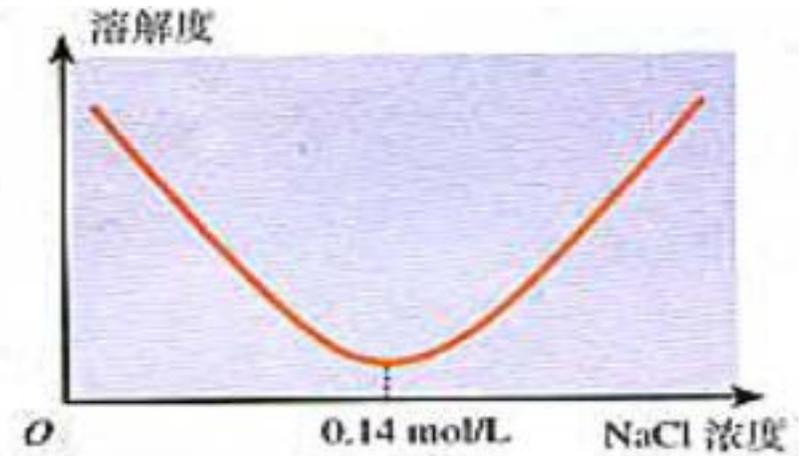


图 5-1 DNA 在 NaCl 溶液中的溶解度曲线

2. DNA纯化方法：

- ① DNA不溶于冷却的体积分数95%的酒精溶液，其他物质可溶于酒精，可进一步提取含杂质少的DNA。
- ②酶解法：蛋白酶不能水解DNA，能水解蛋白质（常用木瓜蛋白酶）。
- ③变性法（高温法）：蛋白质一般不能忍受60~80°C的高温，而DNA在80°C以上才变性（将温度严格控制在60~80°C）。

3. DNA鉴定：

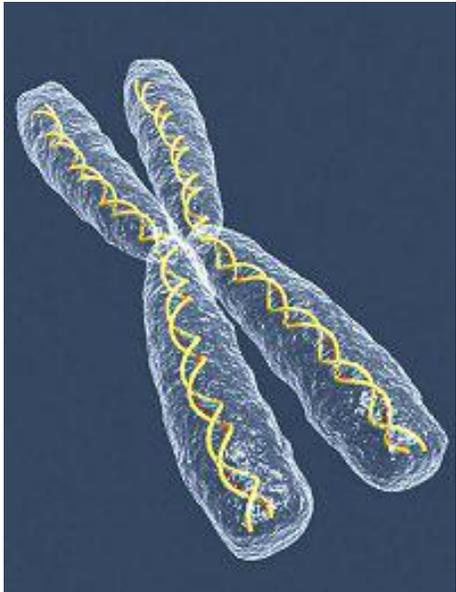
在沸水浴条件下，DNA遇二苯胺试剂被染成蓝色。

二. 材料选择:

原则: 选用DNA含量相对较高的组织, 如植物材料: 菜花、香蕉、猕猴桃、洋葱、豌豆、菠菜; 动物材料: 鸡血等

思考: 能否选用牛、羊、猪等哺乳动物血做实验材料? 为什么?

答: 不能。因为哺乳动物成熟的红细胞中无细胞核, DNA含量少



染色体成分 { 蛋白质
DNA

三. 实验过程:

案例一: 以鸡血为实验材料进行DNA的粗提取

1. 鸡血细胞做实验材料的原因?

①鸡血细胞核的DNA含量丰富, 材料易得

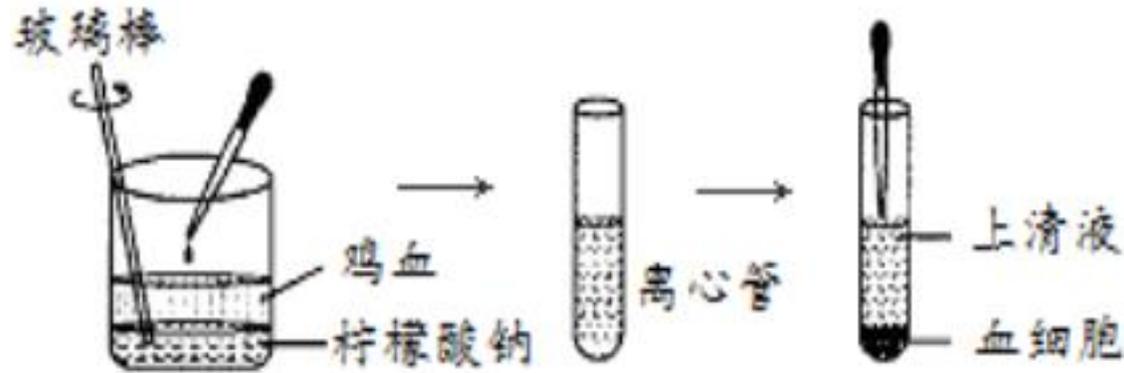
②鸡血细胞极易吸水胀破, 而用动物肝脏细胞作实验材料常常需要匀浆和离心, 对设备要求较高, 操作繁琐, 历时较长

2. 实验材料和用具:

鸡血细胞液 (5~10ml) ; 体积分数为95%的冷酒精溶液 (实验前置于冰箱内冷却24h) ; 蒸馏水; 质量浓度为0.1 g/ml的柠檬酸钠溶液; 质量的浓度分别为2mol/L和0.015mol/L的氯化钠溶液; 二苯胺试剂。铁架台; 铁环; 镊子; 三角架; 酒精灯; 石棉网; 载玻片; 玻璃棒; 滤纸; 滴管; 量筒 (100ml, 一个) ; 烧杯; (100ml, 一个, 50ml、500ml各二个) ; 试管 (20ml, 二个) ; 漏斗; 试管夹; 纱布。

3. 方法步骤

(1) 制备鸡血细胞液



取质量浓度为**0.1 g/mL的柠檬酸钠**溶液100 mL，置于500 mL烧杯中，注入**新鲜的鸡血**（约180 mL），同时用玻璃棒**搅拌**，使血液与柠檬酸钠溶液充分混合，**以免血液凝固**。将烧杯中的血液置于**冰箱内，静置1 d，使血细胞自行沉淀**。也可以将血液倒入离心管内进行**离心**，使血细胞沉淀更完全。用2 000 r/min的转速，离心2 min，使血细胞沉淀于离心管底部。**用吸管除去上清液，就可以得到鸡血细胞液。**

思考:

①. 柠檬酸钠作用及作用机理

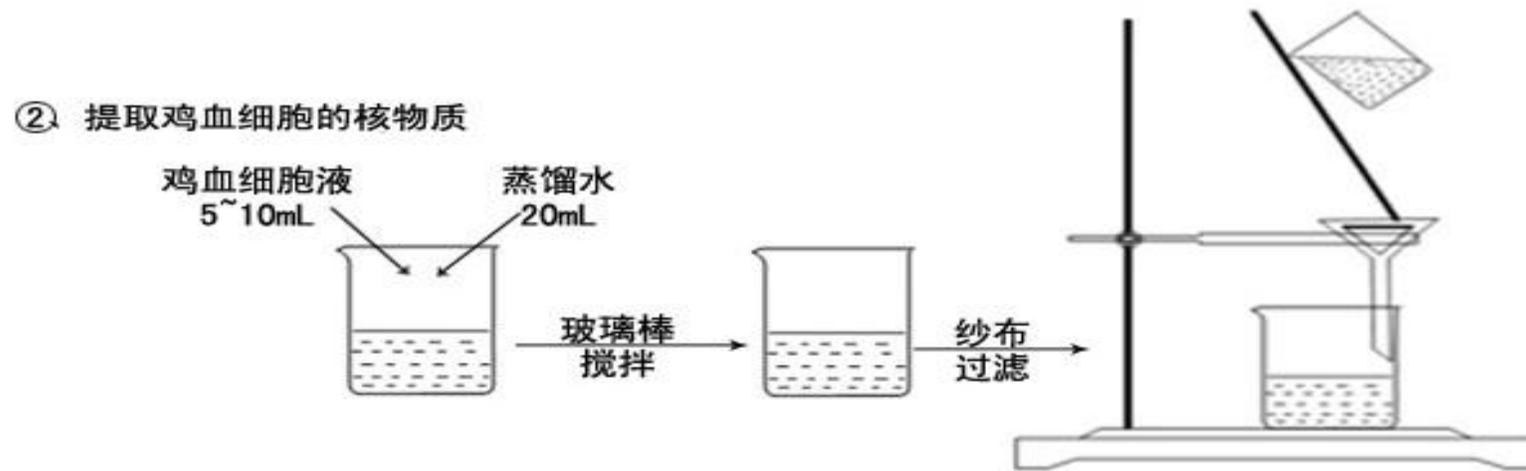
防止血液凝固，柠檬酸钠能与血浆中的 Ca^{2+} 发生反应，生成柠檬酸钙络合物，血浆中游离的 Ca^{2+} 大大减少，血液就不会凝固

②. 提取鸡血中的DNA时，为什么除去血液中的上清液？

答：血液分为两部分，一部分是血浆，一部分是血细胞，离心后除去的上清液是血浆

(2) 粗提取DNA

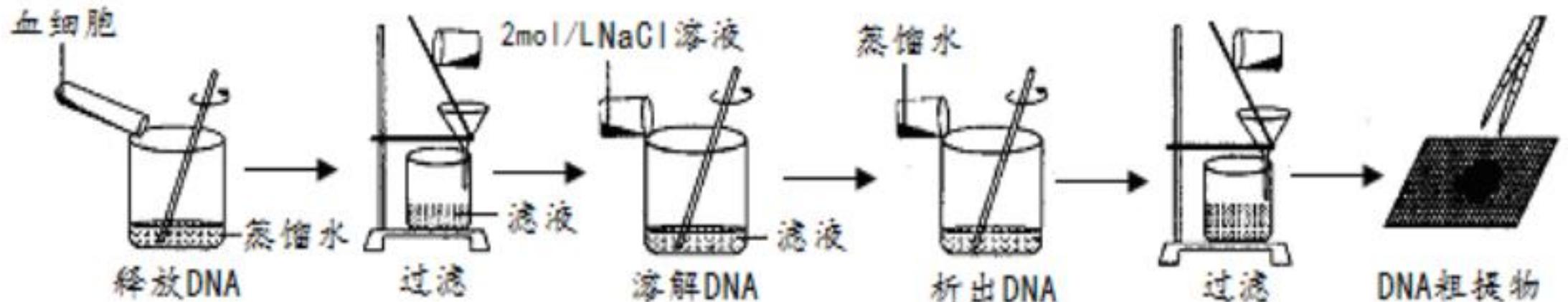
①**破碎细胞，释放核物质**：向鸡血细胞液中加入蒸馏水，血细胞膜和核膜吸水胀破，DNA从细胞核中释放出来。用玻璃棒搅拌可以加速细胞的破裂。注意应**沿一个方向快速搅拌，但不能太快太猛**，防止打碎DNA。一般5~10 mL的鸡血细胞液加入20 mL蒸馏水搅拌5 min，用3~4层纱布进行过滤，除去一些颗粒较大的杂质（如**细胞膜和核膜等细胞碎块**）。**保留滤液（含蛋白质等杂质的DNA）**。

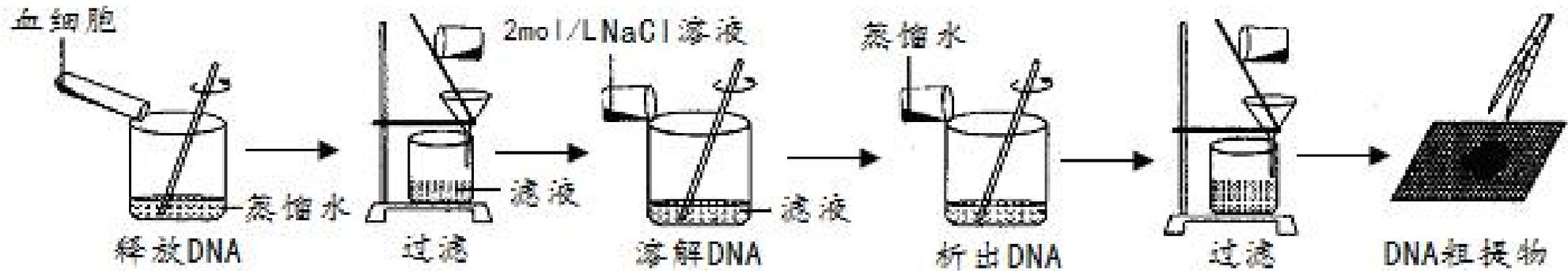


注意：DNA易吸附在玻璃容器上，所以实验中最好使用**塑料**的烧杯和试管，以减少DNA的损失。

②**溶解**细胞核内的DNA：一般向滤液中加入两倍体积的浓度为2 mol/L的NaCl溶液，搅拌1 min。注意应沿一个方向搅拌，使DNA充分溶解在NaCl溶液中。

③**析出**DNA：向溶解DNA的NaCl溶液缓缓加**蒸馏水**，降低NaCl溶液浓度，使DNA析出，玻璃棒轻轻地**沿一个方向均匀搅拌**，直至溶液中黏稠物不再增加（这时溶液中氯化钠的物质的量浓度相当于0.14 mol / L）。用3~4层**纱布**对DNA稀释液进行**过滤**，保留纱布上的粘稠物，即DNA的黏稠物。若采用**离心法**，效果更好，用4 000 r/min转速的离心机，离心15 min，除去上清液（含有蛋白质），留下的**沉淀物**中含有DNA。这一步骤是实验成败的关键。





思考:

(1) 上图两次过滤操作，分别保留的是什么？（“滤液”、“纱布上的粘稠物”）

答：滤液；纱布上的粘稠物

(2) 两次加蒸馏水的作用是什么？

答：第一次使细胞吸水涨破，释放核物质；第二次降低NaCl溶液浓度，使DNA析出

(3) 在使用玻璃棒时，有什么操作要求？

答：同向、缓慢、充分

(3) 纯化DNA

①将DNA的粘稠物再溶解：用2 mol/L的NaCl溶液20 mL溶解DNA黏稠物，沿一个方向不停搅拌3 min，使DNA充分溶解，以免损失。用3~4层纱布进行过滤（或离心），滤去杂质，收集含有DNA的滤液。

（注：利用DNA溶解度不同，DNA反复溶解析出可以除去溶于和不溶于NaCl的杂质）

②提取含杂质较少的DNA：在上述滤过的溶液中，加入冷却的、酒精的体积分数为95%的溶液50mL（使用冷却的酒精，对DNA的凝集效果较佳），静置2~3min，溶液中会出现白色丝状物（粗提取的DNA）。用玻璃棒沿一个方向搅拌，卷起丝状物，用滤纸吸干水分。

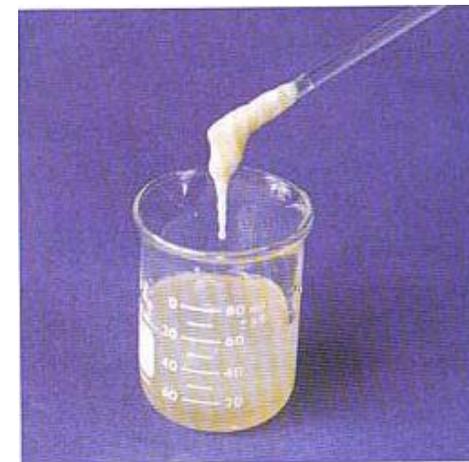
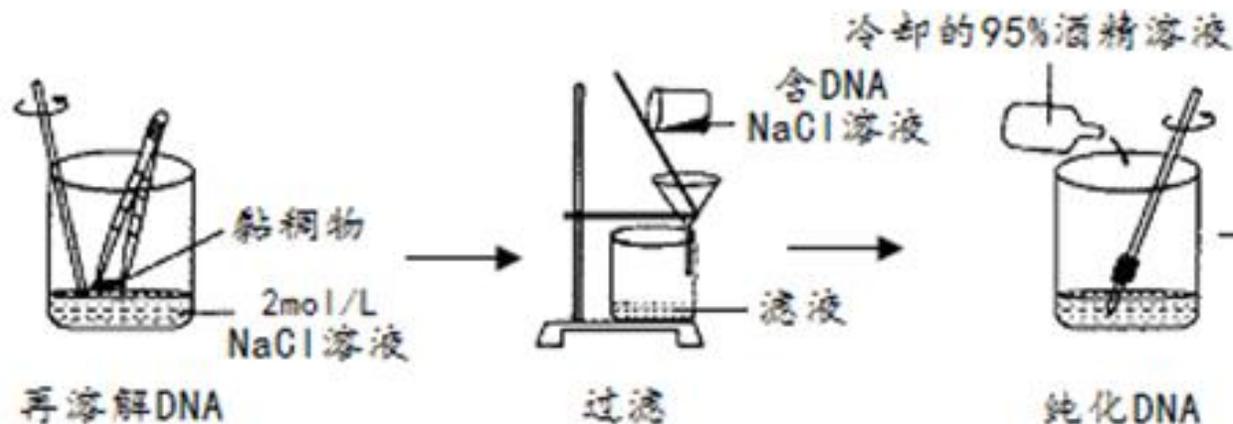


图5-4 用冷却的酒精析出DNA

方案二 直接在滤液中加入嫩肉粉（图 5-3），反应 10~15 min，嫩肉粉中的木瓜蛋白酶能够分解蛋白质。

方案三 将滤液放在 60~75 ℃ 的恒温水浴箱中保温 10~15 min，注意严格控制温度范围。

讨论：方案二与方案三的原理有什么不同？

答：方案二是利用蛋白酶分解杂质蛋白，从而使提取的DNA与蛋白质分开；方案三利用的是DNA和蛋白质对高温耐受性的不同，从而使蛋白质变性，与DNA分离。

思考：

(1) 是将黏稠物直接加入冷酒精中吗？

答：需要将黏稠物再溶解收集滤液后加入冷却的、酒精的体积分数为 95% 的溶液 50mL

(1) 为什么要加50mL的冷酒精？

答：因为DNA不溶于冷酒精，而其他物质可以溶解在酒精中，可以纯化析出DNA。

(2) 观察丝状物呈什么颜色？

答：白色

(4) 鉴定DNA

取两支20 mL的试管，各加入氯化钠的物质的量浓度为0.015 mol/L的溶液5 mL，将丝状物放入其中一支试管中，用**玻璃棒搅拌**，使丝状物溶解。然后，向两支试管中各加入4mL的二苯胺试剂。混合均匀后，将试管置于沸水中加热 5 min，待试管冷却后，观察并且比较两支试管中溶液颜色的变化



【注意】二苯胺**现配现用**效果好，二苯胺鉴定DNA需要**沸水浴**才能呈现**蓝色**（溶液呈浅蓝色）。鉴定时溶液蓝色的深浅，**与溶液中DNA含量的多少有关**。

思考：

(1) 鉴定DNA时，直接将丝状DNA放入二苯胺试剂中吗？

答：需要溶解后再加入二苯胺试剂

(2) 比较两个试管中溶液的颜色有什么不同？

答：有丝状物的试管变成蓝色，另一试管还是原来颜色

(3) 这一鉴定结果说明什么问题？

答：提取出的丝状物是DNA

案例二：以菜花为实验材料进行DNA的粗提取

1. 取材：称取30 g菜花，去梗取花，切碎。

2. 粗提取DNA

研磨释放、溶解DNA：将碎菜花放入研钵中，倒入10 mL研磨液（洗涤剂与食盐），轻轻缓慢充分研磨10 min。

过滤：在漏斗中垫上尼龙纱布，将菜花研磨液过滤到烧杯中（也可将滤液倒入塑料离心管中进行离心，用1000 r/min转速，离心2~5 min，取上清液放入烧杯中）。在4 °C冰箱中放置几分钟后，再取上清液。

3. 纯化DNA：将一倍体积的上清液倒入两倍体积的体积分数为95%的冷却的乙醇溶液中，并用玻璃棒缓缓、轻轻地搅拌溶液（玻璃棒不要直插到烧杯底部）。3~5 min后，可见白色的DNA絮状物出现。用玻璃棒缓缓旋转，将絮状物缠绕在玻璃棒上。

4. 鉴定DNA

思考：

(1) 研磨过程中加入洗涤剂的作用和食盐的作用分别是？

答：洗涤剂是一些离子去污剂，能溶解细胞膜，有利于DNA的释放；食盐的主要成分是NaCl，有利于DNA的溶解。

(2) 研磨时，为什么加食盐比加NaCl溶液的效果好？

答：食盐的主要成分是NaCl，有利于DNA的溶解。食盐还有利于充分研磨。

(2) 研磨时，能否快速剧烈研磨？

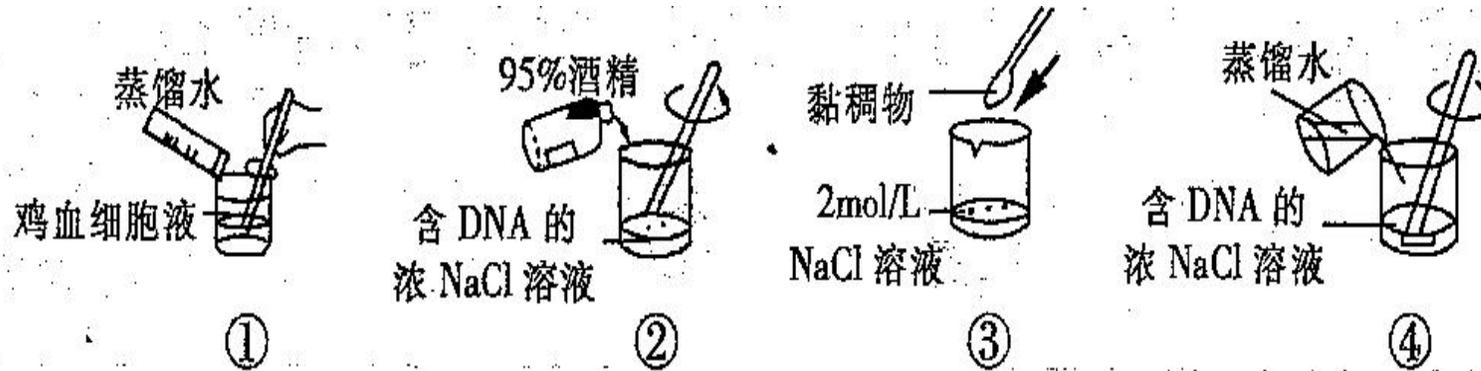
答：不能，否则容易产生大量的泡沫，不利于后续步骤地操作

课堂练习

【例1】某同学用洋葱进行DNA粗提取和鉴定实验，操作错误的是 **A**

- A. 加入洗涤剂后用力进行快速、充分的研磨
- B. 用蛋白酶纯化过滤后的研磨液中的DNA
- C. 加入酒精后用玻璃棒轻缓搅拌
- D. 加二苯胺试剂摇匀后沸水浴加热

【例2】下图为“DNA粗提取和鉴定”实验的相关操作。这些操作目的正确的是 **C**



- A. ①是洗涤红细胞，去除血细胞表面的杂质
- B. ②是溶解DNA，去除不溶于酒精的杂质
- C. ③溶解DNA，去除不溶于2mol/L NaCl溶液的杂质
- D. ④稀释NaCl溶液，去除不溶于低浓度NaCl溶液的杂质

【例3】 下列关于“DNA的粗提取和鉴定”实验的叙述中，正确的是 **B**

- A. 用鸡血作为材料，原因是鸡血红细胞有细胞核，其他动物红细胞没有细胞核
- B. 用不同浓度的NaCl溶液进行DNA粗提取，原因是DNA在其中溶解度不同
- C. 用酒精进行提纯，原因是DNA溶于酒精，蛋白质不溶于酒精
- D. 制取的DNA粗制品显示出红色颜色深，说明DNA纯度高