

小牛胸腺 DNA 的制备

一、实验目的

1. 了解 DNA 的存在状态，增加感性认识。
2. 掌握 DNA 的制备方法以及细胞分级，细胞核制备，细胞膜裂解和解离 DNA-蛋白质复合物（DNP）的技术。
3. 学习用紫外分光光度计测定 DNA 含量的方法。

二、实验原理

核酸是重要的生物大分子。在细胞核内，核酸通常是与某些组织蛋白质结合成复合物，即以脱氧核糖核蛋白（DNP）和核糖核蛋白（RNP）的形式存在。因此，在提取和制备 DNA 时，首先必须设法将这两类核蛋白分开。

在不同浓度的盐溶液中，RNP 与 DNP 的溶解度有很大的差别。在低浓度的 NaCl 溶液中，DNP 的溶解度随着 NaCl 浓度的增加而逐渐下降，当 NaCl 浓度为 0.14mol/L 时，DNP 的溶解度仅为其在纯水中溶解度的 1%，而当 NaCl 浓度继续增加时，DNP 的溶解度又渐次增大，当 NaCl 浓度增至 0.5 mol/L 时，DNP 的溶解度约与其在纯水中的溶解度近似，当 NaCl 浓度继续增加至 1.0 mol/L 时，DNP 的溶解度约为其在纯水中的溶解度的两倍，且随着盐浓度的上升，其溶解度仍继续呈增大的趋势。但 RNP 则与之不同，在 0.14 mol/L 的盐溶液中，DNP 溶解度很低，而 RNP 的溶解度仍相当大，因此，通常采用 0.14 mol/L 的盐溶液来除去 RNP，使 DNP 仍保持在沉淀中，然后使用浓盐溶液（1.7 mol/L 浓度以上的 NaCl）来提取 DNP。

提取出 DNA-蛋白质复合物（DNP）后，还必须将其中的蛋白质除去，因此，提取纯化 DNA 要经过以下四个步骤：

1. 制备细胞核；
2. 裂解细胞核；
3. 解离 DNA—蛋白质复合物；
4. 从可溶性物质中分离出 DNA。

小牛胸腺、猪脾、鱼精子和植物种子的胚胎等生物材料，细胞核含量比例大，因而含有丰富的 DNA，是提取 DNA 的好材料。本实验以小牛胸腺或猪脾为材料。小牛胸腺不仅 DNA 含量最高，而且其脱氧核糖核酸酶（DNase）的活性较低，在制备过程中由此酶所引起的 DNA 降解损失也较小。为了防止 DNase 的作用，在用于提取的缓冲液中均含有 1mmol/L 的 EDTA（乙二胺四乙酸）螯合剂，以除去保持 DNase 活性所必需的 Mg^{++} 离子。为防止 DNA 的变性和降解，操作要尽可能在低温下进行。

本实验通过匀浆、离心得到细胞核组分，然后用 SDS（十二烷基硫酸钠，sodium dodecyl sulfate）裂解核膜，释放出 DNA-蛋白质复合物，再加入高浓度 NaCl，以增加 DNP 的溶解度，然后加入氯仿—异戊醇混合液，振荡、乳化，使蛋白质变性，DNP 复合物解离，离心后，DNA 溶于上层水相，蛋白质沉淀夹在水相和有机相之间得以除去，最后用有机溶剂沉淀出 DNA。

提取纯化后的小牛胸腺 DNA 用紫外分光光度法进行鉴定分析，并计算其收率和纯度。

本实验所得的 DNA 样品将用于实验五的 T_m 测定。

三、器材与试剂

器材：

1. 高速冷冻离心机，50ml 塑料离心管，300ml 塑料离心管
2. 食品加工机和高速分散器
3. 恒温水浴
4. 磁力搅拌器
5. 量筒：50ml、250ml、500ml
6. 烧杯：100ml、500ml、1000ml
7. 具塞三角瓶：250ml
8. 小培养皿
9. 吹风机
10. 可扫描的紫外分光光度计

试剂:

a.0.01M 柠檬酸钠—9mg/ml NaCl—1mmol/L EDTA , pH 7.0, 300ml

b.0.15M 柠檬酸钠—1mmol/L EDTA, pH 7.0 , 300ml

c.20% SDS (公用)

d.氯仿—异戊醇(24:1)混合液 500ml

e.95% 乙醇和无水乙醇

f.丙酮

g.0.1mol/L NaOH

四、实验步骤

1.制备细胞核

- (1) 取小牛胸腺(或猪脾)在冰块上去除脂肪和结缔组织,切碎,称 10g,放入食品加工机,加入予冷的试剂 a. 溶液 60ml,打碎三次,每次 20 秒,打 20 秒。将打碎后溶液倒入小烧杯,用高速分散器匀浆三次,每次 20 秒,打 20 秒。
- (2) 将匀浆后溶液分装于两个 50ml 离心管,仔细平衡后,用高速冷冻离心机,4℃,10000r/min,离心 10min,弃去上清(脂肪层等)留沉淀。
- (3) 将沉淀置于小烧杯,加 50ml 予冷 a 液,用高速分散器同样再匀浆分散三次,同样 4℃,10000r/min,离心 10min,弃去上清留沉淀。
- (4) 取出沉淀加 60ml 予冷 b 液,再高速分散二至三次,每次分散 10 秒,打 10 秒。

2.裂解细胞核

将悬浮液移入 250ml 烧杯中,在磁力搅拌器上边搅拌边滴入 8ml 20% SDS,应观察到溶液明显变粘稠(报告中回答:为什么?)。用 55℃水浴温热 10min~15min,然后在搅拌下缓慢加入 8~10g NaCl,再搅拌 10min,使 NaCl 全溶,此时应观察到溶液变稀(为什么?)。冷却至室温。

3.解离 DNA—蛋白质复合体

- (1) 将溶液倒入 250ml 具塞三角瓶中,加入此溶液二分之一体积的 d 液(氯仿用于变性蛋白质,异戊醇用于消除泡沫,也可用异丙醇、异丁醇),剧烈振荡 10min,倒入 300ml 离心管中,4℃,10000r/min,离心 5~10min,用滴管取出上层水相,中层蛋白质界面弃去,下层有机相倒入回收并。
- (2) 取出的上层水相重复加 d 液、振荡、离心,至中层界面无混浊为止。

4.提取 DNA

- (1) 将取出的水相滴入予冷的 95%乙醇中,边滴加边用玻璃棒搅拌起白色纤维状 DNA 沉淀。搅拌速度对产率有影响,若产出减少可补加或换新乙醇。(观察并解释实验现象)(回收乙醇)。
- (2) 搅起的 DNA 置于已称重的小培养皿内,依次用 95%乙醇和无水乙醇清洗纤维状 DNA 沉淀至无浑浊为止,最后再用丙酮清洗一次,用吹风机将 DNA 吹干。
- (3) 称重,并计算产率。

5.测定 DNA

- (1) 准确称取 50~100mg DNA,加少量 0.1mol/L NaOH 溶解,加 H₂O 定容至 50ml。
- (2) 用可扫描的紫外分光光度计测定制备的 DNA 的紫外吸收曲线,测定 A₂₆₀ 和 A₂₈₀,并计算比值: A₂₆₀/A₂₈₀,纯 DNA 的此比值约为 1.8。
- (3) 根据:每毫升 1 微克的纯 DNA 的 A₂₆₀ 值=0.020,计算所得 DNA 的纯度,并讨论纯度较低的原因和解决办法。