

**上海生物样本库**  
**最佳实践规范及标准操作流程**  
**文件汇编**  
**（第二版）**

2010 年 5 月

| 上海生物样本库  |               |      |  |      |               |
|----------|---------------|------|--|------|---------------|
| 质量管理体系文件 |               |      |  |      |               |
| 文件名称     | 细胞 DNA 提取操作规程 |      |  | 编号   | SOP-SC-053-01 |
| 批准人      |               | 批准日期 |  | 实施日期 |               |

## 细胞 DNA 提取操作规程

### 1. 目的

规定从细胞中提取 DNA 实验应遵守的操作。

### 2. 适用范围

使用与从细胞中提取 DNA 的操作。

### 3. 定义和术语

#### 3.1 DNA Deoxyribonucleic Acid

即脱氧核糖核苷酸, 是遗传信息储存及传递者。

### 4. 职责

4.1 样本库实验技术员负责从细胞中提取DNA。

### 5. 设备和器材

见正文内容

### 6. 正文

#### 6.1 试剂准备

6.1.1 所需试剂:

氯仿、EDTA、无水乙醇、70%乙醇、苯酚、1xPBS、蛋白酶 K、TE 缓冲液。

6.1.2 Tris-EDTA

1M Tris, pH 8.0, 20ml

0.5M EDTA, 20ml

无菌水

6.1.3 蛋白酶 K (20mg/ml)

将 200mg 蛋白酶 K 加入到 10ml TE 缓冲液, 室温下放置 20 分钟。分装后-20

℃贮存。

## 6.2 新鲜血样中收集血细胞

6.2.1 将细胞转移至离心管中，在 4℃ 下 1500g 离心 10 分钟以收集细胞。

6.2.2 吸去上清，用 1 倍体积冰冷 TBS 重悬细胞并再度离心。吸去上清，小心地再次于冰冷 TBS 中重悬细胞，离心收集细胞。

6.2.3 吸去上清，小心用 TE (pH8.0) 重悬细胞至  $5 \times 10^7$  个/ml，转移上清至三角锥形瓶。

6.2.4 每毫升细胞悬液加 10ml 裂解缓冲液，于 37℃ 下温育 1 小时，立即进行 DNA 提取。

## 6.3 DNA 提取（酚-氯仿法）

6.3.1 将裂解液移至一个或多个适合离心机的离心管中，裂解液不能超过 1/3 体积。

6.3.2 加入蛋白酶（20mg/ml）至终浓度 100ug/ml。用玻棒温和将酶混入裂解液中。

6.3.3 将裂解液置于 50℃ 水浴中 3 小时，不时旋转溶液。

6.3.4 将溶液冷却至室温，加入等体积的 0.1M Tris.Cl (pH8.0) 平衡过的苯酚。将离心管缓慢颠转 10 分钟温和地混合两相。将离心管置于旋转器上 1 小时。

6.3.5 室温下 5000g 离心 15 分钟分离两相。

6.3.6 将黏滞的水相（上层）转移至另一离心管。

6.3.7 用苯酚在抽提两次，收集水相。

## 6.4 DNA 分离

6.4.1 第三次苯酚抽提后，将水相转移至另一离心管中。加入 0.2 倍体积 10M 醋酸氨及 2 倍体积乙醇，旋转离心管直至溶液彻底混匀。

6.4.2 DNA 随即形成沉淀，在室温 5000g 离心 5 分钟收集沉淀。

6.4.3 用 70%乙醇洗涤 DNA 沉淀 2 次，在室温 5000g 离心 5 分钟收集沉淀。

6.4.4 尽可能使用真空泵吸去残余的乙醇。于室温将 DNA 沉淀置于敞开的管内，直至可见的痕量乙醇挥发殆尽。

6.4.5 加入 TE 缓冲液，将其置于摇床上，于 4℃ 温和振摇 12-24 小时直至

DNA 完全溶解。

6.4.6 将 DNA 溶液储存于 4℃。

## 7. 相关文件

《核酸提取和纯化控制程序》 SOP-SC-030-01

## 8. 参考标准与文献

《分子克隆实验指南》第三版，ISBN 7-03-010338-6

