

ICS 07.080
B 30



中华人民共和国国家标准

GB/T 30988—2014

GB/T 30988—2014

多酚类植物基因组 DNA 提取纯化 及测试方法

Methods of genomic DNA extraction from plants with high levels of polyphenols

中华人民共和国
国家标准
多酚类植物基因组 DNA 提取纯化
及测试方法
GB/T 30988—2014

*

中国标准出版社出版发行
北京市朝阳区和平里西街甲 2 号(100029)
北京市西城区三里河北街 16 号(100045)
网址 www.spc.net.cn
总编室:(010)64275323 发行中心:(010)51780235
读者服务部:(010)68523946
中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷
各地新华书店经销

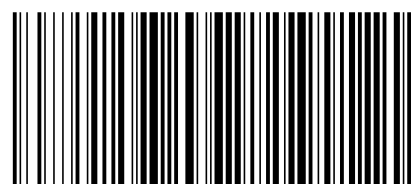
*

开本 880×1230 1/16 印张 0.75 字数 8 千字
2014 年 12 月第一版 2014 年 12 月第一次印刷

*

书号: 155066 · 1-50565 定价 16.00 元

如有印装差错 由本社发行中心调换
版权专有 侵权必究
举报电话:(010)68510107



GB/T 30988—2014

2014-07-24 发布

2015-03-01 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局
中国国家标准化管理委员会 发布

9 DNA 纯度、浓度测试

9.1 紫外分光光度法

将待测 DNA 溶液进行稀释,使样品溶液在 260 nm 处的吸收值为 0.1~0.5,以 TE 缓冲液做参比,测定样品溶液在 260 nm、280 nm、230 nm、270 nm 处的吸收值,计算 A_{260}/A_{280} , A_{260}/A_{230} , A_{260}/A_{270} 的比值, A_{260}/A_{280} 为 1.8~1.9, $A_{260}/A_{230} > 2.0$, A_{260}/A_{270} 为 1.1~1.3 的 DNA 样品可视为较纯 DNA。

符合上述要求后,利用 $A_{260}=1$ 相当于 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的双链 DNA 来计算 DNA 的浓度,依据测得的浓度将 DNA 稀释到 50 $\text{ng}/\mu\text{L}$ ~100 $\text{ng}/\mu\text{L}$, $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 保存。

注:因基因组 DNA 不宜反复冻融,建议将所得 DNA 进行多管分装,使用时取出,融化后立刻使用,使用结束后,剩余的 DNA 放于 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱短期保存,时间不宜超过 14 d。

9.2 琼脂糖凝胶电泳法

取 2 μL ~5 μL DNA 样品溶液与 1 μL $10\times$ 上样缓冲液混合,用超纯水补齐至 10 μL ,在 0.7% 琼脂糖凝胶中以 3 V/cm ~5 V/cm 恒压条件下电泳 40 min,用凝胶成像系统观察 DNA 条带,要求所得 DNA 条带单一、清晰、明亮,同时可利用发出的荧光强度与 DNA 的浓度或质量成线性关系的特性,通过比较待测 DNA 条带与已知浓度 DNA 条带的亮度,测定待测 DNA 样品的浓度。

目 次

前言	III
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 缩略语	1
4 原理	1
5 实验室通用要求	2
6 试剂与溶液	2
7 仪器和设备	2
8 提取步骤	3
9 DNA 纯度、浓度测试	4

A_{260}/A_{230} 、 A_{260}/A_{270} 的比值来评估 DNA 样品的纯度。然后利用 $A_{260} = 1$ 相当于 $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的双链 DNA 来计算 DNA 的浓度。

利用荧光染料(如溴化乙啶)可与琼脂糖凝胶中的 DNA 嵌合,在紫外源激发下发出荧光的特性,通过观察 DNA 条带是否单一、清晰、明亮来评估 DNA 样品的纯度。

5 实验室通用要求

按照 GB/T 19495.3—2004 第 4 章中实验室通用要求的规定执行。

6 试剂与溶液

- 6.1 本标准所使用的水均为一级水,符合 GB/T 6682—2008 的要求。除非另有说明,在分析中仅使用分析纯试剂,所有试剂溶液宜大体积配制、小体积分装后经高压灭菌后使用,不宜高压灭菌的试剂应用 $0.22 \mu\text{m}$ 膜过滤除菌;酶溶液应避免反复冻融。
- 6.2 葡萄糖(glucose, $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$)。
- 6.3 焦亚硫酸钠(sodium pyrosulfite, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$)。
- 6.4 聚乙烯吡咯烷酮[polyvinylpyrrolidone, PVP, $(\text{C}_5\text{H}_9\text{NO})_n$]。
- 6.5 β -巯基乙醇(β -mercaptoethanol, $\text{HOCH}_2\text{CH}_2\text{SH}$)。
- 6.6 十二烷基磺酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS, $\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{O}_4\text{SN}$)。
- 6.7 乙二胺四乙酸二钠(ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt, Na_2EDTA , $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_8\text{Na}_2$)。
- 6.8 三(羟甲基)氨基甲烷[tris (hydroxymethyl) methyl aminomethane, Tris, $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$]。
- 6.9 无水乙醇(alcohol, $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$), 4°C 保存及使用。
- 6.10 氯化钠(sodium chloride, NaCl)。
- 6.11 三氯甲烷(chloroform, CHCl_3)。
- 6.12 异丙醇[isopropyl alcohol, $\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$]。
- 6.13 异戊醇[isoamyl alcohol, $(\text{CH}_3)_2\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$]。
- 6.14 乙酸钠(sodium acetate, NaAc)溶液: $3 \text{ mol}/\text{L}$, 用乙酸调 pH 至 5.2, 不要高压灭菌($0.22 \mu\text{m}$ 膜过滤)。
- 6.15 氯仿: 异戊醇: 乙醇溶液(80:4:16)。
- 6.16 DNA 提取液 I: $100 \text{ mmol}/\text{L}$ Tris-Cl, $20 \text{ mmol}/\text{L}$ EDTA, $500 \text{ mmol}/\text{L}$ NaCl, 1.5% SDS。
- 6.17 DNA 提取液 II: 18.6 g 葡萄糖, 6.9 g $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$, 6.0 g PVP, $240 \mu\text{L}$ β -巯基乙醇, 加水至 300 mL。
- 6.18 TE 缓冲液(pH 8.0): $10 \text{ mmol}/\text{L}$ Tris-Cl, $1 \text{ mmol}/\text{L}$ EDTA, 使用 HCl 或 NaOH 调节 pH。
- 6.19 RNase A 酶溶液: $10 \text{ mg}/\text{mL}$, -20°C 保存, 避免反复冻融。
- 6.20 70%乙醇溶液: 4°C 保存及使用。
- 6.21 $10\times$ 上样缓冲液: 含 0.25% 溴酚蓝, 0.25% 二甲苯青 FF, 30% 甘油水溶液。

7 仪器和设备

- 7.1 冷冻研磨机(样品冷冻, 研磨都处于液氮条件下)。
- 7.2 离心机(可以在 4°C 下进行离心, 离心转速 $10\ 000 \text{ r}/\text{min}$ 以上)。
- 7.3 水浴锅(工作范围 $60^\circ\text{C} \sim 70^\circ\text{C}$)。
- 7.4 涡旋器。
- 7.5 平板电泳仪。

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由中国测试技术研究院提出。

本标准由全国生化检测标准化技术委员会(SAC/TC 387) 归口。

本标准起草单位: 中国测试技术研究院、中测测试科技有限公司。

本标准主要起草人: 谭和平、沈兴中、唐祥凯、周李华、孙登峰。