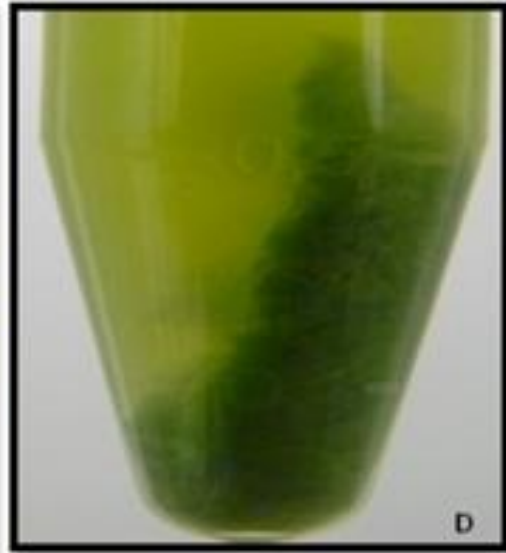


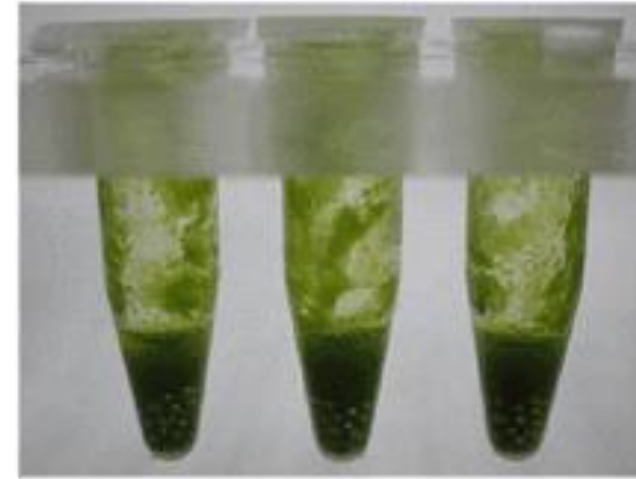
# Выделение растительной ДНК

Лекция 3





**Before**



**After**

# Разные листочки дают разные пигменты

**Green leaves**



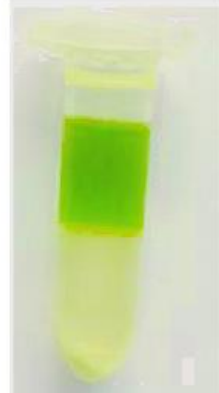
**Senescent leaves**



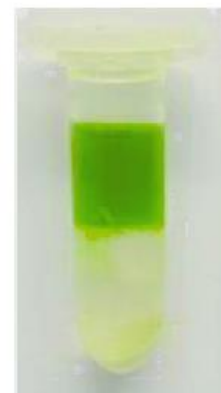
**Stressed leaves**



**Flowers**



**Siliques**

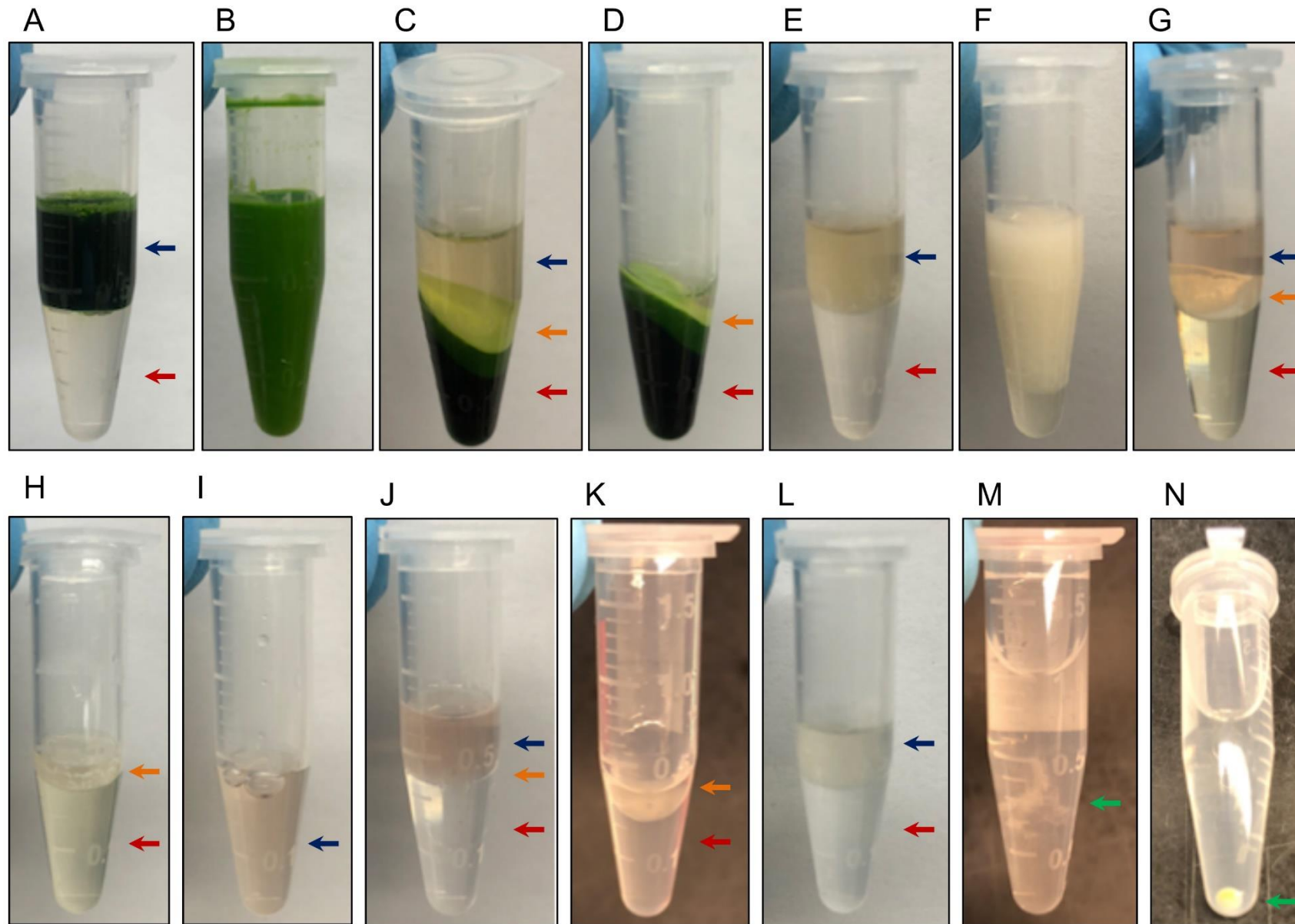


**Seeds**

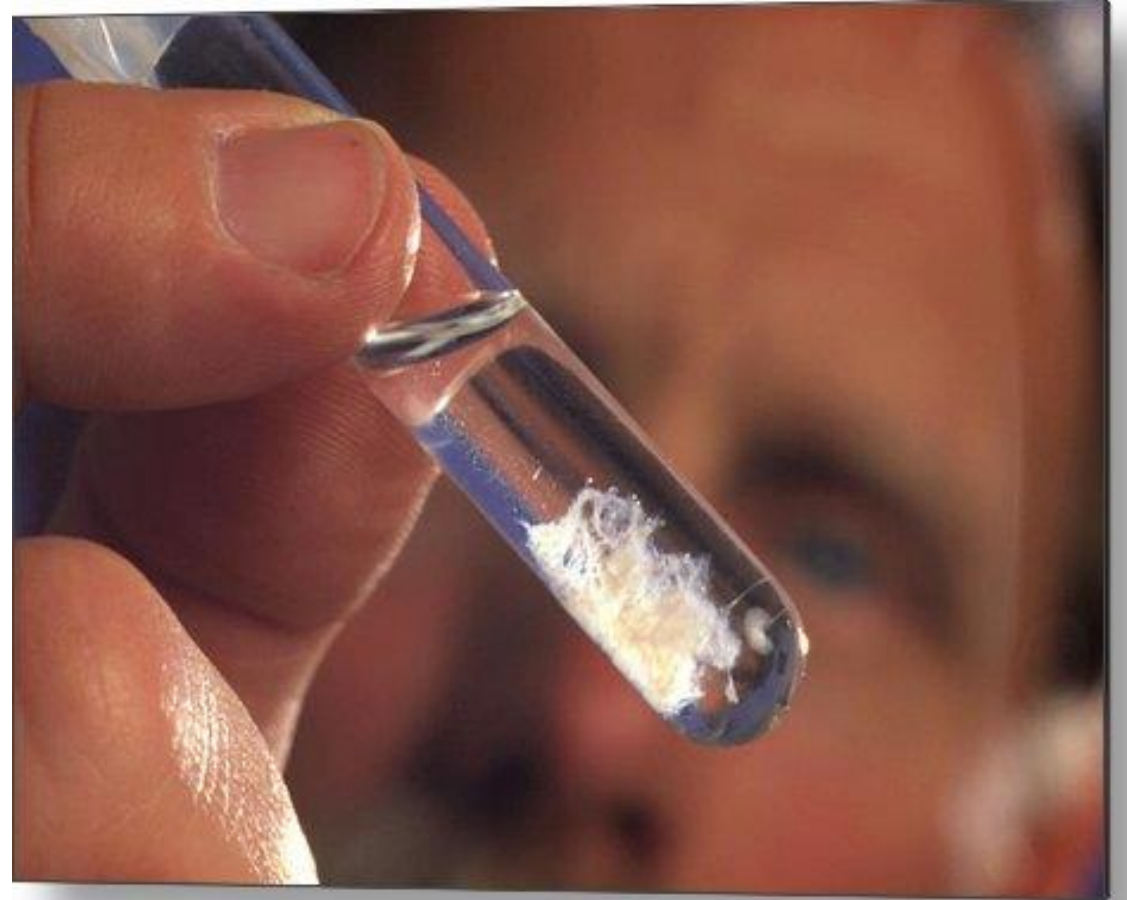




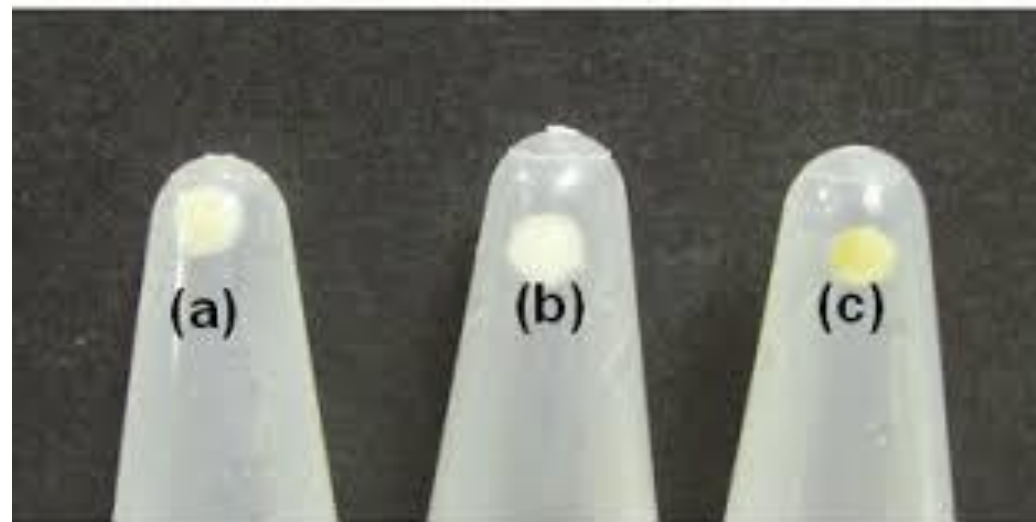
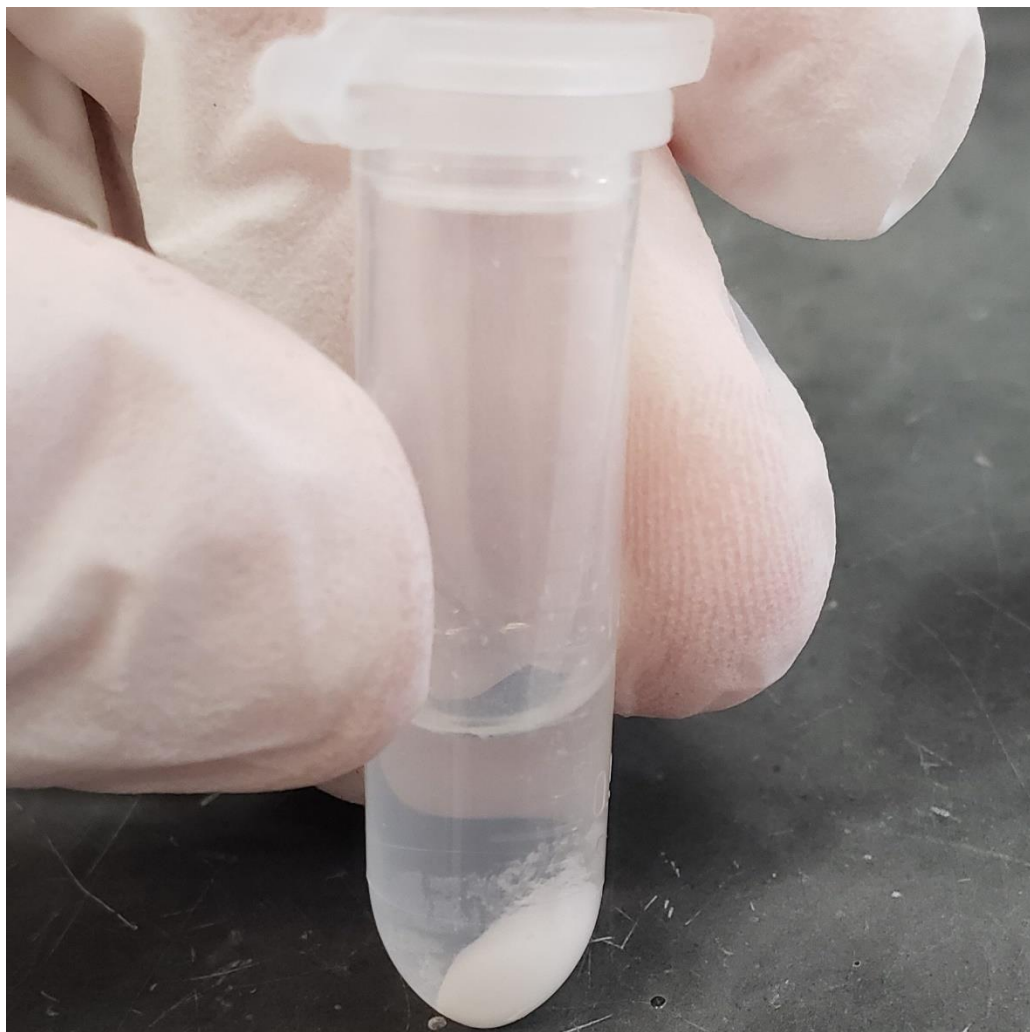
## 2.Разделение фракций центрифугированием при 4°C при 12000 обр/мин в течении 5 мин.



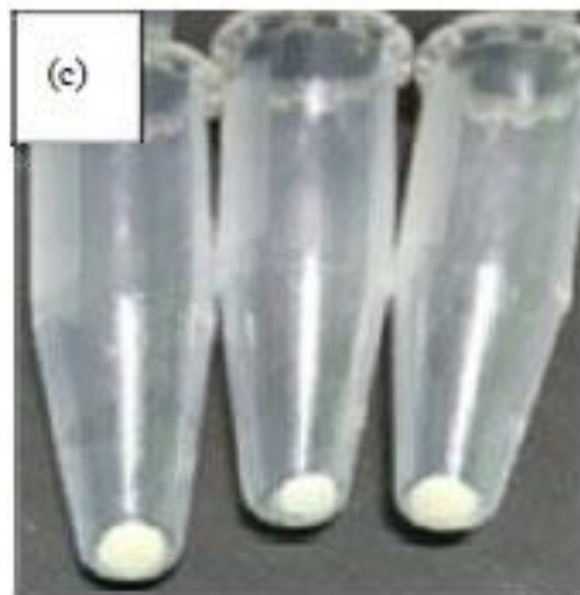
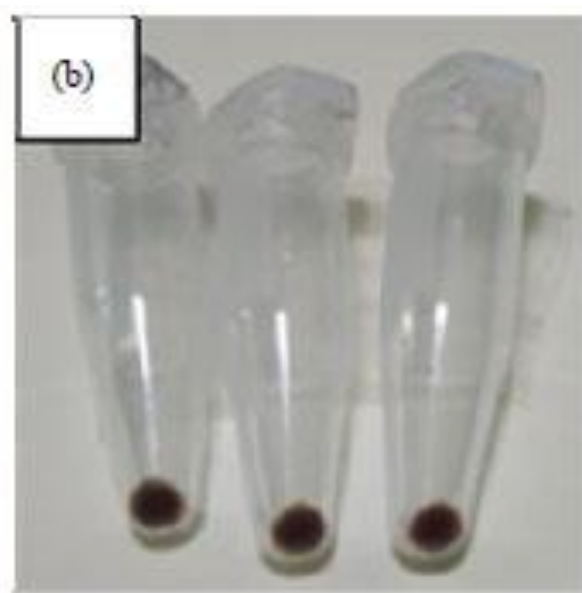
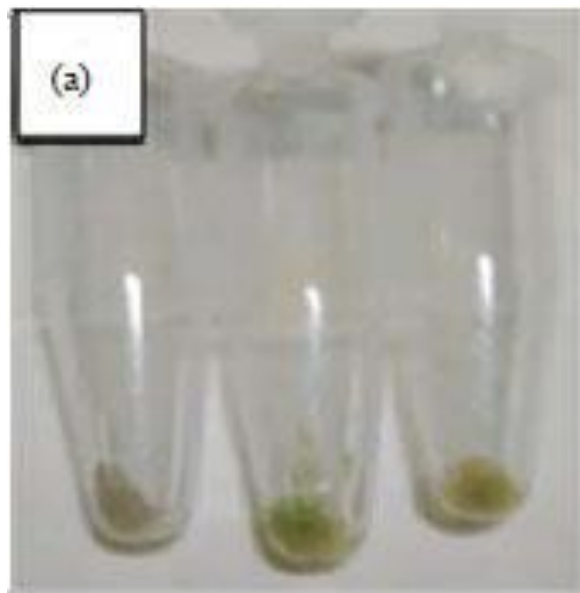
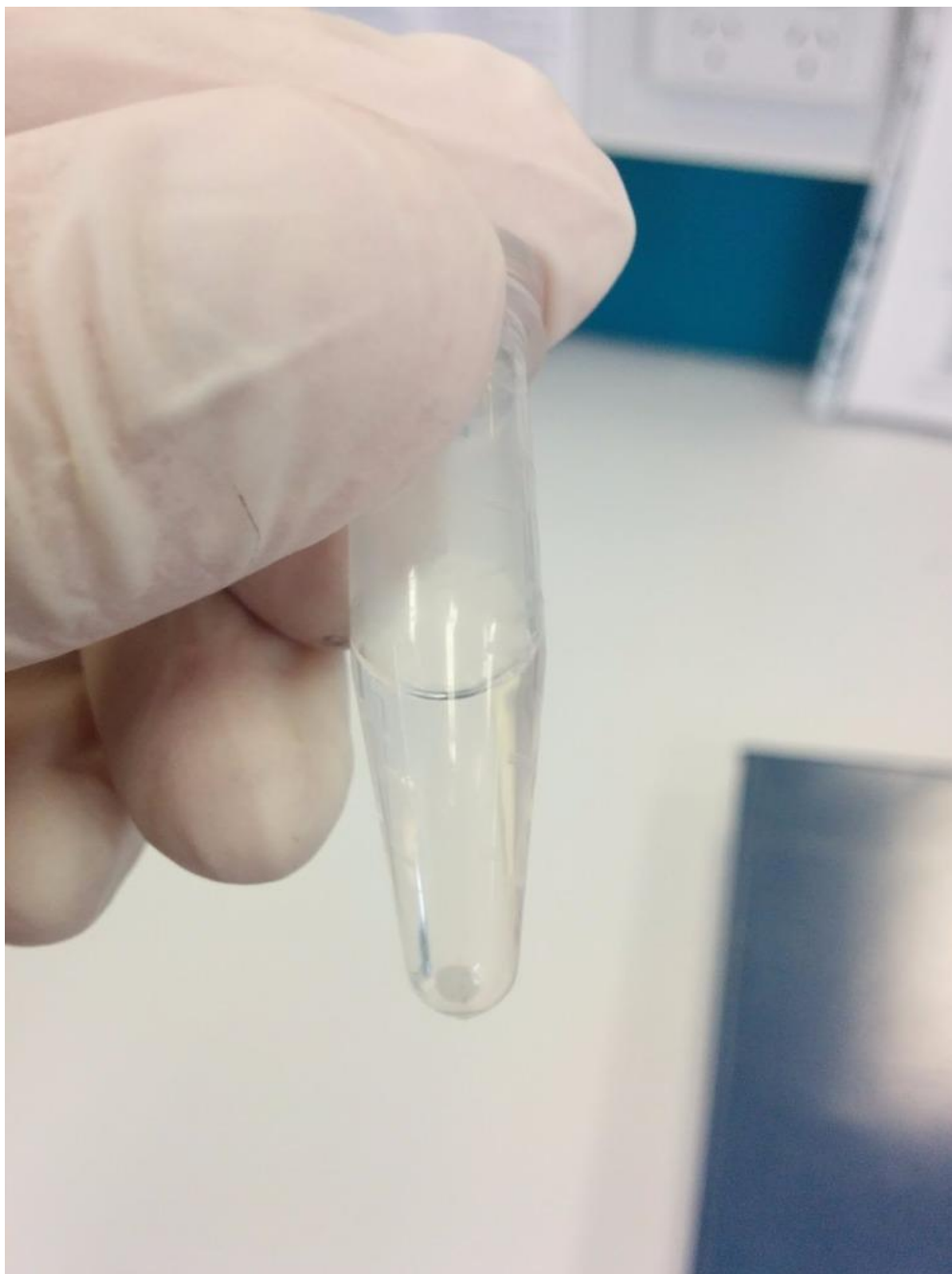
### 3. Осаждение ДНК с 96% спиртом



## 4. Высушить осадок ДНК.









# Протокол выделения ДНК

Выделение ДНК проводили следующим образом:

1. Готовили по числу образцов

**промывочный буфер** (100 мМ Трис–HCl, pH 8.0; 50 мМ ЭДТА; 1 М NaCl; 1% 2–меркаптоэтанол; 1% поливинилпирролидон – ПВП) и

**лизис буфер** (2% СТАВ; 1.42 М NaCl; 200 мМ ЭДТА; 100 мМ Трис–HCl, pH 8.0; 1% 2–меркаптоэтанол; 1% ПВП).

2. Ткань (0.1 г) заливалась жидким азотом в фарфоровой ступке. После испарения азота ткань растирали до порошкообразного состояния.

3. Порошок вносили в 1.5 мл пробирку с 1 мл промывочного буфера, пробирки держали на льду в течение 5 мин, перемешивая содержимое оборачиванием.

4. Пробирки центрифугировали (11000 g) в течение 10 мин при 4°C.

5. Верхний водный слой удаляли и добавляли 700 мкл разогретого до 60–65°C лизис–буфера, равномерно перемешивая гомогенат.

6. Образцы выдерживали в течение 60 мин при 65°C в твердотельном термостате или водяной бане (при этом их перемешивали 4–6 раз в процессе инкубации).
7. Давали пробиркам остыть в течение 4–5 мин, а затем добавляли равный объем фенол–хлороформ–изоамилового спирта (v/v, 25:24:1). Пробирки хорошо перемешивали оборачиванием в течение 1 мин и оставляли стоять 5 мин при комнатной температуре.
8. Пробирки центрифугировали 10 мин при 11000 g.
9. Верхний слой жидкости, около 750 мкл, осторожно переносили в новую пробирку. Повторяли шаги 7–9 один раз, но на шаге 7 добавляли 500 мкл смеси хлороформ–изоамиловый спирт (24:1).
10. К водной фазе в новых пробирках добавляли 2 объема 96% этанола. Осторожно оборачивали пробирки 3–5 раз для осаждения ДНК.
11. Центрифугирование в течение 10 мин.
12. Верхнюю фазу, содержащую «туманность» ДНК переносили в новые 1.5 мл пробирки с 1 мл 70% этанола для промывания ДНК.
13. Шаг 11 повторяли ещё раз, но с этанолом в количестве 500 мкл. Оборачивали пробирки 3–5 раз. Центрифугировали 1 мин при 5000 g, и оставшуюся жидкость удаляли пипеткой. Затем промокали пробирки на фильтровальной бумаге и сушили их в течение 10 мин при комнатной температуре.
14. Осадок ДНК растворяли в 50-100 мкл TE–буфера.