

梨基因组 DNA 提取方法比较研究

刘遵春¹, 包东娥², 廖明安³

(1. 河南科技学院 园林学院, 河南 新乡 453003; 2. 河南科技学院 数学系, 河南 新乡 453003;

3. 四川农业大学 林学院园艺学院, 四川 雅安 625014)

摘要: 通过添加 Vc 对传统的 CTAB 法进行改进, 结果表明: 在磨样时, 1 g 鲜样中添加 0.10 g 的 Vc 提取的 DNA 质量最高; 最佳提取材料是嫩芽, 其次是新梢和成熟叶片。

关键词: 金花梨; 基因组 DNA; 提取

中图分类号: S661.2 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2006)04-0048-03

Comparison of Pear Genomic DNA Extraction Methods

LIU Zun-chun¹, BAO Dong-e², LIAO Ming-an³

(1. College of Landscape Architecture, Henan Institution of Sci-Tech, Xinxiang 453003, China;

2. Mathematic Department, Henan Institution of Sci-Tech, Xinxiang 453003, China;

3. College of Forestry and Horticulture, Sichuan Agriculture University, Ya'an 625014, China)

Abstract: Traditional CTAB method was improved by adding Vc in this experiment. The results showed that the best quality of DNA extracted from pear genome came from the method of adding 0.1 g/g of Vc when the sample was triturated. The DNA was optimal for RAPD analysis and other molecular biology researches. The results of the experiment also indicated that tender bud was the best material, which was followed by the shoot and mature leaf.

Key words: Jinhua pear; Genomic DNA; Extraction method

基因组 DNA 的提取是进行分子生物学研究的重要步骤, 提取 DNA 质量的好坏直接关系到整个试验成功与否。SDS 法和 CTAB 法是最为常用的提取植物 DNA 的两种方法。然而, 由于梨叶片组织中存在大量的单宁、多糖及酚类物质等次生物质, 这些物质在 DNA 提取过程中极易与 DNA 结合, 形成黏稠的复合物, 使之既难以溶解, 又易褐变。因此, 采用传统的 SDS 法和 CTAB 法不易提取到理想的 DNA。多年来, 为使分子生物学技术早日应用于梨属植物研究, 许多学者对现有 DNA 提取方法进行了改进。陈大明等^[1]采用在细胞核被裂解前去除细胞质中的酚类等杂质的方法, 排除了各种次生物质的干扰, 首次成功提取了能够用于 RAPD 分析的梨基因组 DNA。胡春根等^[2]通过添加不同种类和剂量的抗氧化剂, 对 SDS 法做了一定的改进, 发现在提取梨基

因组 DNA 时, 磨样前每克鲜样添加 Vc 0.05~0.25 g, 可以沉淀出供 PCR 扩增用的 DNA。马兵钢等^[3]曾尝试通过一步裂解法和二步裂解法对 CTAB 法进行改进, 虽能获得较为理想的 DNA 粗提液, 但不能完全去除酚类氧化物。本试验在传统 CTAB 法的基础上, 通过在磨样时添加不同剂量的抗氧化剂 Vc, 对 CTAB 法进行一定的改进, 以期待提取到理想的基因组 DNA。

1 材料和方法

1.1 试验材料

梨成熟叶片、新梢和嫩芽均取自四川农业大学梨品种园, 品种为金花梨。

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取 称取 1 g 材料, 置于陶瓷研钵

收稿日期: 2005-11-17

作者简介: 刘遵春(1976-), 男, 山东聊城人, 硕士, 助教, 主要从事果树栽培与生理科研与教学工作。

中,加液氮迅速磨成粉末状。将粉末迅速转入 5 mL 离心管中,加入 2 mL 提取缓冲液(已 65℃预热),混匀后,放入 65℃恒温水浴中保温 45 min 左右。水浴过程中多次混匀,加入等体积的氯仿-异戊醇(24: 1),缓慢上下颠倒混匀,抽提 15 min 至上清液呈乳白色,离心(8 000 r/min, 10 min)使分层,将上清液转入另一离心管,再以等体积氯仿-异戊醇(24: 1)抽提 10 min,离心(8 000 r/min, 5 min),收集上清液,加入 2 倍体积-20℃预冷的无水乙醇,置于-20℃下静置 30 min,缓慢摇匀,离心(3 000 r/min, 2 min),收集沉淀,加 2 mL 70% 乙醇洗涤 2 次,每次 2 min。再以无水乙醇漂洗 1 次,在室温下干燥,最后加入 70 μL 无菌去离子水溶解,即为 DNA 粗提液。此方法在玉米、小麦等农作物上提取效果良好,但在梨中提取的 DNA 呈深褐色,无法用于 RAPD 分析。为避免材料褐变,本试验在磨样时做如下处理,即:对照,未添加 Vc;处理 A,1 g 鲜样添加 0.05 g 的 Vc;处理 B,1 g 鲜样添加 0.10 g 的 Vc;处理 C,1 g 鲜样添加 0.15 g 的 Vc。其他步骤相同。

1.2.2 不同提取材料比较 筛选出最佳提取方案后,采用最佳提取方案进一步比较嫩芽、新梢和成熟叶片 3 种不同材料的提取效果,筛选出最佳提取材料。

1.2.3 DNA 纯度测定 吸取 15 μL DNA 粗提液稀释 200 倍,在 755B 型紫外分光光度计上测波长在 260, 280 nm 处光吸收值,根据 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 值判断 DNA 纯度,由 OD₂₆₀ 值计算 DNA 产率(DNA(μg/g)=200×OD₂₆₀)。再取 3 μL DNA 粗提液在 0.8% 琼脂糖凝胶上电泳、拍照,以判断 DNA 是否降解。

2 结果与分析

2.1 添加不同剂量的 Vc 对提取金花梨基因组 DNA 产率和纯度的影响

在磨样时添加不同剂量的 Vc,采用 CTAB 法提取金花梨基因组 DNA,其产率和质量差别较大(表 1)。结果表明:在研磨未添加 Vc 时,所提 DNA 不易溶解,粗提液呈现深褐色且较黏稠,经电泳检测发现未提取到 DNA。随着 Vc 添加量增大,DNA 粗提液颜色逐渐变浅,由浅绿色最后转变为无色,黏稠度大大降低,并且 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 在 1.84~1.96,表明抗氧化剂 Vc 的加入能很好地抑制酚类物质的褐变,在提取过程中,酚类物质基本完全除去,所提取 DNA 能够用于 RAPD 分析。但试验发现,随着 Vc 添加量

的增加,DNA 产率明显下降,依次为 166.4,159.4,90.6 μg/g,可能由于 Vc 的加入降低了 CTAB 提取缓冲液的 pH 值,影响了 DNA 的提取。再经琼脂糖凝胶电泳检测发现,各处理所提取 DNA 均未降解(图 1),DNA 条带明暗程度与 DNA 产率相一致。经比较可知,在磨样时添加 0.10 g/g 鲜样的 Vc,所提取 DNA 产率较高(159.6 μg/g),质量好(OD₂₆₀/OD₂₈₀ 为 1.84,且呈无色),为最佳提取 DNA 的方法。

表 1 不同 Vc 剂量提取基因组 DNA 的质量和产率

Tab 1 Genomic DNA yield and purity from different doses of Vc					
处理 Treatment s	DNA 颜色 DNA color	OD ₂₆₀	OD ₂₈₀	OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀	DNA 产率 DNA yield (μg/g)
对照	深褐色	0.425	0.308	1.38	85.0
A	浅绿色	0.832	0.424	1.96	166.4
B	无色	0.798	0.434	1.84	159.6
C	无色	0.453	0.243	1.86	90.6

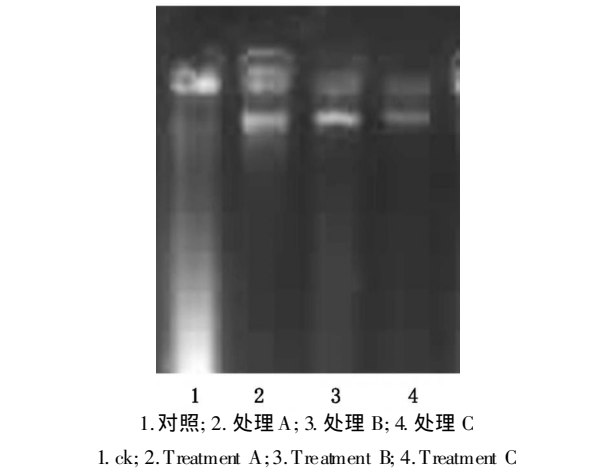


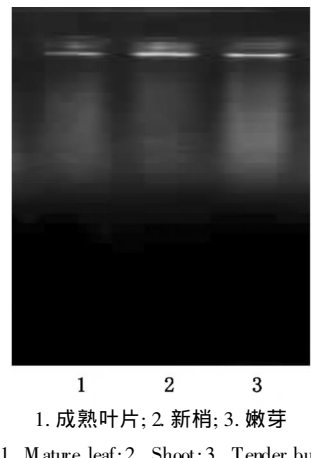
图 1 不同 Vc 添加量提取基因组 DNA 电泳检测结果

Fig 1 The pattern of genomic DNA isolated from different doses Vc by electrophoresis

2.2 不同组织器官对提取金花梨基因组 DNA 产率和纯度的影响

采用改进的 CTAB 法分别从金花梨成熟叶片、新梢和嫩芽中提取基因组 DNA,其产率和质量差别不大。所提取的基因组 DNA 粗提液颜色均呈无色,表明酚类物质已被除去,OD₂₆₀/OD₂₈₀ 在 1.84~1.96,均能满足 RAPD 分析的需要。3 种材料所提取基因组 DNA 的不同仅在 DNA 产率上存在一定的差异。新梢和嫩芽两种材料属于幼嫩材料,次生物质含量少,二者在所提取基因组 DNA 的产率差别不大,分别为 151.2,159.6 μg/g,而成熟叶片组织结构成熟,

次生物质含量高,所提取 DNA 的产率略低于新梢和嫩芽。各样品再经琼脂糖凝胶电泳检测(图 2),发现 DNA 均未降解。经比较可知,新梢和嫩芽可作为提取 DNA 的理想材料。



1. 成熟叶片; 2. 新梢; 3. 嫩芽
1. Mature leaf; 2. Shoot; 3. Tender bud

图 2 不同材料提取的基因组 DNA 电泳检测结果

Fig 2 The pattern of genomic DNA isolated from different materials by electrophoresis

表 2 不同材料提取基因组 DNA 的质量和产率

Tab 2 Genomic DNA yield and purity from different materials

材料 Material	DNA 颜色 DNA color	OD ₂₆₀	OD ₂₈₀	OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀	DNA 产率 DNA yield (μg/ g)
成熟叶片 Mature leaf	无色	0. 682	0. 348	1. 96	136. 4
新梢 Shoot	无色	0. 756	0. 409	1. 85	151. 2
嫩芽 Tender bud	无色	0. 798	0. 434	1. 84	159. 6

3 讨论

本试验在传统 CTAB 法的基础上,通过在磨样时添加抗氧化剂 Vc, 对其进行了改进。结果表明:在磨样时 1 g 材料添加 0. 10 g 的 Vc, 从嫩芽中提取的 DNA 为白色絮状, OD₂₆₀/OD₂₈₀ 为 1. 84, 产率较高, 易溶解。这说明加入抗氧化剂 Vc, 能够有效地抑制酚类物质的氧化, 采用这种方法改进是成功的, 采用改进的 CTAB 法能够提取到高质量的梨基因组 DNA。同时还发现, 以嫩芽、新梢和成熟叶片为材

料, 采用改进的 CTAB 方法提取 DNA 效果有所不同, 其中嫩芽所提取 DNA 产率最高, 而成熟叶片最低, 可能的原因是成熟叶片中酚类等次生物质积累较多, 干扰了 DNA 的提取, 而春季刚萌发的嫩芽, 组织幼嫩, 酚类物质含量少, 有利于 DNA 的提取。张水明等^[4]在采用 SDS 法比较不同材料提取效果时曾有类似报道。

除了采用好的提取方法和材料以外, 试验中还应注意: 研磨时为了防止材料解冻后与空气接触氧化褐变, 应在磨碎且溶化之前迅速转入 5 mL 的离心管中, 并迅速加入已 65℃预热的提取缓冲液, 混匀立即进行恒温提取。此外, 在不能及时提取 DNA 时, 提取材料应采用- 70℃超低温保存, 并注意在研磨前不要损伤材料。由于 Vc 带有 1 个羧基, 加入 Vc 对提取缓冲液的 pH 值有一定的影响, 并随着 Vc 加入量的增加, 缓冲液 pH 值逐渐下降, DNA 产率也逐渐减少。当 Vc 的加入量超过 0. 20 g/ g 时, 就无法提取到 DNA。试验证明, 当每克鲜样加入 Vc 的量控制在 0. 10 g 左右时, 对缓冲液 pH 值影响不大, 并能完全抑制酚类物质氧化, 且 DNA 产率高。2 次转移上清液时应视量采取宁少勿多的办法, 避免导致界面活动, 将杂质带入下一步操作。注意 DNA 的洗涤次数和时间, 若 DNA 洗涤次数过少, 时间过短, 则样品中的氯仿、异戊醇、乙醇、氯化钠等小分子杂质不易去除干净, 直接影响 Taq 酶的活性。

参考文献:

[1] 陈大明, 张上隆, 金勇丰. 一种木本果树基因组 DNA 提取方法研究[J]. 浙江农业大学学报, 1997, 23(6): 621-624.

[2] 胡春根, 郝玉, 邓秀新, 等. RAPD 分析用的梨 DNA 提取方法[J]. 遗传, 1998, 20(4): 31- 33.

[3] 马兵钢, 牛建新, 马连营, 等. 库尔勒香梨基因组 DNA 提取及 RAPD 体系建立[J]. 新疆农业科学, 2001, 38(1): 18- 22.

[4] 张水明, 宋丰顺, 巩雪梅, 等. 砀山酥梨基因组 DNA 提取和 RAPD 条件优选[J]. 安徽农业大学学报, 2003, 30(1): 178- 181.