

快速提取番茄总 DNA 应用于规模化 PCR 检测

陈绍宁, 崔继哲

(哈尔滨师范大学生命与环境科学学院生物学系, 150080)

摘要: 在传统方法的基础上经多次实践改进, 得到一种简单快速从番茄叶片中提取总 DNA 的方法。

所提取的 DNA 纯度高, 浓度较大, 可用于对转基因番茄进行稳定而准确的规模化 PCR 检测。

关键词: DNA 提取; 番茄; PCR

中图分类号: S641.2; S603.6 文献标识码: B 文章编号: 1001-0009(2004)03-0046-02

在对转基因植物进行分子检测时, 提取及鉴定 DNA 已成为一种普遍应用的技术。高质量 DNA 的获得是进行各项遗传操作的基础, 近年来各种改良的 CTAB 法、SDS 法层出不穷。提取 DNA 的适宜方法、材料因不同的植物而异。在对转基因植株进行 PCR 检测时, 需要在短期内对几百甚至几千株植物的模板 DNA 进行分析, 因此选用适宜的方法快速高效地提取总 DNA 非常关键。番茄的叶片中含有较多的酚类、多糖和蛋白质, 这些物质的存在严重影响提取 DNA 的质量, 不利于后续分析研究的进行。应用传统的 CTAB 法^[1]及 SDS 法^[2]提取番茄 DNA 需反复抽提蛋白才能使样品达到所需纯度, 在进行大规模样本分析时, DNA 的提取仍是非常耗时的; 并且不能很好地去除酚类物质, 造成 DNA 样品褐化, 从而影响了进一步的 PCR 分析。本研究发现对传统的 CTAB 提取方法中几个关键步骤加以改进后, DNA 的纯度明显提高。改进后的 CTAB 法简单、快速、高效, 全部过程在 1.5 ml(毫升)离心管内完成, 一人独立操作每天可提取样品 200 个以上, 所提取的 DNA 纯度高、浓度较大, 完全适于对规模化转基因番茄进行稳定而准确的 PCR 检测。

1 材料与方法

1.1 植物材料

转基因番茄组培苗的叶片、种植苗上部未完全展开的小叶, 非转基因番茄对照。

1.2 DNA 的提取

方法 1, 本实验室改进的 CTAB 法。提取缓冲液为 20 g/L(克/升)CTAB, 100 mmol/L Tris(pH 8.0), 20 mmol/L EDTA(pH 8.0), 1.4 mol/L(摩尔/升)NaCl, 40 g/L(克/升)PVP, 2%β-巯基乙醇, 以灭菌双蒸水混配定容而成。实验操作程序如下: 取材 20 mg~40 mg(毫克)至 1.5 ml(毫升)离心管内, 经液氮速冻用自制研磨器研磨成粉末; 快速加入 65℃预热的提取缓冲液 650 μl(微升), 用细玻璃棒迅速搅匀; 65℃水浴保温 30 min(分钟), 其间不断轻摇, 颠倒混匀; 冷却至室温加入 700 μl(微升)氯仿-异戊醇(24:1), 颠倒混匀 5 min~10 min(分钟); 4℃, 12 000 rpm, 离心 15 min~20 min(分钟); 吸 250 μl(微升)上清移入另一离心管中, 加入 2 倍体积的 20℃预冷的无水乙醇, 缓慢混匀, -20℃放置 30 min~

40 min(分钟); 4℃, 10 000 rpm, 离心 3 min~5 min(分钟), 弃上清; 用-20℃预冷的 70%乙醇清洗沉淀 2 次, 室温风干; 以 50 μl(微升)TE 溶解样品 DNA。方法 2, 原 CTAB 法, 参见文献^[1], 氯仿-异戊醇抽提一次。方法 3, SDS 法, 参见文献^[2], 氯仿异戊醇抽提一次。

根据以上不同方法提取的 DNA 用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳进行检测, 取 1 μl(微升)DNA 提取液用于 PCR 反应。

1.3 PCR 扩增

取用不同方法提取的 DNA 作为模板进行 PCR 扩增, 反应体系为 10 μl(微升), 其中: 模板 DNA 1 μl(微升), TaqDNA 聚合酶缓冲液 1 μl(微升), dNTP 混合物 0.8 μl(微升), 上下游引物各 0.1 μl(微升)(20 mmol/L), TaqDNA 聚合酶 0.08 μl(5 u/μl)。反应程序: 95℃预变性 5 min(分钟), 94℃30 s(秒), 54.6℃50 s(秒), 72℃1 min(分钟), 35 个循环后, 72℃延伸 10 min(分钟)。

扩增反应完成后, 用 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳检测扩增结果。相同模板重复扩增 3 次。

2 结果与讨论

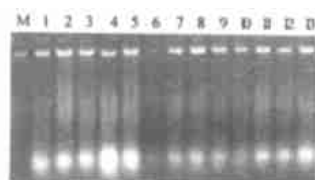


图 1 应用改进 CTAB 法提取的 DNA
M λDNA; 1—6 组培苗; 7—13 种植苗

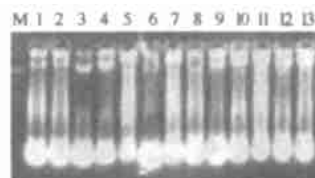


图 2 应用原 CTAB 法提取的组培苗 DNA
M λDNA; 1—6 组培苗; 7—13 种植苗

2.1 结果

以上述 3 种方法所提取 DNA 的琼脂糖凝胶电泳检测结果如图 1~3。图 1 为应用改进的 CTAB 法提取的 DNA, 可

* 黑龙江省科技攻关重大项目(GA01B101—10)资助。

收稿日期: 2004-02-11

见,所提取的 DNA 分子量与对照 λ DNA 相近,没有降解,条带清晰,整齐干净;方法 2 和方法 3 提取的 DNA 含有较高浓度的 RNA,且蛋白质含量高(图 2、3)。应用改进的 CTAB 法提取的 DNA 用于 PCR 反应,结果如图 4 所示,以种植苗 DNA 为模板,获得了清晰稳定的扩增条带,组培苗结果相同。其它两种方法提取的 DNA 的 PCR 扩增产物不稳定,重复性差,杂带也较多(图略),不能作为检测转基因植物的依据。



图 3 应用 SDS 法提取的 DNA
M λ DNA; 1—6 组培苗; 7—13 种植苗



图 4 用改进 CTAB 法提取的 DNA 的 PCR 结果
M DL2000; 1—7 转基因番茄植株; 8 非转基因植株;
9 阴性对照(水); 10—11 阳性对照

采用改进的 CTAB 法提取番茄 DNA, 整个提取过程简单快捷, 用材料量少, 提取效率高, 独立操作每人每天可提取样品 200 个以上, PCR 扩增效果好, 适合于对大群体的转基因植株进行 PCR 为基础的分子检测工作。

2.2 讨论

番茄叶片中含有大量的酚类物质及色素, 这些物质及 RNA、蛋白质和多糖等主要污染物的存在严重影响了番茄 DNA 的提取。传统的 CTAB 法和 SDS 法必须经反复抽提才可去除 RNA、蛋白质等杂质, 但无法改善酚类物质引起的样

品褐化。本研究经多次实践对传统 CTAB 法的几个关键步骤加以改进, 得到一种简单快捷高效的提取方法, 不仅适用于杂质较少提取相对容易的组培苗, 而且同样适用于苗龄较大的种植苗。所提取的 DNA 质量好, 不降解, 纯度高, 并且以种植苗为材料所提取的模板 DNA 样品褐化程度明显减轻, 可与组培苗 DNA 同样获得稳定清晰的扩增结果(图 4)。与其它两种方法相比, 简化了抽提步骤, 只需一次抽提即获得纯度较高的 DNA 样品, 减轻样品褐化对 PCR 的影响, 节省了植物材料, 对于转基因番茄的早期检测, 省时省力, 是一种理想的提取方法。

应用本方法获得高质量 DNA 的关键在于以下几点: a. 研样迅速、越细越好。样品之间提取 DNA 量的差异主要是由研磨破碎程度所决定的, 样品研磨细致, 提取到 DNA 量则多。研磨过程应迅速, 避免材料融化造成的 DNA 降解。在对大群体转基因植物进行检测时, 为提高效率最好集中研磨, 研磨后的材料置 -80°C 冰箱内保存, 待提取用。b. 减少样品量。取材量应限制在 20 mg ~ 40 mg (毫克), 所用材料太多, 提取缓冲液作用不充分, 往往导致提取失效。c. 提高 PVP、 β -巯基乙醇的用量。提取液中 CTAB、 β -巯基乙醇等含量对去除叶片中的酚类、多糖和次生物质具有显著作用, 认为它们的浓度不宜低于 1%^[3], 这对于提取到高质量的 DNA 至关重要。d. 缓冲液在 65°C 预热, 样品加入缓冲液后立即用细玻璃棒混匀, 迅速升温到 65°C , 防止 DNA 降解。

参考文献:

- [1] Theresa MF, Steven DT. Microprep Protocol for Extraction of DNA from Tomato and other Herbaceous Plants. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1995, 13(3): 207 ~ 209.
- [2] Michaels SD, John MC, Amasino RM. Removal of polysaccharides from plant DNA by ethanol precipitation. *Biotechniques*, 1994, 17(2): 274 ~ 276.
- [3] Cheng FS, Broun SK, Weeden NF. A DNA extraction protocol from various tissues in woody species. *HortScience*, 1997, 32(5): 921 ~ 922.

优良的花卉栽培基质——陶化营养土

曹 辉¹, 赵玉安¹, 王 峰²

花卉无土栽培是一项新型的栽培技术, 干净、卫生、管理方便, 非常适应于现代宾馆、饭店、办公楼和家庭居室的绿化、美化布置。

陶化营养土是郑州市农林科学研究所(花卉组)在传统陶粒制造工艺的基础上加以改良, 在原材料中添加了植物生长所需的大量元素和微量元素, 并通过造粒工艺和烧制工艺的改良, 保持了这些元素的活性。既保持了传统陶粒的多孔性、质轻, 良好的保水、保肥和排水通气性, 又增加了其营养功能。我们曾对陶化营养土和几种传统陶粒进行过对比测试分析, 现简要介绍一下分析结果供读者参考。

1 外观性状 陶化营养土突破了传统陶粒颜色、形状、粒径的单一性。现有砖红、灰绿、土黄、灰咖啡等颜色, 形状有

麻点状、圆球状, 粒径 2 mm ~ 12 mm (毫米) 大小不等。这些性状的突破既增加了栽培植物整体的观赏性, 又扩大了栽培植物的范围(适于各种根系和植株性状的植物栽培)。

2 理化性状 陶化营养土的容重在 0.9 g/cm^3 (克/立方厘米) 左右, 比土壤轻, 但又较传统陶粒重, 表现出更加良好的固定植物的特性; 总孔度在 0.65 左右, 能够提供良好的供水、气空间; 吸水率为 0.20 g/kg (克/公斤) 左右, 能够很好地供给植物水分, 并且有很好的保水性能, 可很好保持植物生长环境的湿度; 水溶盐总量在 $2 \text{ g/kg} \sim 3 \text{ g/kg}$ (克/公斤) 之间, 适宜各种植物生长, 不会对植物造成生理盐害, 且能为植物提供一定的养分。陶化营养土在植物移栽时的营养功能是其一大特性, 克服了植物移栽时营养液浓度不易控制这一困难。

陶化营养土的作物栽培试验表明, 它在固定植物保水、通气、供水、供肥等方面表现出良好的更加优良的特性, 适于绝大多数花卉植物的生长。

(1. 河南省郑州市农林科学研究所; 2. 河南省郑州市农业局园艺站, 450005)