

蒿种子基因组 DNA 提取方法的比较研究

孔 红, 闫训友, 孟凡萍

(廊坊师范学院 生命科学学院 河北 廊坊 065000)

摘 要:以籽蒿 (*Artemisia sphaerocephala* Krasch) 种子为试验材料, 采用 SDS 法、CTAB 法及 SDS-CTAB 法进行基因组 DNA 提取。结果表明: SDS-CTAB 法适于籽蒿 (*A. sphaerocephala*) 种子基因组 DNA 提取, SDS 法次之, CTAB 法不适合。

关键词:籽蒿; 基因组 DNA; SDS 法; CTAB 法; SDS-CTAB 法

中图分类号: S 793.905 文献标识码: A 文章编号: 1001-0009(2007)12-0197-02

植物基因组 DNA 的提取是分子标记技术的重要基础。目前, 植物基因组 DNA 的提取方法很多, 最常用的方法有 SDS 法^[1]和 CTAB 法^[2]。SDS 和 CTAB 都是一类离子去污剂, 其作用是裂解细胞释放 DNA, 并与提取液中的 EDTA 一起, 共同保护 DNA 免受内源核酸酶的降解。因此, SDS 法和 CTAB 法一直是植物 DNA 提取的两种有效方法。田苗苗等^[3]将 SDS 法和 CTAB 法结合(以下简称 SDS-CTAB 法), 进行了大豆种子基因组 DNA 的提取, 获得了高质量的 DNA。SDS-CTAB 法是先利用 SDS 法进行基因组 DNA 的粗提, 然后将经乙醇沉淀得到的 DNA 直接溶于 CTAB 提取缓冲液中, 通过 SDS 和 CTAB 的双重作用将材料中的杂质有效地去除, 是一种改良的基因组 DNA 提取方法。

籽蒿 (*Artemisia sphaerocephala* Krasch) 是菊科蒿属 (*Artemisia*) 一种超旱生半灌木, 为我国西北地区重要的固沙植物。近年来, 籽蒿的形态解剖、花粉、种子萌发策略、生物特征群落学等方面的研究报道较多, 但关于籽蒿的 DNA 提取、分子标记等方面的研究很少^[4]。

研究以籽蒿种子为试验材料, 采用 SDS 法、CTAB 法及 SDS-CTAB 法对籽蒿种子基因组 DNA 进行提取, 试图探索一条籽蒿种子基因组 DNA 提取的有效方法。

1 材料与方法

1.1 材料

籽蒿 (*A. sphaerocephala*) 种子采自宁夏沙坡头沙漠试验站。将种子在水中浸泡 12 h, 种子中含有的大量粘性物质遇水后分泌到种子周围, 然后把种子从粘性物质中刮出, 放冰箱中冰冻 24 h 待用。

1.2 试剂

第一作者简介: 孔红(1964), 女, 教授, 硕士, 主要从事植物学研究。E-mail: tssy_kh@sina.com。

基金项目: 廊坊师范学院科学研究资助项目 (LSAZ200703)。

收稿日期: 2007-07-11

SDS 提取缓冲液 (0.4 M Tris-HCl, 3% PVP, 10 mM β -巯基乙醇); SDS 裂解缓冲液 (0.1 M Tris-HCl pH 8.0, 20 mM EDTA pH 8.0, 0.5 M NaCl, 1.5% SDS); CTAB 提取缓冲液 (2% CTAB, 0.1 M Tris-HCl pH 8.0, 20 mM EDTA pH 8.0, 2.0 M NaCl, 2% β -巯基乙醇); CTAB 沉淀缓冲液 (1% CTAB, 0.05 M Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA pH 8.0, 2.0 M NaCl, 1% β -巯基乙醇); 高盐 TE 缓冲液 (0.01 M Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0, 1 M NaCl, 1.5% SDS); TE 缓冲液 (0.01 M Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0); 10% CTAB; 70% 乙醇; 无水乙醇; 氯仿: 异戊醇 (24:1); 氯仿: 异戊醇: 乙醇 (80:4:16)。

1.3 DNA 提取方法

SDS 法: 与赖相红等 2003^[1] 相同。CTAB 法: 与徐景升等 2004^[2] 相同。SDS-CTAB 法: 与田苗苗等 2005^[3] 相同。以上 3 种方法均未用 RNase 消化。

1.4 DNA 检测方法

1.4.1 紫外分光光度计检测 测 260 nm、280 nm 的光吸收值、 A_{260}/A_{280} 的比值、DNA 浓度、DNA 得率。若 A_{260}/A_{280} 在 1.8~2.0 之间, 表明 DNA 纯度较高; 比值大于 1.8, 表明提取物中含 RNA; 比值小于 1.8, 表明提取物中含有杂质。

1.4.2 琼脂糖凝胶电泳检测 取 2 μ L DNA 提取液, 加 1 滴溴酚兰, 混匀。110 V 下电泳 20 min。根据电泳图谱检测 DNA 降解情况。

2 结果与分析

经紫外分光光度计检测, 3 种方法提取的 DNA 检测结果见表 1。由表 1 可知, CTAB 法提取(重复 3 次)的 DNA 其 A_{260}/A_{280} 值均在 1.6~1.8 之间; SDS 法提取(重复 3 次)的 DNA 其 A_{260}/A_{280} 值均在 1.6~1.9 之间; SDS-CTAB 法提取(重复 3 次)的 DNA 其 A_{260}/A_{280} 值均在 1.7~1.9 之间。结果初步表明 SDS-CTAB 法提取的 DNA 纯度较好, SDS 法次之, CTAB 法较差; 而 SDS 法

提取的 DNA 产量最高, SDS-CTAB 法次之, CTAB 法最低。

由图 1 可以看出 SDS-CTAB 法提取的 DNA 电泳谱带较清晰, DNA 较完整, 降解小, 一个点样孔内稍有杂质; SDS 法次之, 两个点样孔内有杂质; CTAB 法谱带不清晰, DNA 完整度低。由于试验未经 RNAse 处理, 电泳图谱除显示 DNA 带外, 还有 RNA 带。

表 1 3 种方法从籽蒿种子中提取的 DNA 检测数据

序号	提取方法	A ₂₆₀	A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	DNA 得率/ug·g ⁻¹
1	CTAB	0.037	0.023	1.609	74
2	CTAB	0.046	0.026	1.769	92
3	CTAB	0.035	0.020	1.750	70
1	SDS	0.101	0.055	1.836	202
2	SDS	0.130	0.079	1.646	260
3	SDS	0.193	0.111	1.739	386
1	SDS-CTAB	0.085	0.048	1.771	170
2	SDS-CTAB	0.083	0.047	1.766	166
3	SDS-CTAB	0.094	0.051	1.843	188

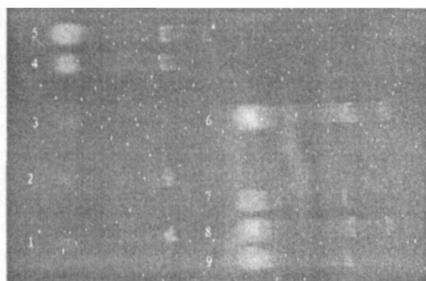


图 1 3 种方法从籽蒿种子中提取的 DNA 的电泳图谱
注: 1,2,3 CTAB 法; 4,5,6 SDS 法; 7,8,9 SDS-CTAB 法。

3 讨论

籽蒿 (*A. sphaerocephala*) 种子中含有大量的粘性

物质, 遇水后会分泌到种子周围, 据报道, 这些粘性物质属于多糖类, 分泌量可达种子干重的 589 倍^[4]。研究发现, 这些粘性物质的存在严重影响着基因组 DNA 的提取。因此, 应先把种子浸泡, 使种子中的粘性物质吸水膨胀后分泌到种子周围, 然后将种子从粘性物质中刮出再进行 DNA 提取, 可明显提高 DNA 提取效果。

通过试验发现, 由于籽蒿 (*A. sphaerocephala*) 种子中糖类含量高, 单纯采用 SDS 法提取的 DNA 中糖类杂质较多, 而 CTAB 法可很好地去除糖类杂质。因此, 先用 SDS 法进行 DNA 的粗提, 然后将经乙醇沉淀得到的 DNA 直接溶于 CTAB 提取缓冲液中, 利用 CTAB 与核酸形成的复合物可溶解在高盐缓冲液中这一特性, 将 SDS 法提取的 DNA 与 CTAB 结合在一起, 再经氯仿/异戊醇抽提, 乙醇沉淀, 可得到质量较高的 DNA。

琼脂糖凝胶电泳、紫外分光光度计检测结果表明 SDS-CTAB 法提取籽蒿 (*A. sphaerocephala*) 种子基因组 DNA 获得了较好的结果。该方法的一个优点就是通过 SDS 和 CTAB 的双重作用将籽蒿种子中的杂质有效地去除, 并且仅用了 2 次氯仿/异戊醇的抽提, 这在一定程度上减少了多次抽提过程中基因组 DNA 的损失。因此, SDS-CTAB 法是提取籽蒿种子基因组 DNA 的一种有效方法。

参考文献

- [1] 赖相红, 王沛政, 朱文彬, 等. 向日葵总 DNA 不同提取方法比较及在 RAPD 中的应用研究[J]. 新疆农业大学学报, 2003, 26(1): 24-27.
- [2] 徐景升, 姚伟, 余爱丽, 等. 微量大豆种子基因组 DNA 的快速制备[J]. 植物生理学通讯, 2004, 40(5): 595-597.
- [3] 田苗苗, 周延清, 牛敬媛, 等. 单粒干燥大豆种子基因组 DNA 提取的有效方法[J]. 生物学通报, 2005, 40(10): 38-40.
- [4] 王铁娟, 杨持, 马静, 等. 籽蒿的地理分布与遗传分化[J]. 植物生态学报, 2005, 29(1): 122-127.

Comparison of Genomic DNA Extraction Methods from *Artemisia sphaerocephala* Krasch Seed

KONG Hong, YAN Xun-you, MENG Fan-ping

(College of Life Sciences Langfang Normal University, Langfang, Hebei 065000 China)

Abstract: Comparison test was carried out on three genomic DNA extraction methods from *Artemisia sphaerocephala* Krasch seed. The results showed that SDS-CTAB method was the best one, then SDS method, and CTAB method was not recommended.

Key words: *Artemisia sphaerocephala* Krasch; Genomic DNA; SDS; CTAB; SDS-CTAB