

部分梨品种基因组 DNA 不同提取方法的比较

石蕊

(延边大学农学院园艺系, 吉林龙井 133400)

摘要:以不同梨品种为材料,分别采用改良 CTAB 法、改良 SDS 法、SDS-CTAB 和高盐低 pH 值法对梨基因组 DNA 进行了提取。结果表明:采用改良 CTAB 法在提取各种梨基因组 DNA 过程中表现最好且纯度最高,SDS 法提取的基因组 DNA 产率最高,但纯度较低,高盐低 pH 值法产率和纯度均最低。

关键词:梨;DNA;提取方法

中图分类号:S 661.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2007)04-0203-03

梨属于蔷薇科(Rosaceae)梨属(Pyrus, L.)植物。我国是世界梨属的起源中心之一,蕴藏的梨属种质资源极为丰富,主栽系统有砂梨、白梨、秋子梨和新疆梨等^[1],我国北方主要有秋子梨和白梨系统。从 20 世纪 50 年代开始,我国主要进行了形态学、细胞学、解剖学以及同工酶等方面的研究。但在梨的众多的品种中,存在许多相似的性状很难用形态学等方法区分开,这就为梨品种的鉴定带来了较大的难度^[2]。自 RAPD^[3]、AFLP、SSR 等分子标记技术应用到品种鉴定中以后,为性状近似的品种鉴定打开了新局面。

使用以上技术的前提条件是选用适宜的基因组总 DNA 的提取方法,分离出符合研究目标和要求的高质量 DNA,这样才能更真实地反映品种的特征。另外,由于梨的品种繁多,其所富含的多糖和酚类物质多少也有差异,在 DNA 提取过程中这些物质包围着 DNA,干扰 DNA 的絮状结构,致使 DNA 提取难度变大^[4,5]。因此,探索和筛选高效的基因组总 DNA 的提取方法,就成为利用分子标记技术准确鉴定品种的一个重要因素。现以不同梨品种为材料对改良 CTAB 法、改良 SDS 法、SDS-CTAB 和高盐低 pH 值法四种常用的提取基因组总 DNA 的方法进行了比较研究。以期筛选适合于梨 DNA 的最佳提取方法,满足梨分子生物学的需要。

1 材料与方法

1.1 供试材料

试验所采用的试材为苹果梨、延光梨、红金秋×苹果梨、东宁 5 号大梨、延边小香水、南果梨、延边大香水、红金秋共 8 个品种,依次编号为 1、2、3、4、5、6、7、8,采自

牡丹江农业科学研究所和农学院果树实验场。

1.2 主要试剂与仪器

试剂:2mol/L Tris-HCl(pH8.0),0.5mol/L EDTA(pH8.0),5mol/L NaCl,2%CTAB 提取缓冲液,TE(10mmol/L),20%SDS 缓冲液。此外还有 2%β-巯基乙醇、氯仿、异戊醇、乙醇(70%、95%)、PVP、液氮、异丙醇、乙酸钾、乙酸钠、溴化乙锭、琼脂糖、Rnase 等,以上试剂均购自华美公司北京分公司。

仪器:HERMLE2383 型台式低温离心机,Hitachi U-3010 紫外可见分光光度计,GDS-8000 凝胶成像系统,超低温冰箱(-86℃),酸度计、水浴锅、DYY-Ⅲ型电泳仪及各种规格电泳槽和离心管。

1.3 梨基因组 DNA 的提取

改良 CTAB 法:参照肖军等人的提取方法^[6];改良 SDS 法:参照马兵钢等人的提取方法^[7];SDS-CTAB 提取法:参照刘小勇等人的提取方法^[8];高盐低 pH 值法:参照漆艳香等人提取方法^[9]。

1.4 基因组 DNA 检测

1.4.1 紫外分光光度检测法 根据 OD_{260}/OD_{280} 的比值计算 DNA 原液浓度 C。计算公式 $C(ng/\mu L) = OD_{260} \times 50 \times \text{稀释倍数}$,并根据 $Y = OD_{260} \times 1000 / \text{样品重量}(g)$ 公式计算产率,并对最终结果采用 spss11.5 软件中 Dunca 检验进行差异显著性分析。

1.4.2 琼脂糖凝胶电泳检测 取 5μL DNA 样品,以 0.5×TBE 作电泳缓冲液,在含有 0.5μg/mL 溴化乙锭的 0.7%琼脂糖凝胶上电泳 30min,恒压 60V,用于检测 DNA 质量。

2 结果与分析

2.1 不同提取方法对梨品种基因组 DNA 提取效果的影响

第一作者简介:石蕊(1980-),女,延边大学农学院园艺系,在读硕士。
收稿日期:2007-01-27

采用改良 CTAB 法提取 DNA 的 8 个梨品种在提取缓冲液中流动性好,表现为氯仿中易溶解,氯仿提取后形成很厚的白色沉淀杂质界面,絮状和胶状沉淀,DNA 的颜色纯正,几乎不含色素等物质,TE 中易溶(见表 1)。采用改良 SDS 法提取 DNA 的 8 个梨品种在提取缓冲液中流动性较好,稍粘稠,表现为乙酸钾中易溶解,抽提离心后形成较厚的白色沉淀杂质界面,纤维状和胶状沉淀,DNA 的颜色较白,TE 中较不易溶解。采用 SDS-

CTAB 法提取 DNA 的 8 个梨品种在提取缓冲液中流动性较好,表现为氯仿中易溶解,氯仿提取后形成较厚的白色沉淀杂质界面,絮状和胶状沉淀,DNA 的颜色偏黄,TE 中易溶。采用高盐低 pH 值法提取 DNA 的 8 个梨品种在提取缓冲液中流动性较好,稍粘稠,表现为乙酸钾中易溶解,抽提离心后形成较厚的白色沉淀杂质界面,纤维状和片状沉淀,TE 中较易溶,DNA 的颜色不正。

表 1 改良 CTAB 法提取梨 DNA 过程中表现的差异

样品	2%CTAB	氯仿(24:1)	氯仿抽提后的表现	沉淀效果	DNA 的颜色	TE
苹果梨	流动性好	易溶	蛋白质层较厚	絮状	纯白	易溶
延光梨	流动性好	易溶	蛋白质层厚	絮状	无色	易溶
红*苹 17	流动性好	易溶	蛋白质层厚	絮状	纯白	易溶
东宁 5 号	稍稠	易溶	蛋白质层厚	胶状成团	纯白	易溶
小香水	流动性好	易溶	蛋白质层厚	絮状	无色	易溶
南果梨	流动性好	易溶	蛋白质层厚	絮状	无色	易溶
大香水	流动性好	易溶	蛋白质层厚	絮状	纯白	易溶
红金秋	流动性好	易溶	蛋白质层厚	絮状	泛黄	易溶

表 2 四种提取方法对梨 DNA 产率和纯度的影响

样品	OD _{260/280}				产率(μg/g)			
	改良 CTAB	改良 SDS	SDS-CTAB	高盐低 pH	改良 CTAB	改良 SDS	SDS-CTAB	高盐低 pH
苹果梨	1.77	1.30	1.61	1.12	326.80b	440.60a	258.20c	85.90d
延光梨	1.85	1.42	1.23	1.62	300.10c	410.10a	314.50b	108.20d
红*苹 17	1.83	1.40	1.16	1.09	312.70b	435.50a	311.40c	110.30d
东宁 5 号	1.80	1.69	1.52	1.75	330.90b	426.40a	306.00c	121.40d
小香水	1.76	1.37	1.58	1.11	302.20c	399.30a	306.30b	98.60d
南果梨	1.70	1.62	1.59	1.08	344.20b	406.90a	274.60c	102.40d
大香水	1.57	1.58	1.57	1.38	298.10c	411.70a	315.50b	95.90d
红金秋	1.73	1.74	1.50	1.23	318.50c	432.00a	326.30b	96.80d

2.2 基因组 DNA 检测

2.2.1 紫外分光光度检测 由表 2 可知,四种方法均可以提取梨基因组总 DNA,经紫外分光光度计检测,OD₂₆₀/OD₂₈₀ 均高于 1.3,说明所提取的 DNA 基本没有蛋白质和酚类的污染,但含有一定浓度的 RNA 杂质,少量的 RNA 对 PCR 扩增结果并无显著影响。采用改良 CTAB 法提取的各梨品种基因组总 DNA 的 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 均普遍高于其他方法。延光梨基因组总 DNA 的 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 高达 1.85。分析原因可能是改良 CTAB 法中的氯仿不仅对蛋白质具有变性作用,且与水不相混溶,不会带走基因组 DNA,另外,它是利用 CTAB 裂解细胞,能有效的沉淀多糖。经方差显著性分析,采用改良 SDS 法提取的各梨品种 DNA 产率均普遍显著优于其他方法。苹果梨基因组总 DNA 的产率高达 440.6,分析原因可能是 DNA 沉淀过程中多糖也同时被沉淀下来。DNA 产量高也可能是与叶片经液氮充分冷冻和研磨,组织破碎程度高,残余的核糖核酸酶活性全部被抑制,以及提取步骤有关。SDS-CTAB 法 DNA 的获得率不高,高盐低 pH 值法效果最差。

2.2.2 琼脂糖凝胶电泳检测 从图 1 可以看出,所有的

样品在选用改良 CTAB 法时得到的谱带多、清晰,而其他三种方法也能获得 DNA,但是完整性和产量间存在差异。采用改良 CTAB 法所提取的总 DNA 质量较高,无明显的降解现象,DNA 呈整齐的一条直线,说明这种方法提取的 DNA 完整性较好;改良 SDS 法提取的总 DNA 难以从点样孔跑出来,这有可能与该法提取的 DNA 杂质含量高有关,尤其是多糖,它与 DNA 不可逆的结合极不易分离密切相关。SDS-CTAB 法存在大量的降解片段,DNA 的获得率不高,高盐低 pH 值法在产量和完整性方面均不理想。

3 结果与讨论

3.1 由不同提取方法对梨品种基因组 DNA 提取效果的影响结果可知,采用改良 CTAB 法提取 DNA 的 8 个梨品种在提取缓冲液中流动性好,表现为氯仿中易溶解,氯仿提取后形成很厚的白色沉淀杂质界面,絮状和胶状沉淀,DNA 的颜色纯正,几乎不含色素等物质,TE 中易溶,其次为改良 SDS 法,高盐低 pH 法效果最差。

3.2 由紫外分光光度计检测结果可知,采用改良 CTAB 法提取的各梨品种基因组总 DNA 的 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 均

高于其他方法,经显著性方差分析,采用改良 SDS 法提取的各梨品种 DNA 产率均显著优于其他方法。

3.3 由琼脂糖凝胶电泳检测结果可知,采用改良 CTAB 法所提取的总 DNA 质量较高,提取的 DNA 完整性较

好,其次为改良 SDS 法,SDS-CTAB 法存在大量的降解片段,DNA 的获得率不高;高盐低 pH 值法在产量和完整性方面均不理想。

3.4 改良 CTAB 法提取液中加入适量的 PVP 和 β -疏

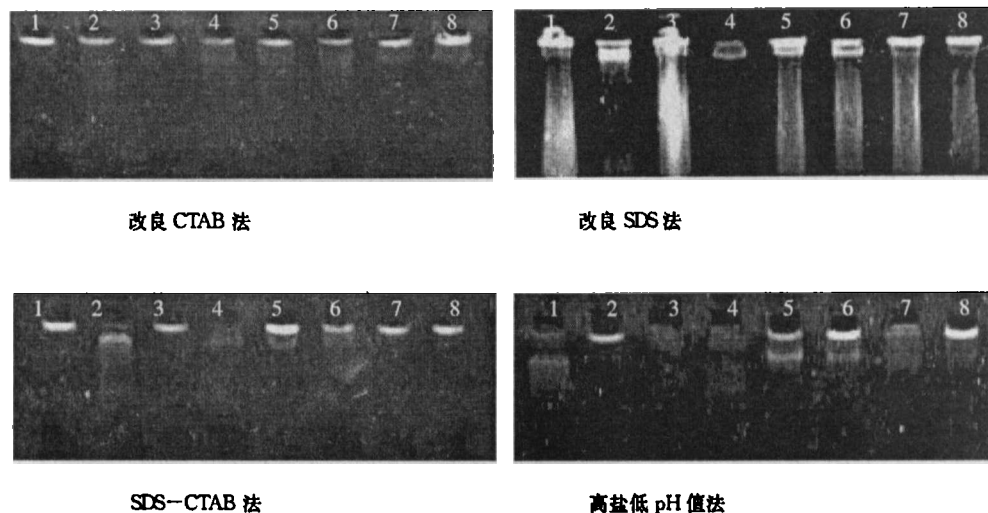


图1 四种方法提取的梨 DNA 电泳图谱

基乙醇可避免酚类化合物的氧化,防止褐变现象的发生,其提取液利用 CTAB 裂解细胞,同时又能有效的沉淀多糖。改良 SDS 法能够提取大量的 DNA,但是纯度较低,所以在供体材料缺少,又对 DNA 纯度要求不高时,可采用改良 SDS 法。试验研究表明,对于我国北方主要梨品种基因组总 DNA 的提取采用改良 CTAB 法最适宜。

参考文献:

- [1] 牛建新,马兵钢,吴忠华.新疆主要梨品种的 RAPD 分析[J].果树学报,2004,21(6):521-525.
- [2] 曲柏宏,金香兰,陈艳秋,等.梨属种质资源的 RAPD 分析[J].园艺学报,2001,28(5):460-462.
- [3] Williams JGK. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are

genetic markers[J]. Nucleic Acids Research,1990,18:6531-6535.

- [4] 曲柏宏,金香兰,陈艳秋,等.梨属 RAPD 分析条件的优化[J].延边大学农学报,2002,24(4):231-234.
- [5] 乌云塔娜,张党权,谭晓凤.梨不同种 DNA 提取方法的效果研究[J].中国生物工程杂志,2003,7:98-101.
- [6] 肖军,杨立国,杨涛,等.两种提取菊花总 DNA 方法的比较[J].辽宁农业科学,2005(1):40-41.
- [7] 马兵钢,赵宗胜,冯建荣.梨属 DNA 提纯方法的比较研究[J].石河子大学学报(自然科学学报),2000,12(4):278-281.
- [8] 刘小勇,田家忠,秦国夫,等.提取植物和微生物 DNA 的 SDS-CTAB 改进法[J].北京林业大学学报,1997,19(3):100-103.
- [9] 梁艳香,谢艺贤,张欣,等.SDS-CTAB 和高盐沉淀法提取香蕉枯萎病菌基因组 DNA 的比较[J].中国生物工程杂志,2005,25(3):49-52.

Comparison of Different Genomic DNA Extraction Methods Among Part of Pears

SHI Rui

(Horticulture Department, Yanbian Agricultural University, Lonjing, JiLin 133400)

Abstract: Different varieties of pears were used to extract genomic DNA of pears by using improved CTAB, improved SDS, SDS-CTAB, high salt-low pH in this experiment. The results showed that improved CTAB method was superior to other methods and the purity reached to the highest; the yield reached to the highest by using SDS method, but the purity was lower; the yield and purity was the lowest by using high salt-low pH method.

Key words: Pear; DNA; Extraction methods