

核桃样本保存时间对 DNA 提取效果的影响

张 丽¹, 周兰英¹, 肖千文¹, 简睐明¹, 吴开志¹

(1. 四川农业大学 林学院园艺学院 四川 雅安 625014; 2. 会理县林业局, 四川 凉山州 615100)

摘 要: 分别对保存 2 a、1 a、4 个月的核桃样品采用核沉淀法提取 DNA, 用核酸蛋白仪检测 DNA 纯度和浓度, 并进行了 DNA 模板的电泳检测。结果表明: 在一定条件下核桃保存时间过长, 其核酸结构易发生改变而降解, 严重影响了 DNA 的提取效果; 但保存 1 a 的核桃样品, DNA 的完整性可与保存 4 个月的相媲美, 效果较好。

关键词: 核桃; DNA 的提取; 保存时间

中图分类号: Q 94-34⁺ 5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2008)01-0194-02

20 世纪 90 年代以来, 基于 PCR 的 RFLP、RAPD、SSR、AFLP 等新的 DNA 指纹技术犹如雨后春笋般层出不穷, 而无论采用哪种分子标记技术, 首要步骤是获得数量足够、质量符合要求的 DNA 样品。核酸虽然在化学性质上不如蛋白质活跃, 但对氧化与水解的变化是脆弱的, Lindahl(1993)指出, 核酸虽然变化速度较慢, 但长期处于不利条件下也不稳定, 其结构会发生破坏^[1]。提取 DNA 的样品应尽量保持新鲜, 使其中的 DNA 维持结构完整与生理活性状态。冷冻干燥是保持组织成分最有效的方式, 因此野外收集新鲜组织最好要有液氮或干冰设备, 至少配备冰壶或冰袋。新鲜样品采好后装入有硅胶的密封塑料袋内, 尽可能快地放在避光的冷环境中^[2]。而干燥组织中的 DNA 的完整性究竟能维持多长时间依植物种群而定^[5]。

1 材料与方法

1.1 材料

选择核桃叶片为试验材料, 每样本取嫩叶 3~5 片, 野外采集用硅胶干燥, 带回实验室后置于一 75℃冰箱中保存。

1.2 主要试剂和设备

DNA 提取试剂: Tris-HCl、NaCl、EDTA (乙二胺四乙酸)、CTAB (溴代十六烷基三甲胺)、PVP (聚乙烯吡咯烷酮)、无水乙醇、TE 缓冲液、β-巯基乙醇、氯仿-异戊醇 (24:1)、液氮。

电泳试剂: 1×TBE (Tris-HCl、硼酸、EDTA) 缓冲液、琼脂糖、染料、溴酚蓝。

主要仪器设备: Eppendorf 5804R 冷冻离心机、北京 DYY 型三恒多用电泳仪、BIO-RAD 凝胶成像系统、Eppendorf Biophotometer 核酸蛋白检测仪、电热恒温水浴锅、移液枪、冰箱、微波炉、高压灭菌锅。

1.3 试验方法

DNA 提取的方法: 核沉淀法, 为克服多糖和多酚类物质等对 DNA 质量的影响, 参照张虎平等^[3,4]人的方法, 并作部分改良。

提取步骤: 称取核桃干叶片 0.2g, 加入 3% 的 PVP, 在液氮中研磨成粉末; ①将粉状物转入 10 mL 的离心管中, 加 4 mL 提取介质 [200 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 50 mmol/L EDTA, 250 mmol/L NaCl] 和 120 μL 的 2% β-巯基乙醇, 在 0℃放置 10 min, 在 4℃下 5 000 r/min 离心 10 min, 收集沉淀; ②在沉淀中加入 65℃的提取介质 II [100 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0)、1.4 mmol/L NaCl、20 mmol/L EDTA、2%CTAB] 5 mL 和 10 μL 的 2%β-巯基乙醇, 并迅速摇匀, 65℃水浴 40 min, 缓慢摇动; ③室温下 5 000 r/min 离心 10 min; 取上清液加入等体积的氯仿/异戊醇 (24:1), 混匀后于 4℃下 5 000 r/min 离心 10 min; ④重复步骤④两次; ⑤取上清液, 加入 2 体积冰冷的乙醇, 混匀后置于一 20℃下 30 min 沉淀核酸; ⑥用枪头挑出絮状物于 1.5 mL 离心管中, 用 70% 的乙醇洗涤 2~3 次, 每次 10 min, 再用无水乙醇洗涤 1 次, 每次 10 min, 自然状态下风干; ⑦加入 200 μL 的 1×TE 溶解 DNA, 一 20℃中保存备用。

2 结果与分析

2.1 DNA 纯度和浓度的测定

从溶解状态的 DNA 中吸取 10 μL, 稀释 10 倍。在核酸蛋白检测仪下测 260 nm 和 280 nm 处的吸光值及浓度。

2.2 DNA 模板的电泳检测

在锥形瓶中配制 1.0% 琼脂糖凝胶 200 mL, 在微波炉中加热沸腾, 冷却至 60℃, 加入 5 μL EB, 将凝胶倒入

第一作者简介: 张丽 (1984), 女, 硕士, E-mail: ZL19840603@163.com.

通讯作者: 周兰英。

基金项目: 四川省林业科技“先导计划”科研资助项目 (03-05)。

收稿日期: 2007-08-22

电泳槽,使其充分凝固;将已溶解的 DNA 模板用移液枪取 10 μ L 加入点样孔;将胶板放入电泳槽中电泳 40 min,电压 5 V/cm,凝胶电泳成像系统照相。

表 1 DNA 纯度和浓度检测

样本标号	采集地	采集时间	A ₂₆₀	A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	浓度/ng/ μ L
S1	石棉县	2005—7—29	0.760	0.367	2.11	24
S4	石棉县	2005—7—29	0.114	0.069	1.61	86
S6	石棉县	2005—8—1	0.236	0.116	2.10	318
S7	石棉县	2005—8—1	0.099	0.055	2.02	101
S9	石棉县	2005—8—1	0.023	0.014	1.81	745
M6	冕宁县	2006—8—8	0.667	0.372	1.88	315
M22	冕宁县	2006—8—11	1.115	0.572	2.01	530
M24	冕宁县	2006—8—11	0.467	0.245	2.00	222
M33	冕宁县	2006—8—16	2.673	1.481	1.82	1327
M46	冕宁县	2006—8—18	0.280	0.142	1.97	140
B8	青白江	2007—3—30	3.105	1.818	1.71	1676
B28	青白江	2007—3—30	0.710	0.364	2.01	690
C5	青白江	2007—3—30	1.026	0.510	2.03	1015
C47	青白江	2007—3—30	0.243	0.123	1.98	243
D7	青白江	2007—3—30	1.290	0.651	1.99	1255

2.3 分析与讨论

经核酸蛋白仪检测发现,保存 2 a 的核桃样品,其 DNA 含量偏低,样品 S1 浓度仅为 24 ng/ μ L;而保存 4 个月的样品 DNA 含量较高,样品 B8 高达 1 676 ng/ μ L。通过上面电泳检测图也可直观地看到,保存 2 a 的样品除 S6 和 S9 有很微弱的条带外,其余样品均无带;而保存 1 a 和 4 个月的样品都跑出了均一而清晰的条带。结果表明:用干燥处理的核桃组织在-75 $^{\circ}$ C冰箱中至少在 1 a 内可保持 DNA 的完整性,其含量和纯度都可和从保存 4 个月的核桃提取的 DNA 相媲美。因此,可将野外干燥处理的核桃材料带回实验室后几个月或更长时间再提 DNA 也无妨,但一定要放在干燥器内,有条件最好放在-75 $^{\circ}$ C冰箱中保存,在深冻条件下可保存更长时间,但一定要密封好以保持干燥。硅胶是十分理想的干燥叶片材料,硅胶与叶片的比例要 10 : 1(w/w),以保证叶片在 12 h 之内干燥。在野外发现硅胶从深蓝色变为粉红色要即时更换,叶片干燥的程度用手指捻时发出劈啪声最好。

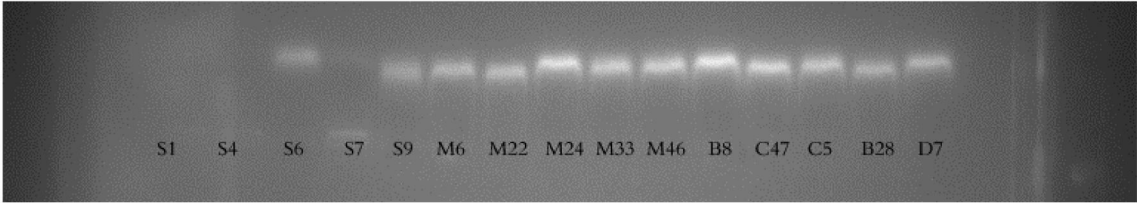


图 1 DNA 电泳检测图

参考文献

[1] 邹喻萍,葛颂,王小东.系统与进化植物学中的分子标记[M].北京:科学出版社,2001.
[2] 邹喻萍,汪小全,雷一丁,等.几种濒危植物及其近缘类群总 DNA 的提取与鉴定[J].植物学报,1994,36(7):528-533.
[3] 张虎平,牛建新,马兵刚,等.核桃 DNA 的提取及 RAPD 体系的优化

[J].石河子大学学报(自然科学版),2003,7(4):267-270.
[4] 张虎平,牛建新,王国安,等.适于核桃基因标记的 DNA 提取方法[J].生物技术,2003,13(5):18-19.
[5] Lee L S, Garnett H M. Estimate of total DNA in crud extracts of plant leaf tissue using 4, 6-diamidino-2-phenylindole(DAPI) fluorometry[J]. Jour Bochem Biophys Meth, 1993, 26(4): 249-260.

Effect of Preserved Time to Extraction of Genomic DNA from Walnuts

ZHANG Li¹, ZHOU Lan-ying¹, XIAO Qian-wen¹, JIAN Lai-ming², WU Kai-zhi¹

(1. Sichuan Agricultural University, Sichuan, Yaan 625014, China; 2. Huili County, Sichuan, Liangshan 615100, China)

Abstract: Nucleus deposition method was used to extraction genomic of DNA from walnuts preserved for two years, one year and four months. Their concentration and purity were measured. The results showed that leaf of walnut could dis-integrate if preserved too long, and the extraction of DNA was affected. While the samples preserved one year can be compared with those preserved four months, both which had a good results.

Key words: Walnut; Extraction of DNA; Preserved time