

扁桃基因组 DNA 的提取

杨 丽, 王玉柱, 孙浩元, 张俊环

(北京市农林科学院 林业果树研究所 北京 100093)

摘要: 通过改良 CTAB 法提取扁桃 4 个品种的基因组 DNA。经检测, 所提样品 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值在 1.68~1.97 之间, 得率为 272~580 μg/mL, SSR-PCR 检测条带清晰, 说明 DNA 质量较高, 完全满足深入的分子生物学研究需要。

关键词: 扁桃; DNA 提取; CTAB 法

中图分类号: S 662.903.6 文献标识码: A 文章编号: 1001-0009(2008)02-0210-02

扁桃与榛子、腰果和开心果并称世界四大干果, 美国、西班牙、意大利等为其主产国。在我国, 扁桃的适生区为新疆的喀什地区^[1]。近年来, 随着人民生活水平的提高, 扁桃在我国的消费量日益增长, 广阔的市场前景、可观的经济效益, 吸引着各方面的关注; 甘肃、陕西、山东、北京等地均开展了扁桃的引种、栽培、组培等方面的研究。随着扁桃产业化进程的推进, 分子生物学的研究必将呈现出蓬勃发展的局面。制备高质量的 DNA 是进行分子标记、构建基因文库、分析亲缘关系等各项分子生物学研究的基础, 现研究改良 CTAB 法, 从扁桃叶片中提取基因组 DNA, 经紫外分光光度计和琼脂糖凝胶电泳检测, 证明所提 DNA 产率和纯度较高, 随机选择桃的 SSR 引物进行 PCR 扩增, 得到了清晰的条带, 说明所提 DNA 完全满足 PCR 扩增需要。

1 材料与方法

1.1 材料

试验材料为山东省果树研究所引自美国的扁桃品种 1 号、2 号、3 号和 4 号。7 月初从泰安采集新梢嫩叶, 连同冰块一起放入冰壶带回实验室, 蒸馏水冲洗干净, 吸水纸充分吸干表面水分, 置 -80℃ 冰箱保存备用。

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取 (1) 称取 1 g 叶片, 放入预冷的研钵中加液氮研碎, 转入 50 mL 离心管中, 加入 10 mL 预热的 CTAB 提取液 (2% CTAB (W/V), 1.4 mol/L NaCl, 100 mmol/L Tris-HCl, 20 mmol/L EDTA, pH 8.0, 1% PVP-40), 同时加入 1% β-巯基乙醇充分震荡混匀, 65℃ 水浴 40~60 min, 不时轻轻摇动; (2) 取出离心管自然冷却至室温, 加入等体积氯仿:异戊醇 (24:1), 10 000

r/min, 4℃ 离心 10 min, 取上清至另一离心管中; (3) 加入 1.5 倍体积预冷 (-20℃) 的无水乙醇, 置 -20℃ 30~60 min, 可见絮状 DNA 沉淀; (4) 挑出沉淀至 1.5 mL 离心管中, 70% 乙醇洗涤 2~3 次, 每次 5 min; 再用无水乙醇洗涤 1~2 次; (5) 自然干燥 DNA, 溶解于 500~700 μL TE (10 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA, pH 8.0) 中; (6) 加入 1/10 体积 RNaseA 降解 RNA, 37℃ 消化 1h; (7) 重复步骤 (2) 1 次, 加入 1/10 体积 5 mol/L NH₄Ac; (8) 重复步骤 (3) 和 (4) 1 次; (9) 待 DNA 自然干燥后, 溶解于 100~300 μL TE 中, -20℃ 长期保存。

1.2.2 DNA 检测 (1) 紫外分光光度计检测: 取 5 μL DNA 样品用 TE 稀释 10 倍, 于 effendorf 紫外分光光度计上检测产率和纯度; (2) 琼脂糖凝胶电泳检测: 将所提 DNA 稀释 20 倍后于 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量, 荧光染色, Alpha 凝胶成像系统观察、拍照; (3) PCR 扩增: 随机选择桃 SSR 引物 pchems 5 和 UPD 98-411 对所提 DNA 进行 PCR 扩增, 扩增所用试剂为北京天来生物公司 PCR 专用扩增试剂 2× Taq Mix, 引物由上海生工生物公司合成。扩增体系参见 2× Taq Mix 使用说明: 12.5 μL 2× Taq Mix, 上、下游引物各 1 μL, DNA 5 ng, ddH₂O 补齐至 25 μL; PCR 反应程序为: 94℃ 预变性 3 min; 94℃ 变性 45 s, 55℃ 退火 30 s, 72℃ 复性 45 s, 35 个循环; 72℃ 延伸 8 min。扩增产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳, 荧光染色, Alpha 凝胶成像系统观察、拍照。

2 结果与分析

分光光度计检测结果 (见表 1) 表明: 运用改良 CTAB 法制备的扁桃 DNA 产率和纯度较高, 其中 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值为 1.68~1.97 之间, 说明蛋白质、多糖、酚和醌类物质去除干净, RNA 降解较完全, 其中 1、2 两品种 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值稍高, 说明存在一定的 RNA 污染, 可通过添加 RNaseA 进一步纯化; 各品种 DNA 产率在 272~580 μg/mL 之间, 均较高。

第一作者简介: 杨丽 (1974), 女, 农艺师, 从事李、杏资源收集与新品种选育相关工作。E-mail: yangli186@yahoo.com.cn

通讯作者: 王玉柱

收稿日期: 2007-09-21

表 1 DNA 产率与纯度检测

| 品种编号 | OD _{260nm} | OD _{280nm} | OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀ | 产率/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ |
|------|---------------------|---------------------|--------------------------------------|--|
| 1 | 0.554 | 0.276 | 1.97 | 272.0 |
| 2 | 1.160 | 0.610 | 1.90 | 579.9 |
| 3 | 0.730 | 0.436 | 1.68 | 365.0 |
| 4 | 0.889 | 0.490 | 1.81 | 444.5 |

所有样品琼脂糖凝胶电泳条带清晰整齐,无拖尾现象,点样孔干净(见图片 1),证明所提 DNA 片段完整,杂质去除完全。

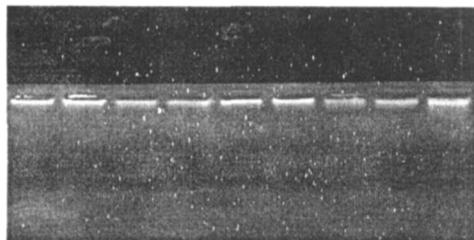


图 1 改良 CTAB 法提取的扁桃 DNA 电泳结果

注: 1~4 泳道分别为扁桃品种 1 号、2 号、3 号、4 号, 5~8 泳道为 1~4 的重复, M 为 maker, DL 3 000 bp。

所有样品经 2 对 SSR 引物进行 PCR 扩增, 琼脂糖凝胶电泳检测, 条带清晰, 片段大小为 100~300 bp(见图片 2), 证明所提 DNA 完全满足 PCR 扩增要求, 可用于深入的分子生物学试验研究。



图 2 SSR-PCR 电泳检测结果

注: M 为 maker, 1~4 为引物 pchcms5 扩增的扁桃 1~4 号品种产物, 6~9 泳道为引物 UPD98-411 扩增的扁桃 1~4 号品种产物。

3 讨论

作为经典的植物 DNA 提取方法, CTAB 法被广泛应用于实践^[2-5], 并针对不同的植物材料进行了各种改

良。据报道, 当提取液中有 CTAB 存在时, 将提取液中的 NaCl 浓度提高至 1.4 mol/L 可去除多糖^[2]; PVP 能络合多酚物质, 防止多酚物质氧化引起 DNA 褐变; β -巯基乙醇可降解蛋白质, 并抑制氧化酶的活性。扁桃叶片中含有大量的多糖、蛋白质、酚类等次生物质, 该研究综合借鉴了前人的研究成果: 在提取液中加入了 1.4 mol/L NaCl、1% PVP 40 和 1% β -巯基乙醇, 检测结果表明次生物质去除较完全; 用氯仿: 异戊醇(24:1)代替苯酚抽提, 降低了苯酚残存对 DNA 质量的影响, 避免了苯酚对人体的危害; 用 -20℃ 预冷的无水乙醇代替异丙醇沉淀 DNA, 降低了成本, 提高了方便性。整个试验过程所用试剂种类少, 操作简便, 效率高, 利用该方法提取到了高质量的扁桃 DNA。

另外, 充分研磨是提取过程中十分关键的一步, 对于最终 DNA 的产率和纯度具有十分重要的影响, 纯化 DNA 时, RNaseA 的量可视产物多少适当调整, 以免 RNA 降解不充分, 研究中 1、2 两品种如果将 RNaseA 增加 0.1%, OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值定会达到更加理想的水平; 添加 PVP40 和 β -巯基乙醇的量不宜过高, 一方面避免浪费, 一方面避免其去除不净而影响后续操作。

参考文献

- [1] 潘晓云, 王根轩, 曹汝义. 扁桃在我国的适宜气候生态引种区研究[J]. 生态学报, 2000, 20(6): 1069-1075.
- [2] 彭学贤. 植物分子生物技术应用手册[M]. 北京: 化学工业出版社, 2006.
- [3] 刘卫国, 易干军, 张秋明, 等. 菠萝 DNA 的提取及 AFLP 反应体系的建立[J]. 果树学报, 2006, 23(1): 51-54.
- [4] 陈昆松, 李方, 徐昌杰, 等. 改良 CTAB 法用于多年生植物组织基因组 DNA 的大量提取[J]. 遗传, 2004, 26(4): 529-531.
- [5] 梁雪莲, 郑奕雄, 陈晓玲, 等. 花生 DNA 提取方法比较[J]. 生物技术, 2007, 17(1): 41-44.
- [6] 毛娟, 赵长增, 赵丽娟, 等. 扁桃基因组 DNA 提取及 RAPD 扩增体系的建立[J]. 甘肃农业大学学报, 2005, 40(1): 17-21.
- [7] 徐宝利, 毛娟, 丁永胜, 等. 核果类果树基因组 DNA 提取方法的研究[J]. 甘肃农业大学学报, 2006, 41(6): 43-48.
- [8] 程运江, 伊华林, 庞晓明, 等. 几种木本果树 DNA 的有效提取[J]. 华中农业大学学报, 2001, 20(5): 481-483.

(致谢: 感谢山东果树所张文越老师提供的实验材料)

Extraction of Almond Genomic DNA

YANG Li, WANG Yu-zhu, SUN Hao-yuan, ZHANG Jun-huan

(Institute of Forestry & Pomology, Beijing Academy of Agriculture & Forestry Sciences Beijing 100093 China)

Abstract: The genomic DNA samples of 4 almond cultivars were isolated by modified CTAB method. The results showed that the ratio of OD₂₆₀/OD₂₈₀ between 1.68~1.97, yield between 272~580 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Through the SSR-PCR amplification, the extracted DNA had a good quality for deeply molecular biology study.

Key words: Almond; DNA extraction; CTAB method