

茴香总 DNA 提取方法的比较研究

李海渤

(广东韶关学院 英东生物工程学院, 广东 韶关 512005)

摘要:以茴香为研究材料,分别采用高盐低 pH 法、尿素法、CTAB 法、SDS 法、PVP 法和 CTAB—SDS 结合法等 6 种不同方法提取总 DNA,结果表明:SDS 法为提取茴香总 DNA 的最佳途径。

关键词:茴香;总 DNA;提取方法;比较研究

中图分类号:Q 503 **文献标识码:**A **文章编号:**1001—0009(2008)03—0189—04

茴香(*Foeniculum vulgare* Mill.)为伞形科茴香属多年生宿根草本植物,原产地中海沿岸及西亚,在我国北方各地广泛栽培。茴香的茎、叶、种子都含有挥发油,其主要成分为茴香醚及茴香酮,具有特殊的香味。我国北方主要把茴香作调味品或馅食。其果实可作香料及药用,有温肝肾、暖胃气、散寒结的作用^[1]。

目前,对于茴香的研究多集中在生物学特性、栽培方式以及化学成分等方面,要开展其分子水平上的相关研究,必须首先获取高质量的 DNA。提取及纯化植物 DNA 方法已经比较成熟^[2],就某一具体植物而言,不同的 DNA 提取方法其 DNA 产量和质量也各不相同。该试验选取高盐低 pH 法、尿素法、CTAB 法、SDS 法、PVP 法和 CTAB—SDS 结合法等 6 种方法提取茴香总 DNA,以期找出一种适用于提取茴香总 DNA 的最佳途径。

1 材料与方法

1.1 供试材料

甘肃茴香由广东韶关学院英东生物工程学院提供。

1.2 试剂

三羟甲基氨基甲烷(Tris)、重蒸酚、溴化乙锭(EB)、RNase A、琼脂糖(Agarose)、λDNA Marker(EcoRI+HindIII)、单核苷酸(dNTPs)、Taq DNA 聚合酶等由北京鼎国生物技术有限责任公司提供。异丙醇、无水乙醇、三氯甲烷、异戊醇、EDTA、氯化钠、蔗糖、溴酚蓝等为国产分析纯试剂。

1.3 试剂配方

高盐低 pH 法提取缓冲液:100 mmol/L NaAc; 50 mmol/L EDTA; 500 mmol/L NaCl; 2.5% PVP; 10 mmol/L β-ME; 调节 pH 至 5.5。尿素法提取缓冲

液:8 mmol/L 尿素; 0.5 mol/L NaCl; 50 mmol/L Tris (pH 8.0); 20 mmol/L EDTA; 10 mmol/L β-ME; 2% PVP。CTAB 法提取缓冲液:50 mmol/L Tris (pH 8.0); 0.7 mol/L NaCl; 10 mmol/L EDTA (pH 8.0); 20 mmol/L β-ME; 1% CTAB。SDS 法提取缓冲液:500 mmol/L NaCl; 500 mmol/L Tris (pH 8.0); 50 mmol/L EDTA (pH 8.0); 10 mmol/L β-ME。PVP 法提取缓冲液:250 mmol/L NaCl; 25 mmol/L EDTA; 0.5% SDS; 20 mmol/L Tris (pH 8.0)。CTAB—SDS 结合法提取缓冲液:100 mmol/L Tris (pH 8.0); 50 mmol/L EDTA (pH 8.0); 1.0 mol/L NaCl; 2% SDS; 2% PVP; 20 mmol/L β-ME。高盐 TE 缓冲液:1.0 mol/L NaCl; 10 mmol/L Tris (pH 8.0); 1 mmol/L EDTA (pH 8.0)。TE 缓冲液:10 mmol/L Tris (pH 8.0); 1 mmol/L EDTA (pH 8.0)。2×CTAB 提取液:100 mmol/L Tris (pH 8.0); 20 mmol/L EDTA (pH 8.0); 1.4 mol/L NaCl; 2% CTAB。高盐溶液:0.8 mol/L 柠檬酸钠; 1.2 mol/L NaCl。

1.4 仪器

DYCP-32 型电泳槽(北京市六一仪器厂); DYY-7 型转移电泳仪(北京市六一仪器厂); Tan'—nonUV-2000 紫外分析仪; UV300 紫外分光光度计; Anke TGL-6G 型高速冷冻离心机; LDZX-40I 型立式自控电热压力蒸汽灭菌器(上海申安医疗器械厂); HH-S28S 恒温水浴锅(金坛市大地自动化仪器厂金坛市环保仪器厂)。

1.5 方法

1.5.1 提取方法 高盐低 pH 法:由 Murray M G, Thompson W F 提出经邹喻华等^[3]修改的方法修改而来。取 2 g 新鲜样品,加入液氮研磨成粉末,加入 3 mL 高盐低 pH 法提取缓冲液,65℃水浴 1 h。加入 2/3 体积 2.5 mol/L KAc, 4℃放置 15 min。4℃, 10 000 r/min 离心 10 min, 取上清液。加入等体积的 Tris 酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)轻轻混合。4℃, 13 000 r/min 离心

作者简介:李海渤(1973),男,河北唐山人,讲师,主要从事植物遗传育种研究。

收稿日期:2007-09-21

15 min, 取上清液。加入等体积氯仿 : 异戊醇(24 : 1)轻轻混合。4℃, 13 000 r/min 离心 15 min, 取上清液, 加入等体积预冷异丙醇, 于-20℃放置 30 min。13 000 r/min 离心 15 min, 去上清, 沉淀用 70%乙醇洗 2 次, 去乙醇后自然干燥。加入 1 mL TE 溶解, 20 μ L RNase 37℃水浴 30 min。加入 2 \times 预冷乙醇于-20℃放置 30 min, 4℃, 13 000 r/min 离心 15 min, 去上清液, 将沉淀自然干燥后加入 1 mL 无菌水, 4℃保存备用。

尿素法: 参照 Tan 等^[4] 的方法加以改进。取 2 g 新鲜样品, 加入液氮研磨成粉末, 加入 3 mL 尿素法提取缓冲液, 65℃水浴 1 h。加入 1/5 体积的 7.5 mol/L NH₄Ac, 冰浴加热 30 min。4℃, 10 000 r/min 离心 10 min, 取上清液。加入等体积的 Tris 酚 : 氯仿 : 异戊醇(25 : 24 : 1)轻轻混合。4℃, 13 000 r/min 离心 15 min, 取上清液。加入等体积氯仿 : 异戊醇(24 : 1)轻轻混合。4℃, 13 000 r/min 离心 15 min, 取上清液。加入等体积预冷异丙醇, 轻混后于-20℃放置 1 h。13 000 r/min 离心 15 min, 取上清液, 沉淀用 70%乙醇洗 2 次, 去乙醇后自然干燥。加入 1 mL 高盐 TE 溶解, 20 μ L RNase 37℃水浴 30 min。加入 2 \times 预冷乙醇于-20℃放置 30 min, 4℃, 13 000 r/min 离心 15 min, 取上清液, 将沉淀自然干燥后加入 1 mL 无菌水, 4℃保存备用。

CTAB 法: 由 Murray 等^[5] 的方法修改而来。取 2 g 新鲜样品, 加入液氮研磨成粉末, 加入 3 mL CTAB 法提取缓冲液, 65℃水浴 1 h。4℃, 10 000 r/min 离心 10 min, 取上清液。加入等体积的 Tris 酚 : 氯仿 : 异戊醇(25 : 24 : 1)轻轻混合。4℃, 13 000 r/min 离心 15 min, 取上清液。加入等体积氯仿 : 异戊醇(24 : 1)轻轻混合。4℃, 13 000 r/min 离心 15 min, 取上清。加入等体积预冷异丙醇, 于-20℃放置 1 h。挑出 DNA 后用 70%乙醇洗 2 次, 去乙醇后自然干燥。加入 1 mL 高盐 TE 溶解, 20 μ L RNase 37℃水浴 30 min。加入 2 \times 预冷乙醇及 1/10 体积 3 mol/L NaAc, 于-20℃放置 30 min。去乙醇, 将 DNA 自然干燥后加入 1 mL 无菌水, 4℃保存备用。

SDS 法: 参照傅荣昭等^[6] 的方法, 稍加改动。取 2 g 新鲜样品, 加入液氮研磨成粉末, 加入 3 mL SDS 法提取缓冲液, 1/5 体积 10%SDS, 65℃水浴 1 h。加入 1/3 体积 2.5 mol/L KAc, 冰浴 30 min。4℃, 10 000 r/min 离心 10 min, 取上清液。加入等体积的 Tris 酚 : 氯仿 : 异戊醇(25 : 24 : 1)轻轻混合。4℃, 13 000 r/min 离心 15 min, 取上清液。加入等体积氯仿 : 异戊醇(24 : 1)轻轻混合。4℃, 13 000 r/min 离心 15 min, 取上清液。加入等体积预冷异丙醇, 轻混后于-20℃放置 1 h。13 000 r/min 离心 15 min, 取上清液, 沉淀用 70%乙醇洗 2 次, 去乙醇后自然干燥。加入 1 mL TE 溶解, 20 μ L

RNase 37℃水浴 30 min。加入 2 \times 预冷乙醇于-20℃放置 30 min, 4℃, 13 000 r/min 离心 15 min, 取上清液, 将沉淀自然干燥后加入 1 mL 无菌水, 4℃保存备用。

PVP 法: 参照杜道林等^[7] 的方法并稍加改动。取 2 g 新鲜样品, 加入液氮研磨成粉末, 加入 3 mL PVP 法提取缓冲液, 混均后置室温 1 h。加 PVP 至终浓度为 6%, 混均后加入 1/2 体积 7.5 mol/L NH₄Ac, 冰浴 30 min。4℃, 10 000 r/min 离心 10 min, 取上清液。加入等体积的 Tris 酚 : 氯仿 : 异戊醇(25 : 24 : 1)轻轻混合。4℃, 13 000 r/min 离心 15 min, 取上清液。加入等体积预冷异丙醇, 轻混后于-20℃放置 30 min。13 000 r/min 离心 15 min, 取上清液, 沉淀用 70%乙醇洗两次, 去乙醇后自然干燥。加入 1 mL TE 溶解, 20 μ L RNase 37℃水浴 30 min。加入 2 \times 预冷乙醇于-20℃放置 30 min, 4℃, 13 000 r/min 离心 15 min, 取上清液, 将沉淀自然干燥后加入 1 mL 无菌水, 4℃保存备用。

PVP-SDS 结合法: 参照孙鑫等^[8] 的方法并进行了改动。取 2 g 新鲜样品, 加入 500 μ L 3%PVP 及少量抗坏血酸钠, 同时加入液氮研磨成粉末。加入 3 mL PVP-SDS 结合法提取缓冲液, 65℃水浴 1 h。加入 1/3 体积 5 mol/L KAc, 冰浴 30 min。4℃, 10 000 r/min 离心 10 min, 取上清液。加入 1/2 体积 2 \times CTAB 提取液, 充分混均, 65℃下 20 min。加入等体积的 Tris 酚 : 氯仿 : 异戊醇(25 : 24 : 1)轻轻混合。4℃, 13 000 r/min 离心 15 min, 取上清液。加入等体积氯仿 : 异戊醇(24 : 1)轻轻混合。4℃, 13 000 r/min 离心 15 min, 取上清液。加入 1 mL 预冷异丙醇和 1 mL 高盐 TE 混合液, 轻混后于-20℃放置 1 h。13 000 r/min 离心 15 min, 去上清, 沉淀用 70%乙醇洗 2 次, 去乙醇后自然干燥。加入 1 mL TE 溶解, 20 μ L RNase 37℃水浴 30 min。加入 300 μ L 3 mol/L NaAc 和 2 mL 无水乙醇, -20℃放置 10 min。4℃, 13 000 r/min 离心 15 min, 取上清液, 70%乙醇洗 1 次, 将沉淀自然干燥后加入 1 mL 无菌水, 4℃保存备用。

1.5.2 DNA 样品的紫外消光值检测 取上述方法提取的各 DNA 样品 60 μ L, 用灭菌水稀释 50 倍至 3 mL, 分别测定其 A₂₃₀、A₂₆₀ 和 A₂₈₀ 的光吸收值, 根据 DNA 浓度 (μ g/mL) = 50 \times OD₂₆₀ \times 稀释倍数, 确定根据所测得的浓度, 进而确定每克鲜样 DNA 产率。

纯 DNA 样品 A₂₆₀/A₂₈₀ 紫外消光值应为 1.8 如果 A₂₆₀/A₂₈₀ 值大于 1.9, 表明有 RNA 污染, 小于 1.6, 表明样品中存在蛋白质或酚污染。A₂₆₀/A₂₃₀ 值应大于 2.0 如果 A₂₆₀/A₂₃₀ 值小于 2.0, 表明溶液中有残存盐和小分子杂质, 如核苷酸、氨基酸、酚等。

1.5.3 琼脂糖凝胶电泳检测 分别取 20 μ L DNA 样品,在 1%琼脂糖(含 0.5 μ g/mL 溴化乙锭)凝胶中,以 1 \times TAE [由 50 \times TAE (242 g Tris; 57.1 mL 冰醋酸; 100 mL 0.5 mol/L EDTA, pH 8.0; 加双蒸水至 1 L)稀释而成] 为缓冲液,3~4 V/cm 电压下电泳,比较各种方法的 DNA 提取质量。在 Tan—nonUV—2000 紫外分析仪上观察并拍照。

2 结果与分析

2.1 紫外消光值检测

从各种方法提取的 DNA 样品紫外消光值(见表 1)可知,高盐低 pH 法及 CTAB 法提取 DNA 产率最低分别为 90 μ g/g 和 71.25 μ g/g,尿素法、PVP 法及 PVP—SDS 结合法 DNA 产率中等,分别为 191.25、126.25、

155 μ g/g, DNA 产率最高的是 SDS 提取法,其产率为 418.75 μ g/g。从所得 DNA 纯度来看,各种 DNA 提取方法中 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 均接近 1.8,说明 RNA 去除比较彻底。各种 DNA 提取方法中,高盐低 pH 法及尿素法 OD₂₆₀/OD₂₃₀ 远低于 2.0,说明小分子杂质含量较高,CTAB 法和 PVP 法 OD₂₆₀/OD₂₃₀ 较接近,均为 1.9 左右,说明含少量的小分子杂质;而 SDS 法和 PVP—SDS 结合法 OD₂₆₀/OD₂₃₀ 均接近于 2.0,分别为 2.024 和 1.997,说明小分子杂质含量很少。从几个方面综合考虑,SDS 法不仅产率高而且操作步骤简易,最适合于茴香总 DNA 的提取。

2.2 琼脂糖凝胶电泳检测

表 1 紫外分光光度法检测提取茴香总 DNA 纯度比较

项目	高盐低 pH 法	尿素法	CTAB 法	SDS 法	PVP 法	PVP—SDS 结合法
OD ₂₃₀	0.049	0.097	0.030	0.166	0.053	0.062
OD ₂₆₀	0.072	0.153	0.057	0.335	0.101	0.124
OD ₂₈₀	0.040	0.087	0.088	0.187	0.055	0.071
OD ₂₆₀ /OD ₂₃₀	1.472	1.578	1.896	2.024	1.897	1.997
OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀	1.80	1.758	1.744	1.791	1.830	1.751
DNA 产率/ μ g \cdot g ⁻¹	90	191.25	71.25	418.75	126.25	155
片段长度/bp	无	21 227	无	23 282	21 227	23 282

DNA 提取途径具有重要意义。结果表明,6 种 DNA 提取方法中,SDS 法 DNA 产率为 418.75 μ g/g,片段长度为 23 282 bp,该方法为提取茴香总 DNA 的最佳途径。

参考文献

[1] 刘孟军. 苹果属植物 RAPD 分析的影响因素及其稳定性研究[J]. 河北农业大学学报, 1998, 21(4): 48-53.

[2] 陈钧辉. 生物化学实验[M]. 3 版. 北京: 科学出版社, 2003.

[3] 王淑珍, 白晨, 范俊, 等. 灵芝与糙皮侧耳原生质体融合子基因组 RAPD 分析[EB/OL]. 上海农业网, 2003.

[4] 宋元林, 张君亭, 陈永辉. 稀特蔬菜高效栽培[M]. 2 版. 北京: 中国农业出版社, 2001: 250-250.

[5] 张宁, 王凤山. DNA 提取方法进展[J]. 中国海洋药物, 2004(2): 40-47.

[6] 邹喻苹, 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.

[7] Tan S L, Dossett M, Katze M G. Extraction of genomic DNA suitable for PCR analysis from dried plant rhizomes/ roots[J]. Biotech, 1998, 25(5): 796-801.

[8] Clark M S. 植物分子生物学实验手册[M]. 顾红雅, 瞿礼嘉, 等译. 北京: 高等教育出版社, 1998: 5.

[9] 傅荣昭, 孙勇如, 贾士荣. 植物遗传转化技术手册[M]. 北京: 中国科学技术出版社, 1994.

[10] 杜道林, 马文儒, 苏杰, 等. SDS, CTAB 和 PVP 法提取香蕉基因组 DNA 的比较研究[J]. 海南师范学院学报(自然科学版), 2003, 16(1): 74-80.

[11] 孙鑫, 崔洪志, 胡宝忠, 等. SDS-CTAB 结合法提取棉花总 DNA[J]. 生物技术通报, 2004(5): 45-47.

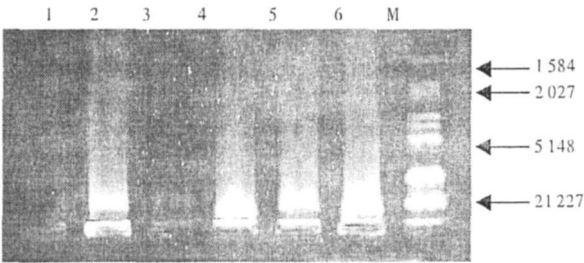


图 1 DNA 不同提取方法凝胶电泳检测

注: 1. 高盐低 pH 法; 2. 尿素法; 3. CTAB 法; 4. SDS 法; 5. PVP 法 6. PVP—SDS 结合法 M Marker。

从 6 种方法提取 DNA 的琼脂糖电泳凝胶成像照片(图 1)可见, 高盐低 pH 法及 CTAB 法提取 DNA 产量很低, 无明显特征带, 符合紫外消光检测结果; 尿素法及 PVP 法提取 DNA 有明显特征带, 但产量比 SDS 法和 PVP—SDS 结合法产量低; SDS 法与 PVP—SDS 结合法相比, SDS 法提取的 DNA 片段大小较均一, 另外其片段大于尿素法及 PVP 法所得 DNA。

3 结论

获得高质量的 DNA 样品是对研究材料进行分子生物学研究的关键性步骤, 探索适合某种特定研究材料的

桔梗种质资源间组织培养特性的差异性研究

李美善, 吴京姬, 吴基日

(延边大学 农学院农学系, 吉林 龙井 133400)

摘要: 研究用 $N_6 + NAA 0.5 \text{ mg/L} + 6-BA 1.0 \text{ mg/L}$ 培养基, 接来自中国各地、朝鲜、韩国、日本等地的 25 份桔梗种质资源的无菌苗的叶片, 比较桔梗种质资源间组织培养特性的差异。结果表明: 从接种的叶片中分化出小苗的百分率变化范围在 42%~90%, 多数分布在 61%~90%, 培养物的鲜重、干重及干重/鲜重比也一定程度上反映种质资源间的差异。

关键词: 桔梗; 组织培养特性; 种质资源间差异

中图分类号: S 567.23⁺9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2008)03-0192-03

桔梗(*Platycodon grandiflorum* (Jacq.) A. DC)为桔梗科桔梗属植物, 别名铃铛花, 包袱花, 道拉基(朝鲜语), 和尚帽等。其根为著名的中药材, 具有宣肺、祛痰、散寒、镇咳、消肿、排脓等功效^[1]。桔梗根还可以制成美味的菜肴, 在中国东北地区及日本、韩国、朝鲜等东亚国家是常用蔬菜之一。此外, 日本学者还将桔梗的提取物用于化妆品和浴液中^[2]。

近年来, 一些学者对桔梗的组织培养作了大量研究^[3-7], 但组织培养效率的报道有所不同。作者认为, 桔梗组织培养效率的这些差异除了所用的培养基、激素种

类和水平、所接的外置体、培养条件等差异外, 还有可能与所用材料的不同有关。研究采用中国各地、朝鲜、韩国、日本等地收集到的 25 份不同来源的桔梗种质资源为试材, 探讨桔梗种质资源间组织培养特性的差异, 旨在为桔梗组织培养提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

来自中国各地、朝鲜、韩国、日本的 25 份桔梗种质资源(详见表 1)。

1.2 试验方法

1.2.1 培养基 试验用桔梗组织培养中经胚状体的诱导直接分化成小苗的培养基^[8-9], 其具体配方为: $N_6 + NAA 0.5 \text{ mg/L} + 6-BA 1.0 \text{ mg/L}$ 。培养基配制后加琼脂粉 9.0 g/L、蔗糖 50.0 g/L, pH 调为 5.8。培养基注入 50 mL 三角瓶, 每瓶注入 20 mL, 瓶口用锡箔纸封盖, 在 121℃条件下灭菌 15 min 备用。

第一作者简介: 李美善(1964), 女, 实验师, 主要研究方向为中草药遗传育种。

通讯作者: 吴基日。E-mail: wujiri@yahoo.com.cn.

基金项目: 吉林省科技厅资助项目(20040553), 延边大学重点课题资助项目[延大科合字(03)第 07 号]。

收稿日期: 2008-01-08

Comparative Study of Methods in Isolation Total DNA From *Foeniculum vulgare* Mill.

LI Hai-bo

(Yingdong College of Bioengineering, Shaoguan University, Shaoguan, Guangdong 512005)

Abstract: The total DNA was isolated from *Foeniculum vulgare* Mill. with methods of low pH medium with high salt method, urea method, CTAB method, SDS method, PVP method, and CTAB-SDS method etc. The results showed that the method of SDS was best method of extracting DNA.

Key words: *Foeniculum vulgare* Mill.; Total DNA; Isolating methods; Comparative study