

# CTAB 法高效提取苹果叶片 DNA 的研究

李 春 霞, 李 宏 飞

(延安职业技术学院, 陕西 延安 716000)

**摘 要:** 为研究 CTAB 法在正常条件和逆境条件下, 从富含多酚和多糖等多种次生代谢物质的苹果树叶片中分离出高质量的基因组 DNA, 以抗旱能力较强的八棱海棠 (*Malus micromalus* Rehd.) 和抗旱性较弱的平邑甜茶 (*Malus hupehensis* pamp Rehd.) 幼苗为试验材料。用 20% 聚乙二醇 (polyethylene glycol, PEG6000) 模拟干旱, 采取 CTAB 提取缓冲液, 按一定比例加入 PVP 和  $\beta$ -巯基乙醇, 用 Tris 平衡酚-氯仿-异戊醇除去蛋白质及杂质, 在粗提时用异丙醇沉淀 DNA, 并用 DNA 洗液 (10 mmol/L 醋酸铵, 75% 乙醇) 洗涤 DNA, 在纯化时用乙醇沉淀 DNA, 且没有加入 RNase 去除 RNA 的方法, 分别提取 2 个品种正常和干旱胁迫的苹果属叶片总 DNA, 并对提取的 DNA 进行琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测。结果表明: 此方法可有效去除次生物质对 DNA 的干扰, 得到高质量、特征带形清晰的大量 DNA。并就提取过程中遇到的问题, 提出了相应的解决办法。

**关键词:** CTAB 法; 苹果叶片; DNA 提取

**中图分类号:** Q 946.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2009)02-0049-04

苹果作为世界主要树种之一, 国内外已经开展了大量分子生物学的研究, 而生物技术研究的基础是高质量的苹果 DNA 提取。但苹果是多年生木本植物, 叶片中含有大量的多糖、蛋白质及多酚类物质, 而 CTAB 是一种阳离子去污剂<sup>[1-3]</sup>, 既能裂解细胞, 又能有效地沉淀次生代谢物, 尤其是多糖。为研究 CTAB 法高效提取苹果叶片基因组 DNA 的方法, 通过查阅大量有关 DNA 提取文献和根据自己的试验, 对 CTAB 法提取苹果 DNA 基本原理进行了总结, 并提出操作中注意事项。

## 1 试验材料

### 1.1 试验材料

以抗旱性较强的八棱海棠 (*Malus micromalus* Rehd.) 和抗旱性较弱的平邑甜茶 (*Malus hupehensis* pamp Rehd.) 的 1 a 生实生幼苗为试材。用营养液水培法培养苗木。

### 1.2 试验处理

当苗长到 13~14 片真叶时开始干旱处理, 选择大小一致的幼苗, 每个品种将选择好的幼苗分成 2 份, 每份 50 株, 一份在正常营养液中培养作为对照; 另一份移入含有 20% PEG 6000 的营养液中进行干旱处理, 从处理开始起, 每 24 h 取样测定 1 次, 直到植株完全死亡为

止, 每个处理随机取样 DNA 测定值为 3 次重复的平均值。

## 2 试剂及仪器

### 2.1 提取 DNA 的试剂

2%CTAB 分离缓冲液: 2%CTAB, 0.1 mol Tris-HCl, 20 mmol EDTA, 1.4 mol/L NaCl, pH 8.0, 附加 0.2% $\beta$ -巯基乙醇和 1%PVP, 现配现用; DNA 洗液 (10 mmol/L 醋酸铵, 75% 乙醇); TE 溶液 (10 mmol/L Tris-Cl, 1 mmol/L EDTA, pH 8.0); Tris 平衡酚: 氯仿: 异戊醇 (25:24:1, 现配现用); 氯仿: 异戊醇 (24:1) 现配现用; 无水异丙醇; 无水乙醇; 75% 乙醇; 3 mol/L NaAc (pH 6.8); 液氮。

### 2.2 检测 DNA 的试剂

1.5% 琼脂糖凝胶; 0.5 $\times$  TBE 电泳缓冲液; gold-view; 10 $\times$  loading Buffer。

### 2.3 仪器

电泳仪; 电泳槽; 冷冻离心机; 凝胶成像系统; 微波炉; 微量加样器; 水浴锅; 低温冰箱; 电子天平。

## 3 方法

### 3.1 DNA 提取和纯化

3.1.1 DNA 的粗提 取样品叶片, 立即置于放有冰袋的冰盒中带回实验室, 先用自来水洗净, 再用去离子水冲洗, 用滤纸吸干水分后去掉主叶脉。称取 1.0 g 样品叶片放于预冷的研钵中, 倒入液氮, 快速将叶片研碎, 用洁净的金属小匙, 将研磨得到的粉末迅速转入以 4 mL/g

第一作者简介: 李春霞 (1971-), 女, 陕西延安人, 硕士, 讲师, 主要从事果树栽培生理方面的研究工作。E-mail: chunxia74008@163.com.  
收稿日期: 2008-10-20

的比例加入 CTAB 提取缓冲液的 50 mL 离心管(灭菌)中, 尽快轻轻旋转使之混匀, 在 65℃ 水浴中保温 0.5~1 h, 注意水浴锅中水不能太少。在此期间定时慢慢旋转离心管使之混匀反应充分。取出试管, 冷却至室温后, 向试管加入等体积氯仿/异戊醇颠倒混匀(轻柔), 0℃, 10 000 rpm 离心 15 min, 收集水相于一离心管中, 弃去中层的细胞碎片和变性蛋白以及下层的氯仿。根据需要, 上清液可用氯仿/异戊醇反复提取多次。收集上层清液, 并将其转入另一离心管中, 沿管壁慢慢加入等体积

异丙醇(或预冷 2 倍体积 95%乙醇), 轻轻混匀, 边加边观察, 可看到纤维状的沉淀(主要是 DNA), 小心混匀试剂, 室温静置 30 min, 在 10 000 rpm 低温离心 3 min, 管底出现白色沉淀为 DNA, 弃上清液。将 DNA 沉淀在 DNA 洗液中浸泡 10 min(或加入 2 mL 70%乙醇), 倾去洗液, 室温干燥 20 min, 即为 DNA 粗制品。向 DNA 粗制品中加入 250  $\mu$ L 或 0.5 mL 或 1.0 mL TE。在 50℃ 水浴保温 10 min, 使其完全溶解。

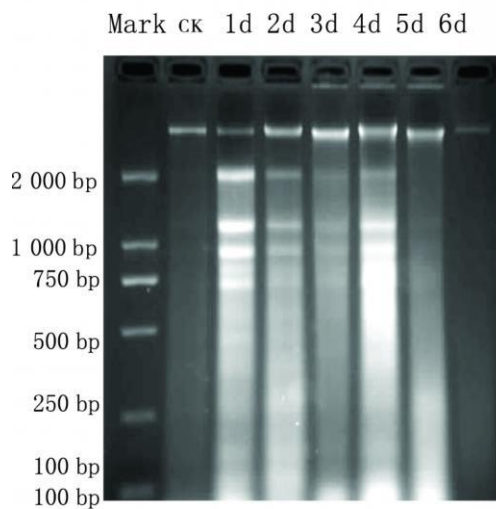


图 1 八棱海棠叶片 DNA 琼脂糖电泳图谱

Fig. 1 DNA band patterns in leaves of *Malus micromalus* Rehd.

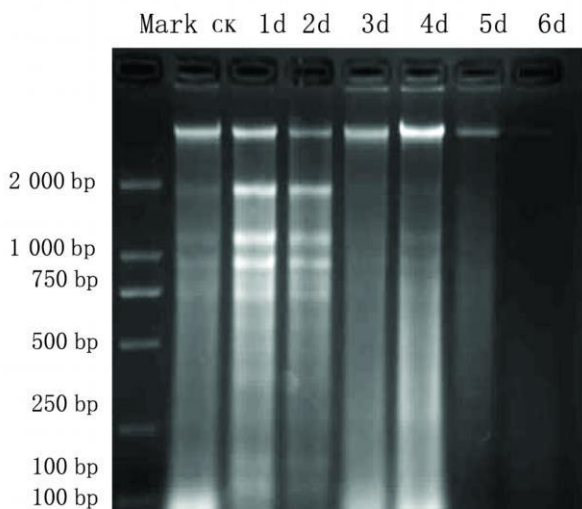


图 2 平邑甜茶叶片 DNA 琼脂糖电泳图谱

Fig. 2 DNA band patterns in leaves of *Malus hupehensis* pamp Rehd.

**3.1.2 DNA 纯化** 在 DNA 溶液中加入等体积的 Tris 平衡酚(pH 8.0):氯仿:异戊醇为 25:24:1 的混合液, 混匀 10 min 于 8 400 rpm 低温离心 10 min。取上清液于另一离心管中, 重复本步骤至杂质层基本消失。向上清液加入 1/10 体积的 3 mol/L 醋酸钠(pH 6.8), 再加入 2 倍体积预冷的无水乙醇, 低温条件下静置 30 min 或过夜, 以充分沉淀 DNA。在 0℃, 8 000 rpm 离心 5~10 min, 除去上层废液(酒精), 向沉淀中加入 75%酒精洗涤, 除去酒精, 室温干燥 15~30 min 左右。向沉淀中加入 0.5~1.0 mL TE(pH 8.0), 50℃ 保温 10 min 左右至沉淀完全溶解。8 000 rpm 离心 3 min, 取上清液, 于 -20℃ 下保存备用。

### 3.2 DNA 浓度、纯度及质量检测

取原液 100  $\mu$ L, 加 TE 缓冲溶液稀释到 2 000  $\mu$ L(稀释 20 倍), 离心混匀, 移至石英比色杯中, 以 2 000  $\mu$ L TE 缓冲溶液为参比, 用 UV-2100 分光光度计, 测定 DNA 在波长 260、280 nm 处的吸收值, 根据  $OD_{260}/OD_{280}$  判断 DNA 的大致纯度; 因为 DNA 在紫外区有强吸收, 最大吸收波长为 260 nm, 而蛋白质在 280 nm 有强吸收。如

果 DNA 中含有蛋白质, 则  $OD_{260}/OD_{280}$  小于 1.7; 如果含有 RNA, 则  $OD_{260}/OD_{280}$  大于 2.0。纯的 DNA 溶液  $OD_{260}/OD_{280}$  为 1.8 左右, 此比值作为 DNA 纯度。再利用下列公式计算 DNA 浓度和含量。DNA 浓度( $\mu$ g/mL) =  $OD_{260} \times \text{稀释倍数} / (0.02 \times L)$ , 其中 L 为比色杯光径(1 cm); DNA 产率( $\mu$ g/g) = DNA 浓度( $\mu$ g/mL)  $\times$  提取 DNA 体积(mL)/材料鲜重(g)。

### 3.3 DNA 琼脂糖凝胶电泳检测

将纯化后的 DNA 用 1.5% 的琼脂糖凝胶(在稍微冷却的琼脂糖溶液中按 1  $\mu$ L/20mL 的比例加入 gold+view), 0.5 $\times$ TBE 电泳缓冲液进行电泳, 每个泳道上样量为 18  $\mu$ L DNA 样品液及 2  $\mu$ L 10 $\times$  Loadingbuffer, DNA-marker 加 6  $\mu$ L, 先用 100 V 电压使 DNA 跑出泳道, 再改用 80 V 的条件下电泳, 当距离胶块边缘 1~2 cm 时, 从电泳槽中取出, 放在英国 Syngene 公司生产的凝胶成像分析系统(G-BOX-HR)上, 观察、拍照。

## 4 结果与分析

### 4.1 DNA 浓度、纯度及质量检测结果

该试验 2 个品种的 14 个样品, 在提取过程中未出

现多酚类物质的褐化,初提取的 DNA 均为白色,纯化后呈无色透明,没有一点褐化的现象,能迅速溶解于 TE。计算 OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 比值,当 1.8 ≤ OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> < 2.0 时,表明 DNA 纯度很好,此时 DNA 中蛋白质、酚类及 RNA 等杂质含量合乎要求<sup>[3-4]</sup>。由紫外检测结果发现,表 1 和表 2 OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 的比值均在 1.8~1.9 之间,表明所得 DNA 受损程度低、纯度高且杂质去除较完全。

表 1 八棱海棠叶片总 DNA 紫外分光光度计检测结果

Table 1 Total quality of DNA in leaves of <i>Malus micromalus</i> Rehd With ultraviolet spectrometry photo				
处理 Treat/d	OD <sub>260</sub> nm	OD <sub>280</sub> nm	OD <sub>260</sub> nm/OD <sub>280</sub> nm	DNA 总量 DNA total contents/1 <sup>μ</sup> g · g <sup>-1</sup>
0(CK)	0.3503	0.1832	1.912	437.9
1	0.2854	0.1537	1.856	356.8
2	0.2570	0.1358	1.892	321.3
3	0.2352	0.1268	1.854	290.5
4	0.1088	0.0602	1.806	235.1
5	0.1360	0.0749	1.814	170.0
6	0.0406	0.0225	1.803	40.82

表 2 平邑甜茶叶片总 DNA 紫外分光光度计检测结果

Table 2 Total quality of DNA in leaves <i>Malus hupehensis</i> pamp With ultraviolet spectrometry photo				
处理 treat/d	OD <sub>260</sub> nm	OD <sub>280</sub> nm	OD <sub>260</sub> nm/OD <sub>280</sub> nm	DNA 总量 DNA total contents/1 <sup>μ</sup> g · g <sup>-1</sup>
0(CK)	0.3570	0.1887	1.892	446.5
1	0.2891	0.1583	1.826	362.5
2	0.2240	0.1224	1.830	280.0
3	0.2096	0.1167	1.799	263.2
4	0.1784	0.0531	1.813	223.1
5	0.0964	0.0532	1.811	120.5
6	0.0318	0.0176	1.802	19.75

4.2 电泳检测 DNA

CTAB 法抽提的 DNA 溶液用琼脂糖凝胶电泳检测总基因组 DNA 的有无及其完整性。由图可见,2 个品种对照(在营养液中没有加 PEG 6000)获得的 DNA 电泳带型好,主带清晰,无弥散现象,RNA 去除干净,点样孔没有残留的 DNA,DNA 带型整齐且无拖尾,表明 DNA 无降解。在营养液中加入 PEG 6000 进行干旱胁迫,在干旱胁迫的第 1、2 天在 DNA 琼脂糖凝胶电泳图谱上观察到明显的“梯状”DNA 条带(DNA Ladder),特征带形清晰、明显,说明多糖等杂质去除较干净,表明 PEG 处理诱发了 DNA 核小体间的断裂,从而表现出典型的细胞程序性死亡的生化特征。随着胁迫时间的延长“梯状”DNA 条带逐渐消失,DNA 条带变成血抹状。到第 6 天,八棱海棠只有少量 DNA 提出,而平邑甜茶几乎没有 DNA 提出,这与用紫外分光光度计检测 DNA 含量结果一致。从 DNA 琼脂糖凝胶电泳图谱这一角度分析也可得出八棱海棠比平邑甜茶耐旱能力强。因此,只要掌握 CTAB 法各步骤中的典型特征,不仅可以用于正常叶片 DNA 的提取,也可用于逆境胁迫叶片 DNA 的提取。

5 讨论

获取高质量的 DNA 是分子生物学研究的基础,影响植物 DNA 提取得率和质量的因素很多,如试剂质量、操作技术等,为此,结合试验就 DNA 提取分析讨论。

首先,植物 DNA 的提取要严格按照破壁-破膜-抽提-沉淀 DNA-溶解 DNA 等顺序步骤。①破壁就是去除细胞壁,细胞壁含有大量酚类、色素、多糖、单宁等物质,给 DNA 的提取与纯化带来许多困难<sup>[5]</sup>,所以提取时必须先破坏细胞壁。破壁最常用的方法是液氮研磨法,研磨动作要快,研成细粉末。②破膜就是去除细胞膜,释放内容物。破膜的主要成份是去污剂,如 CTAB、SDS 等。CTAB 是一种强去污剂,能溶解细胞膜,还能有效地去除糖类杂质,广泛地应用于植物基因组 DNA 的提取。裂解液要先在 65℃的水浴中预热 30 min,研磨好材料迅速加入预热好的盛有裂解液的试管中,应间隔几分钟混匀 1 次,使材料与裂解液充分接触,在 65℃水浴中保温 0.5~1 h。用大的离心管比用小的离心管得到的 DNA 量多<sup>[6]</sup>;材料鲜嫩,因嫩叶中 DNA 含量较多,纤维素较少,易于提取。③抽提的主要目的是去除蛋白质及其它杂质。常用酚仿试剂,即苯酚:氯仿:异戊醇为 25:24:1 的混合液。去蛋白质等杂质时,以两相中间杂质消失为原则<sup>[7]</sup>。另外,抽提中,要轻柔摇动几次,增加材料与有机溶剂接触面,以提高抽提效果<sup>[8]</sup>。④沉淀 DNA。常用试剂为异丙醇和乙醇。在粗提时用异丙醇而在纯化时用乙醇的方法较好。因为用异丙醇沉淀有利于特异性地沉淀核酸,提高核酸的产量。王金发<sup>[1]</sup>也认为第一步沉淀选用异丙醇,不仅体积用量少,带入多糖类杂质少<sup>[3]</sup>,而且小分子量 DNA 也能沉淀下来。用乙醇沉淀 DNA 时,只能沉淀大分子量的 DNA<sup>[8]</sup>。但异丙醇不易挥发出去,这对后期 DNA 溶解有不良影响,无水乙醇的沉淀效果没有异丙醇好,且加入量大,但易挥发,容易去除。为了解决这些矛盾,实验中常在粗提时先用异丙醇,再用 70%酒精洗涤,而在纯化 DNA 时,用无水乙醇沉淀<sup>[9]</sup>。为此应按异丙醇粗提-DNA 洗液(10 mmol/L 醋酸铵,75%乙醇)洗涤-乙醇纯化方法进行,既达到高效沉淀小分子量 DNA 的目的,又发挥酒精溶解异丙醇和醋酸铵去除多糖的作用。⑤溶解 DNA,一种方法是用超纯水溶解,另一种是用 TE 缓冲溶液溶解。用超纯水溶解不利于 DNA 的长期保存,因为 DNA 双链在水中不很稳定,易降解。TE 缓冲溶液中含有 Tris-Cl 和 EDTA,可以维持 DNA 双链的稳定性。若 DNA 提取后立即用于试验时,则用超纯水溶解<sup>[9]</sup>;若 DNA 长期保存时,应用 TE 缓冲溶液溶解。

另外,还应该注意一些问题,DNA 偏碱的条件下稳定,因而 DNA 提取液 pH 值应在 8.0 左右<sup>[9]</sup>,包括 EDTA 溶液、Tris 平衡酚及 TE 溶液的 pH 值都应是 8.0,以

保证 DNA 稳定。另外, 饱和酚 pH 值接近 8.0, 可以减少离心后水酚双相的界面(主要是蛋白质)上有 DNA 滞留, 有利于在下一步吸出水相时不带动界面中的蛋白<sup>[10]</sup>。防止褐化: 多酚类化合物在细胞破碎后与空气接触易发生氧化, 产生褐化现象, 导致 DNA 失活, 抽提时易丢失。PVP 和  $\beta$ -巯基乙醇可以除去酚类化合物, 但两者单独使用效果并不理想, 将二者同时按照一定比例加入较好, 试验采用使用前在  $2\times$  CTAB 缓冲液中加入 1% PVP, 2%  $\beta$ -巯基乙醇, 试验结果较理想, 粗提的 DNA 为白色, 纯化后为无色透明, 没有一点褐化。防止降解: 降解有两方面的原因: 一是机械作用; 二是核酸酶的氧化分解。保证基因组 DNA 的完整性, 各项操作动作应温和, 避免剧烈震荡和过度搅拌; 为了防止 DNase 的降解作用, 所用的器具、研钵、离心管等都要经过高压灭菌, 同时要在提取液中加入二价离子螯合剂 EDTA 来消除外源及内源酶的活性。

总之, 用 CTAB 法提取 DNA 时, 必须掌握各种试剂、方法的作用和原理, 以及各个步骤中的典型特征, 及时调整实验中的不定因素, 才能得到较好的提取效果。

## 参考文献

- [1] 王金发, 何炎明. 细胞生物学实验教程 [M]. 北京: 科学出版社, 2004: 122-124.
- [2] 翟朝阳. 生物分子实验教材 [M]. 成都: 四川大学出版社, 2004: 34-35.
- [3] 蒋立科, 杨婉身. 现代生物化学实验技术 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2003: 253-256.
- [4] 朱英, 陶刚, 刘作易, 等. 普遍适用于农作物基因组 DNA 的提取方法及值得注意的几个问题 [J]. 贵州农业科学, 2005, 33(5): 20-21.
- [5] 柳李旺, 汪隆植, 龚义勤, 等. 几种茄属植物基因组 DNA 提取与 RAPD 分析 [J]. 安徽农业科学, 1997, 25(3): 193-195.
- [6] 张宁洁. 花生高质量 DNA 提取方法研究 [J]. 安徽农学通报, 2007, 13(8): 101-102.
- [7] 朱生伟, 史芝之, 徐淑芬, 等. 快速提取烟草 DNA 的方法 [J]. 东北农业大学学报, 1998, 29(3): 275-278.
- [8] 唐效蓉, 申响保, 陈明皋, 等. 马尾松针叶 DNA 抽提 [J]. 湖南林业科技, 2006, 33(5): 1-4.
- [9] 陈庆山, 刘春燕, 吕东, 等. 大豆 DNA 提取基本原理的探讨 [J]. 东北农业大学学报, 2004, 35(2): 129-134.
- [10] 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术 [M]. 北京: 高等教育出版社, 1993.

## Study on Efficient Extraction for Genomic DNA from Malus Leaves by CTAB Method

LI Chun-xia, LI Hong-fei

(Yan'an Vocational and Technical College, Yan'an, Shanxi 716000, China)

**Abstract:** In order to isolate high-quality genomic DNA from Malus plant leaves enriching polyphenols and polysaccharides with CTAB in normal circumstance and adversity stress, two Malus plants (*Malus micromalus* Rehd. and *Malus hupehensis* pamp Rehd. seedlings) were treated with twenty percent of polythylene glycol (20% PEG 6000). extracted DNA by CTAB, in proportion to the additions of PVP and  $\beta$ -mercap toethanol to the extraction buffer were capable of preventing browning from taking place in the extraction. Tris-Phenol (Stabilized with 0.1 M Tris, pH 8.0)/Chloroform/isoamyl alcohol were used to remove protein and impurity in the second extraction, during crude DNA used to Isopropanol DNA and deterged by DNA detergent, without using RNase remove RNA, we detected the quality and concentration of DNA respectively for normal leaves and drought stress leaves by Agarose gel electrophoresis of genomic DNA and ultraviolet spectrometry photo. The results showed that the method could be acquired high-quality DNA and effectively eliminate interferer with extracting DNA by the secondary materials. And the corresponding resolves were provided for problems which affected heavily the experimental result during the extraction.

**Key words:** CTAB; Malus leaves; DNA extraction