

天竺葵基因组 DNA 五种提取方法的比较

杨柯金, 鲁云凤, 张 静

(南阳师范学院 生命科学与技术学院, 河南 南阳 473061)

摘 要:以天竺葵为试材,比较分析了 CTAB 法、简单法、高盐低 pH 值法、CTAB-SDS 法、SDS 法对天竺葵叶基因组 DNA 提取的效果。结果表明:5 种方法提取的天竺葵总 DNA 在纯度上有很大的差别。所得到的 DNA 提取纯度依次为简单法、CTAB-SDS 法、CTAB 法、高盐低 pH 法、SDS 法。酶切结果为简单法、CTAB 法效果最好,其次 SDS 法,高盐低 pH 法、CTAB-SDS 法不能被 EcoRI 酶完全消化。经综合的比较分析,认为简单法是最佳的提取方法。因其步骤简单、快捷,得到的基因组 DNA 降解少、杂质含量少,能获得高质量的 DNA 模板,可以用于分子生物学试验研究。

关键词:天竺葵;基因组;DNA 提取

中图分类号:S 682.1⁺9 文献标识码:A 文章编号:1001-0009(2009)06-0089-03

植物组织含有蛋白质、多糖、多酚硅以及其他代谢产物如酯、萜等。由于这些物质的存在,导致提取高质量的 DNA 比较困难。不同的植物材料因其细胞中次生代谢产物的种类、含量不同,适合的提取方法也不同。天竺葵叶片因为含有丰富多糖、多酚等次生代谢物质,在 DNA 的提取过程中,由于酚类物质自动被氧化而与 DNA 形成不可逆结合,干扰 DNA 的絮状结构,明显加大了 DNA 提取难度,从而影响 DNA 的纯度。因此寻找一种简便有效的天竺葵基因组 DNA 的方法成为研究者

的共识。该试验比较研究 5 种 DNA 的提取法对天竺葵基因组 DNA 提取效果,筛选适合于天竺葵 DNA 的提取方法,为进一步开展天竺葵分子生物学方向的研究提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

材料:天竺葵 取自南阳师范学院花房。

仪器:SP-2000UV 紫外可见分光光度计(上海光谱仪器有限公司),DYCP-31B 型电泳槽(北京市六一仪器厂),TGL-16G 台式离心机(上海安亭科学仪器厂),WD-9403C 型紫外透射反射仪(北京市六一仪器厂)、DYY-III 2 稳压稳流电泳仪(北京六一仪器厂)。

1.2 药品与试剂

CTAB(分析纯)购自中国医学(集团)上海化学试剂公司、PVP K30 购自上海源聚生物科技有限公司,β 巯基

第一作者简介:杨柯金(1979-),女,讲师,研究方向为分子细胞生物学。E-mail:kejinyang@yahoo.com.
基金项目:南阳师范学院高层次引进人才专项基金资助项目(nytc2006069)。
收稿日期:2008-12-27

[9] 雷家军,荣立苹,郑洋,等.百合品种离体培养的研究[J].北方园艺,2008(7):224-226.

Study on Tissue Culture and Propagation of White Heaven *in Vitro*

LI Qiao-xia, LI Kai, DING Wen-long, ZHAO Qing-fang

(College of Life Sciences Northwest Normal University, Lanzhou Gansu 730070, China)

Abstract: With the scales of *Lilium* White Heaven as explants, the effects of hormone combination on shoots induction, proliferation and roots induction were studied in the experiment, and the clonal propagation system was established successfully. Better induction medium of shoots were MS+0.2~0.5 mg/L NAA+0.2~0.8 mg/L BA (or 0.2~2.0 mg/L KT). Proliferation medium of shoots were MS+0.5 mg/L IAA+0.1 mg/L KT. Induction of roots were better in medium of MS+0.5 mg/L NAA+0.2 mg/L KT.

Key words: White Heaven; Tissue culture; Clonal propagation; Hormone

乙醇、DNA Marker , M-琼脂糖 Promega 分装, DNA 限制性内切酶均购于华美生物工程有限公司。

1.3 方法

提取基因组 DNA 所用的 SDS 法参照郭传友等^[1]的方法, 高盐低 pH 值法参照徐莉等^[2]的方法, CTAB 法参照李明芳等^[3]的方法, 简单提取法参照吴丽圆^[4]的方法, CTAB-SDS 法参照刘小勇^[5]的方法, 以上方法根据需要略有改动。基因组 DNA 提取后, 用紫外分光光度计测定纯度, 用琼脂糖凝胶电泳及 EcoRI 酶切来检测 DNA 的质量。

2 结果与分析

2.1 5 种基因组 DNA 提取方法的比较

2.1.1 不同方法对 DNA 提取的影响 从表 1 中可知, CTAB 法、简单法、CTAB-SDS 法提取效果较好, 其中简单法不仅操作步骤最少, 而且提取效果最好, 而高盐低 pH 值法、SDS 法提取的总 DNA 效果不好。核酸的嘌呤、嘧啶中都有共轭双键, 对紫外光有强烈的吸收, 天然双链 DNA 在 260 nm 与 280 nm 处吸收值(OD₂₆₀/OD₂₈₀)应在 1.8 左右, 低则说明有蛋白质、酚等小分子杂质未除尽, 高则说明还有 RNA^[7]。从表 1 中可以看出, 不同提取方法(每组有 3 个重复)所提取的 DNA 的 OD 值, 其中简单法的 OD 值为 1.81, 说明提取效果较好。而 CTAB 法 OD 值为 2.05, 说明有 RNA 存在; 而 CTAB-SDS 的 OD 值为 1.58, 且沉淀为褐色, 说明这种方法除酚类物质质量较少; 而高盐低 pH 值法、SDS 法提取的 DNA 纯度较低, 蛋白质、酚等杂质未除尽。

表 1 天竺葵 5 种不同方法 DNA 提取过程中的现象

	CTAB 法	简单法	高盐低 pH 值法	CTAB-SDS 法	SDS 法
水浴裂解	绿色	绿色	乳黄色	黄绿色	黄绿色
酚 : 氯仿 : 异戊醇	明显	明显	不明显	不明显	不明显
抽提蛋白质					
抽提后的离心表现	蛋白质较厚	蛋白质较厚	蛋白质较薄	无	无
DNA 沉淀效果	成团	成团	白色纤维状	白色纤维状	白色纤维状
加入 TE 后	白色	白色	无色	褐色	无色
OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀	2.05	1.81	1.17	1.58	1.12

2.1.2 基因组 DNA 的电泳检测 DNA 可与溴化乙锭结合, 在紫外光照射下发出荧光, 根据荧光的强度可判断 DNA 的浓度和 DNA 片段的大小。将采用不同方法所提取的基因组 DNA 在 1% 的琼脂糖凝胶上电泳检测。结果如图 1, 泳道 2~6 为采用以上 5 种方法提取的天竺葵总 DNA 电泳图谱, 所提取的总 DNA 在凝胶上呈较整齐的一条线, 除高盐低 pH 值法外, 其它方法均无严重拖尾现象。比较而言, 简单法提取效果最好, 主带清晰, 无拖尾现象。

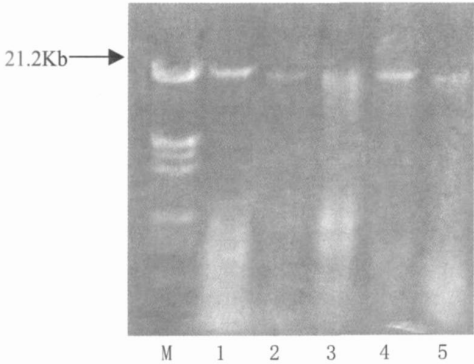


图 1 不同提取方法所提取的基因组 DNA

注: M marker; 1. CTAB 法 2. 简单法; 3. 高盐低 pH 值法 4. CTAB-SDS 法 5. SDS 法

2.1.3 单酶切检测 图 2 为利用不同方法提取天竺葵基因组 DNA 的 EcoRI 酶切图谱。其中 CTAB 法、简单法提取的基因组 DNA 均可被限制性内切酶完全消化, 证明所提取的 DNA 纯度高、质量好, 不含抑制限制性内切酶的各种杂质。SDS 法提取的 DNA 部分可被消化, 而高盐低 pH 值法、CTAB-SDS 法几乎不被消化。

2.2 基因组 DNA 提取效果的影响因素

影响天竺葵基因组 DNA 提取质量的因素有 4 个。一是取材; 二是研磨与裂解时间; 三是消除蛋白质、多糖、多酚等杂质污染; 四是防止降解。

取材以天竺葵幼叶为宜。整个叶片呈淡绿色的材料最好, 容易磨, 提取的 DNA 质量好, 呈团絮状。墨绿或发黄的叶子, 首先不易研磨, 其次由于叶片经过一定的生理活动, 细胞内产生大量代谢产物如多糖、酚、酯、萜等, 这些物质包围着 DNA, 加大了 DNA 提取难度, 并且随着叶片的变老, 细胞内的大分子物质如核酸发生降解, 使提取出的 DNA 质量不高。叶片用液氮研磨的时候, 要尽可能将它磨碎。这样在裂解时有利于破碎细胞壁和细胞膜, 有利于 DNA 释放到提取液中。

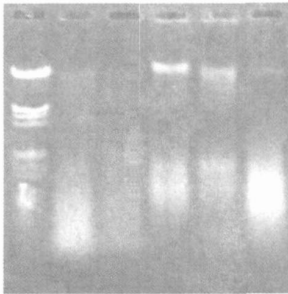


图 2 EcoRI 消化不同提取方法所提取的基因组 DNA

注: 1(marker); 2(CTAB 法); 3(简单法); 4(高盐低 pH 法); 5(CTAB-SDS 法); 6(SDS 法)。

天竺葵叶片为纸质,裂解时间长短对基因组 DNA 提取质量有极大的影响。时间过短,叶片裂解不充分, DNA 得率低;时间过长, DNA 易发生降解。该试验做了几个对照,用简单法分别将其裂解 30、60、90、120 min。试验表明(见图 3),结合琼脂糖电泳检测可以看出裂解 60 min 的 DNA,主带清晰,几乎无拖尾现象,应视为最合适。而裂解 30 min, DNA 主带不清晰,裂解 90 min 及 120 min 的 DNA 拖尾严重。由此可以看出,并不是裂解时间越长越好。

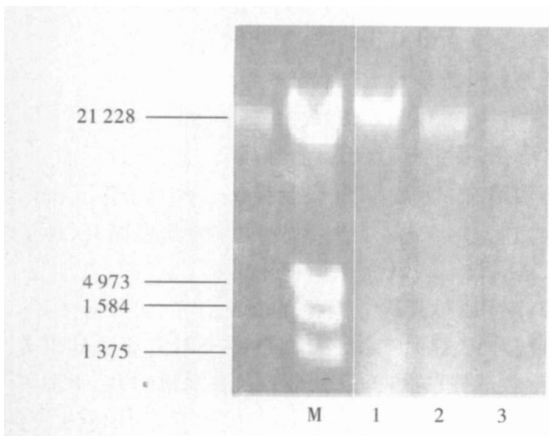


图3 叶片裂解时间对基因组 DNA 质量的影响

在传统基因组 DNA 提取中,一般单独使用 V(苯酚):V(氯仿):V(异戊醇)=25:24:1^[6]或 V(氯仿):V(异戊醇)=24:1 作为提取介质,它们能变性蛋白质。单独使用前者,酚的多次使用会降低 DNA 的提取效率和纯度,而单独使用后者则蛋白质抽提的不彻底。该试验采用将二者结合的方式,第 1 次抽提采用酚:氯仿:异戊醇,第 2 次再抽提时用氯仿:异戊醇,这样减少了苯酚多次抽提对 DNA 的破坏,又能将蛋白质抽提

干净。其中氯仿不仅对蛋白质有变性作用,且与水不相混溶,不会带走基因组 DNA。在抽提 DNA 时,为了混合均匀,必须充分振荡离心管数次,这时在混合液内容易产生气泡,气泡会阻止相互间的充分作用。异戊醇能降低分子表面张力,因此加入异戊醇后能减少抽提过程中气泡产生,并且有利于分相,使离心后的上层水相,中层变性蛋白质相以及下层有机溶剂相维持稳定^[7]。

PVP 和β-巯基乙醇相结合的方式去除多糖、多酚等次生代谢物。在裂解缓冲液中加入 PVP,对于抑制多酚氧化酶和细胞色素氧化酶的活性,起到很好的效果。这是因为 PVP 肽键中的氧与酚羟基上的质子牢固地结合,从而防止与酶中的肽键结合,保护酶蛋白,阻碍酚氧化成醌,因而减轻了 OD 值干扰,同时也有利于 DNA 保存^[7]。这种聚合物通常与其它抗氧化剂同时使用;β-巯基乙醇是最常用的抗氧化剂,提供巯基(-SH)与多酚类物质竞争氧,因而能有效的防止酚氧化成醌,避免了褐变的发生。尽可能排除人为因素造成的降解,还要防止 DNA 被外源核酸酶降解。

参考文献

[1] 郭传友,黄坚钦,王正加.山核桃基因组 DNA 提取方法的比较研究[J].福建林业科技,2004,31(2):12-15.
[2] 徐莉,张富春,陈友强,等.红花基因组 DNA 的提取及 RAPD 体系的优化[J].新疆农业科学,2005,42(2):131-134.
[3] 李明芳,郑学勤.荔枝基因组 DNA 的提取[J].生物技术通讯,2004,15(6):591-592.
[4] 吴丽圆.4 种思茅松总 DNA 提取方法的比较[J].福建林学院学报,2004,24(3):237-240.
[5] 刘小勇,田素忠,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.
[6] K. 巴克.分子生物学实验室工作手册[M].北京:科学出版社,2005,113.
[7] 陈华,徐小彪,易干军,等.猕猴桃基因组 DNA 不同提取方法的研究[J].江西农业大学学报,2005,27(1):12-16.

A Study on Five Methods for Extraction of *Pelargonium* Genomic DNA

YANG Ke-jin, LU Yun-feng, ZHANG Jing

(College of Life Science and Technology, Nanyang Normal University, Nanyang, Henan 473061, China)

Abstract: The five optimized methods for extraction of genomic DNA such as CTAB method, briefness method, high-salt-and-low-pH method, CTAB-SDS method and SDS method, The result showed that the purity and yield of *Pelargonium hortorum* DNA obtained by above methods was distinctly different. These five methods were ranked as: briefness method, CTAB-SDS method, CTAB method, high-salt-and-low-pH method, SDS method. The restriction enzyme-EcoRI digestion results showed: the briefness methods could be completely digested, which the CTAB only be partly, CTAB-SDS method could not be digested whereas the briefness method not only spend short time but also made high purification and satisfactory integrity, in addition, can be digested completely. It can be used in the research of molecular biology experiment.

Key words: *Pelargonium hortorum*; Genomic; DNA extraction