

四种改良 CTAB 法提取大叶朴基因组 DNA 比较研究

赵 静, 叶 欢, 李雪松, 李建华

(孝感学院 生命科学技术学院 湖北 孝感 432003)

摘 要:以大叶朴成熟叶片为试材,采用 4 种改良 CTAB 法提取大叶朴基因组 DNA,并比较其提取效果。结果表明:用这 4 种方法均可获得没有发生褐变、完整性好的 DNA。其中方法 2(用了低浓度乙醇和高盐去多糖)和方法 4(用了低浓度乙醇去多糖)去多糖的效果更好一些,但获得的 DNA 浓度较低;ISSR 扩增结果表明,4 种方法提取的 DNA 均可用于 ISSR 扩增,但方法 2 和 3 扩增的效果稍好一些。

关键词:大叶朴;改良 CTAB 法;基因组 DNA;多糖;褐变

中图分类号:S 687.03.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2010)01-0165-04

得到高质量的 DNA 是分子生物学研究中关键的第一步。从植物材料中提取基因组 DNA 的质量受到多种因素的影响。在不同植物或同种植物不同时期组织中存在不同数量的多糖、色素以及种类繁多的次生物质,特别是多糖、酚类在提取过程中可与 DNA 共沉淀,形成包裹 DNA 的黏稠胶状物,难以溶解或产生褐变,使得 DNA 提取质量较低,获得的 DNA 溶液常常黏度大乃至呈胶状,这些物质如果清除不净则会影响后续研究^[1-3]。如何高效简便地去除多糖、多酚等次生物质,对提取纯化植物 DNA 来说至关重要^[3]。

大叶朴(*Celtis koraiensis* Nakai)属榆科,原产我国华北及辽宁等地,它是典型的遮荫兼观叶树种,同时,大叶朴树皮纤维可代麻,也可用作造纸或人造棉的原料,果可榨油,供制肥皂和作润滑剂用。大叶朴成熟叶片较硬,叶色浓绿,富含多糖、色素和多酚等次生物质,使得高质量总 DNA 的提取较为困难,因此,根据适当浓度的无水乙醇可使多糖沉淀,多糖在高盐溶液中的溶解度大,PVP 可有效去除多酚等原理,以经典提取植物 DNA 的 CTAB 法为基础^[4],设计了 4 种改良 CTAB 法提取大叶朴成熟叶片基因组 DNA,并用琼脂糖电泳、紫外分光光度计以及 PCR 扩增的方法对这 4 种提取方法进行了比较。

1 材料与方法

1.1 试验材料

第一作者简介:赵静(1987-),女,本科在读,研究方向为生物工程。
E-mail: wyznkm@sohu.com.
通讯作者:李建华(1969-),男,博士,副教授,现从事分子生物学教学与研究工作。E-mail: znmcm2001@yahoo.com.cn.
基金项目:湖北省教育厅重大资助项目(Z20092601)。
收稿日期:2009-09-20

叶朴成熟叶片采集于孝感市槐荫公园,采集后立即放入冷冻袋,带回实验室,用 ddH₂O 清洗,用滤纸吸干表面残留水分,标记分装,置-60℃冰箱冷冻保存备用。

1.2 主要仪器和提取试剂

冷冻离心机(Eppendorf),DW-ML 型超低温冷冻储存箱(中科美菱低温科技有限公司),DYY-7C 型电泳仪(北京六一仪器厂),DYY-III 型水平电泳槽(北京六一仪器厂),752N 型紫外可见分光光度计(上海精密科学仪器有限公司),FR-200A 全自动紫外与可见分析系统(上海复日科技有限公司),PCR 仪(PTC-100 thermocycler)。聚乙烯吡咯烷酮(PVP),CTAB-free 缓冲液(0.2 mol/L Tris-HCl, 50 mmol/L EDTA, 0.25 mol/L NaCl),β-巯基乙醇,2×CTAB 提取缓冲液(2% CTAB, 0.1 mol/L Tris-HCl, 20 mmol/L EDTA, 1.4 mol/L NaCl, 1% PVP),氯仿/异戊醇(24:1),10×CTAB (10% CTAB, 0.7 mol/L NaCl),无水乙醇,饱和酚,7.5 mol/L 的醋酸铵。

1.3 试验方法

1.3.1 方法 1 称取约 6 g 的叶片,沿叶脉撕碎后加入到有少量石英砂和 PVP 的研钵中在冰上研磨至匀浆。取 0.2 g 的匀浆分别加入到 12 支 1.5 mL 的 EP 管中。加入 1 mL 预冷的 CTAB-free 缓冲液,加入 5 μL 的 β-巯基乙醇。剧烈震荡后冰浴 30 min,期间每隔一定时间颠倒摇匀。冰浴结束后以 3 000 rpm 离心 5 min,弃上清液,立即加入 500 μL 预热的(65℃)2×CTAB 提取缓冲液,再加入 10 μL 的 β-巯基乙醇,65℃水浴 60~80 min,期间每隔一定时间颠倒摇匀。水浴结束后以 10 000 rpm 离心 5 min,取上清液,加 50 μL 的预热的(65℃)2×CTAB 提取缓冲液,混匀 5 min,再加入 500 μL 的氯仿/异戊醇(24:1),摇匀 10 min 后,10 000 rpm 离心 5 min,取上清。加入 500 μL 的酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)。

1), 轻轻颠倒摇匀 10 min, 10 000 rpm 离心 8 min。取上清液, 加入 500 μ L 的氯仿/异戊醇(24 : 1), 轻颠倒摇匀 10 min, 10 000 rpm 离心 5 min。取上清液于另 1 个 EP 管中, 加入 2 倍-20 $^{\circ}$ C 预冷的无水乙醇, 轻轻摇匀(此时应能看到 DNA 的絮状沉淀)。将絮状沉淀用毛细血管挑取到另 1 个加了 1 mL 70 %乙醇的 EP 管中, 轻轻颠倒几次, 12 000 rpm 离心 3 min, 弃净乙醇, 再用 70%乙醇清洗 1 次, 风干(可在 37 $^{\circ}$ C 烘干约 10 min); 以 100 μ L 无菌双蒸水溶解 DNA, 备用。

1.3.2 方法 2 在方法 1 的第(2)步加入预热的 2 \times CTAB 提取缓冲液的同时加入 0.35 倍体积的无水乙醇, 同时将方法 1 的第(6)步改为取上清液于另一 EP 管中, 先加入 50 μ L 7.5 mol/L 的醋酸铵, 然后再加入等体积-20 $^{\circ}$ C 预冷的无水乙醇。

1.3.3 方法 3 将方法 1 的第(6)步改为取上清液于另 1 个 EP 管中, 先加入 50 μ L 7.5 mol/L 的醋酸铵, 然后再加入等体积-20 $^{\circ}$ C 预冷的无水乙醇。

1.3.4 方法 4 在方法 1 的第(2)步加入预热的 2 \times CTAB 提取缓冲液的同时加入 0.35 倍体积的无水乙醇。

2 结果与分析

2.1 电泳检测

取 5 μ L DNA 样品在 1.0%琼脂糖凝胶, 电泳缓冲液为 0.5 \times TBE, 电压为 100 V 的条件下电泳 80 min, 溴化乙锭染色, 在 FR-200A 全自动紫外与可见分析系统上观察 DNA 分子的大小、完整性、电泳条带的清晰度, 并进行拍照(图 1)。从图 1 可以看出, 这 4 种方法提取的 DNA 完整性都较好。用方法 1(未用 0.35 倍无水乙醇, 也未用醋酸铵, 泳道 1、2、3)和方法 3(醋酸铵, 泳道 7、8、9)提取的 DNA 总量比用方法 2(0.35 倍无水乙醇, 醋酸铵, 泳道 4、5、6)和方法 4(用 0.35 倍无水乙醇, 而未用醋酸铵)的多一些, 但点样孔中有明显的发亮现象, 表明方法 1 和 3 样品中的蛋白质或多糖未除尽, 而方法 2 和 4 特别是方法 2 样品点样孔很干净。

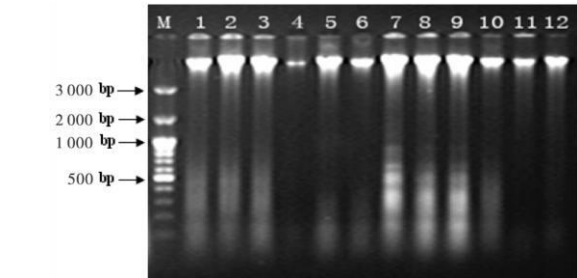


图 1 4 种方法提取的 DNA 电泳图

注: M; Markers 1、2、3 为方法 1; 4、5、6 为方法 2; 7、8、9 为方法 3; 10、11、12 为方法 4。

2.2 紫外吸收检测

从上述 12 份 DNA 样品中分别取 50 μ L DNA 溶液

用水稀释 40 倍, 用 752N 型紫外可见分光光度计, 分别在波长为 230、260、280 nm 处进行紫外吸值的检测, 将检测结果进行单变量方差分析(见表 1)。

表 1 4 种 DNA 提取方法的 DNA 紫外吸收值

| 方法 | OD ₂₃₀ | OD ₂₆₀ | OD ₂₈₀ | OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀ | OD ₂₆₀ /OD ₂₃₀ |
|----|-------------------|-------------------|-------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| 1 | 4.35 \pm 1.47A | 9.24 \pm 4.03Aa | 4.87 \pm 1.85Aa | 1.90 \pm 0.71 | 2.11 \pm 0.22 |
| 2 | 1.05 \pm 0.37B | 2.28 \pm 0.51Bb | 1.26 \pm 0.48Bb | 1.81 \pm 0.05 | 2.17 \pm 0.25 |
| 3 | 1.89 \pm 0.56B | 4.11 \pm 1.40Ab | 2.25 \pm 0.63Ab | 1.80 \pm 0.13 | 2.15 \pm 0.13 |
| 4 | 1.31 \pm 0.32B | 2.67 \pm 0.65Bb | 1.40 \pm 0.29Bb | 1.89 \pm 0.16 | 2.04 \pm 0.18 |

在波长为 230、260、280 nm 处的紫外吸值分别反应的是 DNA 提取样品中小分子杂质、核酸和蛋白质的含量。纯的 DNA 样品 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 应为 1.8, OD₂₆₀/OD₂₃₀ 应大于 2.0。OD₂₆₀/OD₂₈₀ 大于 1.9 时, 表明有 RNA 污染, 小于 1.6 时, 表明样品中存在蛋白质或酚污染; OD₂₆₀/OD₂₃₀ 小于 2.0 时, 表明溶液中有残存的盐和小分子杂质, 如核苷酸、氨基酸、酚等。从表 1 可以看出, 方法 1 提取的 DNA 样品的 OD₂₃₀ 值极显著地大于用方法 2、3 和 4 提取的 DNA 样品的 OD₂₃₀ 值($P < 0.01$), 而方法 2、3 和 4 提取的 DNA 样品间的 OD₂₃₀ 值差异不显著($P > 0.05$); 方法 1 提取的 DNA 样品的 OD₂₆₀ 和 OD₂₈₀ 值极显著地大于用方法 2 和 4 提取的 DNA 样品的 OD₂₆₀ 和 OD₂₈₀ 值($P < 0.01$), 方法 1 提取的 DNA 样品的 OD₂₆₀ 和 OD₂₈₀ 值显著地大于用方法 3 提取的 DNA 样品的 OD₂₆₀ 和 OD₂₈₀ 值($P < 0.05$), 而方法 2 和 4 提取的 DNA 样品间的 OD₂₆₀ 和 OD₂₈₀ 值差异不显著($P > 0.05$); 4 种方法提取的 DNA 样品间的 OD₂₆₀/OD₂₈ 和 OD₂₆₀/OD₂₃₀ 值差异不显著($P > 0.05$), 其中, OD₂₆₀/OD₂₈ 值在 1.80~1.90 之间, OD₂₆₀/OD₂₃₀ 值在 2.04~2.17 之间。上述结果表明方法 1 提取的 DNA 样品中 DNA 的含量明显高于方法 2、3 和 4, 这 4 种方法对蛋白质和核苷酸、氨基酸、酚等小分子杂质的去除效果都比较好。

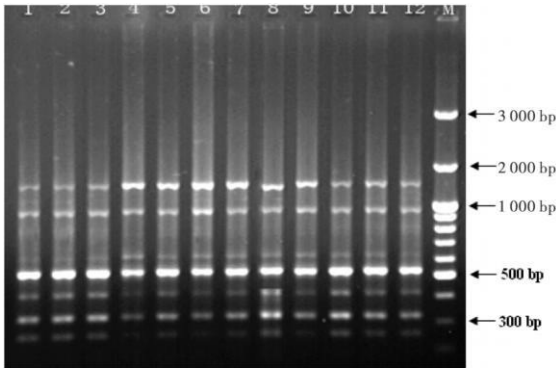


图 2 4 种方法提取的 DNA ISSR 扩增电泳图

注: M; Markers 1、2、3 为方法 1; 4、5、6 为方法 2; 7、8、9 为方法 3; 10、11、12 为方法 4。

2.3 PCR 扩增

为了进一步检验这 4 种方法提取 DNA 的质量, 以

所提 DNA 为模板,用 1 条 ISSR 引物(引物序列为(AG)₈C),在 PTC-100 PCR 自动扩增仪上进行 PCR 扩增。PCR 扩增条件及扩增程序为:94℃预变性 5 min,接着以 94℃45 s,53℃45 s,72℃90 s,循环 44 次,最后在 72℃延伸 7 min。1.2%琼脂糖凝胶 90 V 电泳约 1 h 后在 FR-200A 全自动紫外与可见分析系统下观察、拍照(结果如图 2)。从图 2 可以看出,4 种方法提取的 DNA 样品都可用作 ISSR 研究,不过用方法 2、3 提取的样品扩增出的条带,特别是大片段条带要亮一些。

3 讨论

大叶朴等植物成熟叶片的细胞中含有较多的多糖、酚类、色素等次生物质,这些物质在 DNA 提取过程中易与 DNA 共沉淀,形成粘稠的胶状物难于溶解或产生褐变。由于多糖可以抑制许多酶的活性,因此受多糖污染的 DNA 样品无法用于进一步的分子生物学研究^[3],去除多糖、防止酚类等次生物质褐变成为提取高质量大叶朴基因组 DNA 的关键问题。

去除多糖有多种方法,但常用有 2 种:一是在 DNA 提取过程中以浓度乙醇沉淀多糖^[6];二是在沉淀 DNA 时,加入高盐溶液,使多糖不随 DNA 沉淀^[7]。该研究采用 4 种改良的 CTAB 方法提取大叶朴成熟叶片基因组 DNA,其中方法 1 没有用低浓度乙醇或高盐去多糖,方法 2 用了低浓度乙醇和高盐去多糖,方法 3 仅用了高盐去多糖,方法 4 侧仅用了低浓度乙醇去多糖。用琼脂糖凝胶电泳,溴化乙锭染色的方法检测 DNA 样品,在紫外灯下点样孔中发亮的物质主要是蛋白质、多糖及其它一些次生代谢物质^[8]。表 1 中 4 种方法提取的 DNA 的 OD260/OD280 值表明,这 4 种方法提取的 DNA 样品中,蛋白质去除得都比较干净,而从图 1 可以看出,用方法 2 和 4 提取的 DNA 样品在电泳检测时点样孔比较干净,这说明方法 2 和 4 去多糖及其他一些次生代谢物质的效果比较好,特别是方法 2 即同时使用低浓度乙醇和高盐去多糖,效果最理想。观察图 1 中各方法提取 DNA 条带的亮度及表 1 中各方法提取 DNA 紫外分光光度计的 OD260 值,方法 2 和 4 提取的 DNA 的浓度显著低于方法 1 和 3 这可能是由于多糖的许多理化性质与 DNA 很相似,很难将它们分开,去除多糖的同时往往也有相当数量的 DNA 被裹挟走了,造成 DNA 产量的减少^[9]。

在去多酚、防褐变方面,该研究采取了低温操作,使用 PVP、CTAB 和β-巯基乙醇等综合措施。PVP 是一

种高分子合成树脂,可溶于水、乙醇及氯仿,工业上常用作澄清剂、稳定剂,它不吸附 DNA,但能与多酚类物质形成不溶性的络合物而沉淀,防止多酚物质氧化成醌类,避免溶液变褐^[9-10]。CTAB 除了可溶解生物膜,释放核酸外,还能有效地去除多酚,抗氧化剂β-巯基乙醇能提供巯基,与多酚类物质竞争氧,能在一定程度上防止酚氧化成醌,避免样品的褐化。该研究所用的 4 种提取 DNA 的方法在磨样时均加入少量 PVP 并在冰上操作,在 CTAB 提取缓冲液加入 1% PVP,在不含 CTAB 的缓冲液和 CTAB 提取缓冲液中加分别加入了 5 μL 和 10 μL 的β-巯基乙醇,这些措施不但有效地排除材料中的多酚类物质的干扰,所获得的 DNA 样品没有发生褐变,而且能保持 DNA 的纯净和完整性。另外,用不含 CTAB 的缓冲液预洗,可洗掉部分次生物质^[11-12],预洗时应充分振荡,使缓冲液和材料充分接触混合,离心后颠倒离心管彻底弃除上清液,离心速度不可太大,离心速度太大会将离心管中的材料压得太紧,不利后续操作,该试验以 3 000 rpm 离心 5 min,取得了较好的效果。

参考文献

[1] 黄晓丹,张云贵,应铁进.高质量植物基因组 DNA 的提取[J].植物生理学通讯,2006,4(2):311-314.
[2] 桂腾琴,乔爱民,孙敏,等.果梅基因组 DNA 提取方法的比较及 ISSR 分析[J].北方园艺,2008(4):212-215.
[3] Vanna A, Padh H, Shrivastava N. Plant genomic DNA isolation; an art or a science[J]. Biotechnology journal, 2007, 3(2): 86-92.
[4] Ausubel F M, Brent R, Kingston R E, et al 精编分子生物学实验指南[M]. 颜子颖,王海林译.北京:科学出版社,2002:37-38.
[5] 张慧蓉,乔玉山,曹尚银,等.几个杏李品种成熟叶片基因组 DNA 的提取[J].江西农业学报,2008,20(10):4-6.
[6] Michaels S D, John M J, Amasino R M. Removal of polysaccharides from plant DNA by ethanol precipitation[J]. BioTechniques, 1994, 17: 274-276.
[7] 李莉,彭建营,白瑞露,等.不同方法对枣叶片总 DNA 提取效果的影响[J].果树学报,2007,24(3):389-392.
[8] 李学营,彭建营,彭士琪.部分枣属植物硅胶干燥叶片 DNA 提取方法的比较[J].河北农业大学学报,2006,29(1):38-40.
[9] 王卓伟,余茂德,鲁成. PVP 在桑叶总 DNA 提取中的应用[J].西南农业大学学报,2001,23(1):61-65.
[10] 余晓丽,范喜梅,刘实.木香基因组 DNA 的提取方法[J].东北林业大学学报,2007,35(8):10-15.
[11] 陈光富,杨琴军,陈龙清.台湾杉 DNA 提取及 RAPD 反应体系的建立[J].湖北农业科学,2008,47(10):1108-1121.
[12] 余晓丽,范喜梅,曾万勇,等.黄刺玫基因组 DNA 提取方法的研究[J].西北农业学报,2007,16(4):272-274.

Comparative Research of Four Kinds of Modified CTAB Extraction of Genomic DNA of *Celtis koraiensis* Nakai

ZHAO Jing, YE Huan, LI Xue-song, LI Jian-hua

(College of Life Science and Technology, Xiaogan University, Xiaogan, Hubei 432003)

鸳鸯茉莉不同外植体诱导愈伤组织研究初探

袁 媛, 连芳青

(江西农业大学 园林与艺术学院, 江西 南昌 330045)

摘 要:以鸳鸯茉莉花瓣、叶片、茎段为外植体, MS 为基本培养基, 探索外植体取材季节和部位对污染的影响; 分析植物生长调节剂的种类、浓度对不同外植体诱导愈伤组织的影响和最适组合。结果表明: 在 3、4 月取材比 5、6 月好, 12 月取材效果较差; 通过花瓣能成功诱导出健康的愈伤组织, 但诱导率较低 (27.1%), 平均出愈时间为 23~25 d, 3 种外植体中以嫩叶诱导愈伤组织的效果最好 (87.1%), 平均出愈时间最短, 为 18~20 d; 茎段愈伤组织诱导率其次 (68.1%), 平均出愈时间为 21~23 d; 2,4-D、6-BA 对以花瓣为外植体诱导愈伤组织的影响达显著水平, 花瓣诱导愈伤组织的最适培养基为 MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 1.5 mg/L+2,4-D 1.0 mg/L, 2,4-D 对叶片诱导愈伤组织的影响达显著水平, 叶片诱导愈伤组织的最适培养基为 MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 1.0 mg/L+2,4-D 1.0 mg/L, 2,4-D、6-B 对茎段诱导愈伤组织的影响达到极显著水平; MS+6-BA 3.0 mg/L+KT 3.0 mg/L+NAA 1.0 mg/L+2,4-D 1.0 mg/L 最适合茎段诱导愈伤组织。

关键词: 鸳鸯茉莉; 外植体; 生长调节剂; 愈伤诱导率

中图分类号: S 685.16 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2010)01-0168-04

鸳鸯茉莉 (*Brunfelsia latifolia* Benth.) 是茄科 (Solanaceae) 鸳鸯茉莉属常绿矮灌木, 花多单生, 有时数朵组成聚伞花序。花冠高脚碟形, 径约 3.8 cm, 花具芳香。花期 4~10 月。性喜温暖湿润气候, 不耐寒。要求肥沃疏松、排水良好的微酸性土壤。喜肥, 不耐涝, 不耐强光^[1-3]。

鸳鸯茉莉初开时为淡紫色, 后变为淡雪青色, 最后变为白色, 由于开花有先后, 在同一植株上同时能看到不同颜色的花, 故又得名“双色茉莉”。具有“一卉能熏一室香, 炎天犹觉玉肌凉”的诗意和极高的观赏价值, 深得人们的喜爱^[3]。

鸳鸯茉莉不结实或结实很少, 繁殖方式多采用扦插、高空压条, 但繁殖系数较低, 扦插生根较难, 生根率仅 8.9%, 且生根所需时间长, 扦插苗生长势差^[4]。远不能满足日益增长的市场需求, 通过组织培养技术可有效提高其繁殖系数。鸳鸯茉莉是木本植物, 一般用茎段作外植体组织培养分化再生植株, 自 1986 年报道过成功离体培养双色茉莉嫩叶后^[5], 以愈伤组织途径再生植株的报道很少。探索建立愈伤无菌体系的最适外植体类型及诱导培养基对以后探索愈伤增殖、分化出芽、小苗生根最适培养激素组合进而通过后一种再生途径成功获得完整植株奠定基础。此外, 首次以花瓣为外植体, 探索产生愈伤组织到分化成完整植株的可行性。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料为江西农业大学花卉教学基地温室大棚内生生长多年的 3 盆鸳鸯茉莉。

第一作者简介: 袁媛 (1988-) 女, 湖北人, 在读硕士, 现主要从事园林植物栽培与繁育研究工作。Email: hotley258@163.com。

通讯作者: 连芳青 (1953-) 女, 教授, 硕士生导师, 现从事园林花卉栽培学教学与科研工作。E-mail: lianfangqing@163.com。

收稿日期: 2009-09-10

Abstract: Four improved CTAB methods were used to extract genomic DNA from mature leaves of *Celtis koraiensis* Nakai and the extraction effect of the 4 methods was compared. The results showed that the 4 methods obtained no browning and intact genomic DNA. The method 2 (low concentration ethanol and high salt were used to remove polysaccharide) and 4 (only low concentration ethanol was used to remove polysaccharide) had the better effect of removing polysaccharide but with lower DNA concentration than the method 1 and 3. The ISSR amplification results showed that the genomic DNA extracted by the 4 methods could be used for ISSR amplification but the DNA from the method 2 and 3 had the better effect of ISSR amplification than the other three methods.

Key words: *Celtis koraiensis* Nakai; modified CTAB; genomic DNA; polysaccharide; browning