

不同方法提取牛心朴子基因组 DNA 效果的比较研究

贝 盞 临, 张 欣, 杜 进, 罗 禄 军

(北方民族大学 生物科学与工程学院, 宁夏 银川 750021)

摘 要:以牛心朴子的叶片、茎段、根为试材,采用改良的 CTAB 法 I、CTAB 法 II 和 SDS 法对其进行了基因组 DNA 提取效果的比较分析。结果表明:CTAB 法 I 从 3 个部位都能提出较高浓度的 DNA,电泳条带完整清晰;CTAB 法 II 从 3 个部位都能提出 DNA,条带明亮,但有明显拖尾现象;SDS 法从叶片中能提出较高的 DNA,但从茎和根中所提的 DNA 含量较小,电泳条带暗;3 种方法所提的 DNA 其 RAPD 扩增效果以 CTAB 法 I 最好,CTAB 法 II 次之,SDS 法最差。叶片提取的 DNA 平均纯度、浓度和得率为最高,RAPD 扩增效果最好,茎次之,根最低。说明 CTAB 法 I 是牛心朴子 DNA 的高效提取方法,不同部位以牛心朴子叶子提取的 DNA 得率高,扩增效果最好。

关键词:牛心朴子;基因组 DNA;CTAB 法;SDS 法

中图分类号:S 567.23⁺9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2011)18-0135-03

牛心朴子(*Cynanchum komarovii* Al.)又称老瓜头、黑心脖子、芦苕草。据内蒙古植物志记载,牛心朴子属萝藦科(Asclepiadaceae)鹅绒藤属(*Cynanchum* L.)^[1]多年生直立或半直立丛生草本植物,广泛生长在次生沙漠中的半固定沙丘和荒漠流沙区,主要分布于内蒙古、宁夏、甘肃等省(区),是沙化进程中为适应环境而保存下来的沙漠生态型植物,也是一种良好的蜜源植物,其鲜草有毒,但干枯的全草是很好的饲草。据姚宇澄等测定,牛心朴子的化学成分主要含有生物碱、挥发油、黄酮类糖类、甾体、甙、脂肪酸、脂肪酸酯及芳香族化合物等。民间用它作绿肥与杀虫剂,藏医用它退烧、止泻、治胆囊炎。其提取物在农业生产方面有较多的应用,如抗菌、抗病毒、杀虫等;而且其在医学领域也具有一定的抗菌、抗病毒、抗肿瘤、抗炎及镇痛的作用,另有资料表明,它还具有一定的增强机体免疫力的作用^[2-3]。

该试验以牛心朴子为材料,选用不同 DNA 提取方法,分别提取牛心朴子 3 个部位(叶片、茎段、根)的基因组 DNA,并进行比较分析。旨在寻找适合于牛心朴子基因组 DNA 的高质量、高效率提取方法,为在分子水平展开对牛心朴子的研究奠定试验基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

第一作者简介:贝盞临(1975-),男,硕士,讲师,现主要从事普通生物学教学与研究工作。E-mail:realpal00147@163.com。

基金项目:国家民委生态系统模型及应用重点实验室资助项目(2010SY08)。

收稿日期:2011-06-17

植物材料:成熟的牛心朴子(取自北方民族大学实践基地);**试剂:**液氮、CTAB、SDS、Tris-HCl(pH 8.0)、EDTA、PVP、饱和酚、氯仿、异戊醇、无水乙醇、70%乙醇、NaCl、 β -巯基乙醇、无菌水、琼脂糖、TAE 缓冲液、溴酚蓝、冰醋酸、EB、*Taq* DNA 聚合酶、随机引物、dNTP mixture、PCR Lodding buffer(含 Mg^{2+})等;**器材:**研钵、移液枪、1.5 mL 离心管、PCR 管、LG 微波炉、北京六一仪器厂 DYY-12 型电泳仪、HH-4 恒温数显水浴锅、Sigma 3K30-12154 型高速冷冻离心机、DU800 核酸蛋白检测仪、SDS-8000 UVP 凝胶成像系统、PCR 仪等。

1.2 试验方法

1.2.1 CTAB 法 I 提取缓冲液配制:0.2% CTAB、1.5 mol/L NaCl、100 mmol/L Tris-HCl(pH 8.0)、20 mmol/L EDTA、0.2% β -巯基乙醇(用前加入)、0.4% PVP(用前加入);**提取方法:**分别取牛心朴子叶片、茎和根,用蒸馏水洗净吹干,各称取 0.5 g,置研钵中,加入充足液氮,迅速充分研磨(10 min)然后将其移入 1.5 mL 离心管中,加入 250 μ L 预热的 CTAB 提取缓冲液。65℃ 水浴振荡 40 min(轻轻振荡,避免机械损伤),-20℃ 降温 10 min,离心(10 000 r/min、4℃、10 min)。取上清液转至另一个 1.5 mL 离心管中,加入等体积酚:氯仿:异戊醇(25:24:1),混匀,离心(10 000 r/min、4℃、10 min)。将上清液转至另一个 1.5 mL 离心管中,加入等体积氯仿:异戊醇(24:1),离心(10 000 r/min、4℃、10 min)。将上清液转至另一离心管中,加入等体积无水乙醇(提取效果好可见絮状沉淀),-20℃ 保存 30 min,离心(10 000 r/min、4℃、10 min);小心倒掉上清液,沉淀用 70%乙醇洗 3 次,每次 10 000 r/min、4℃、离心 5 min;弃乙醇,室温干燥 DNA,加入

200 μL TE(10 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 1 mmol/L EDTA)或者无菌水溶解 DNA, -20°C 保存。

1.2.2 CTAB 法II CTAB 法II与 CTAB 法I相比,去掉了步骤(3)和(5),即少了一步水浴振荡和抽提。

1.2.3 SDS 法 提取缓冲液的配制:0.2 mol/L Tris-HCl(pH 8.0)、50 mmol/L EDTA、100 mmol/L NaCl、0.2% β -巯基乙醇(用前加入)、0.4%PVP(用前加入);提取方法:分别取牛心朴子叶片、茎和根,用蒸馏水洗净吹干,各称取 0.5 g,置研钵中,加入充足液氮,迅速充分研磨(10 min)然后将其移入 1.5 mL 离心管中,加入 250 μL 预热的 SDS 提取缓冲液。 65°C 水浴振荡 40 min(轻轻振荡,避免机械损伤), -20°C 降温 10 min,离心(10 000 r/min、 4°C 、10 min)。取上清液转至另一个 1.5 mL 离心管中,加入等体积酚:氯仿:异戊醇(25:24:1),混匀,离心(10 000 r/min、 4°C 、10 min)。将上清液转至另一个 1.5 mL 离心管中,加入等体积氯仿:异戊醇(24:1),离心(10 000 r/min、 4°C 、10 min)。将上清液转至另一离心管中,加入等体积无水乙醇(提取效果好可见絮状沉淀), -20°C 保存 30 min,离心(10 000 r/min、 4°C 、10 min);小心倒掉上清液,沉淀用 70%乙醇洗 3 次,每次 10 000 r/min、 4°C 、离心 5 min;弃乙醇,室温干燥 DNA,加入 200 μL TE(10 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 1 mmol/L EDTA)或者无菌水溶解 DNA, -20°C 保存。

1.3 DNA 质量检测

1.3.1 纯度、浓度检测 取 1 μL DNA 样液,用 ddH₂O 稀释 50 倍,以 ddH₂O 为空白对照,用核酸蛋白检测仪测定样品 OD₂₆₀ 与 OD₂₈₀ 的比。以 OD₂₆₀ 计算 DNA 浓度。DNA 浓度计算公式: $C(\text{dsDNA}) = 50 \times \text{OD}_{260} \times \text{稀释倍数}$, 浓度单位为 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

1.3.2 电泳检测 凝胶的配制:称取 0.4 g 琼脂糖溶于 50 mL 1×TAE 缓冲液,微波炉加热融化,稍冷却后加入一小滴 EB,混匀,倒入胶板,冷却凝固后即成为 0.8% 的凝胶。点样:用移液枪取 2 μL 加样缓冲液与 5 μL DNA 样品混匀,然后点入凝胶孔中。电泳:100 V 电泳 45 min 左右。当溴酚蓝染色液移动到距胶前 2 cm 左右时停止电泳,取出照相。

1.4 RAPD 扩增检测

用 ddH₂O 补充至 25 μL 。扩增反应程序: 94°C 预变性 2 min;用 ddH₂O 补充至 25 μL 。扩增反应程序: 94°C 预变性 2 min; 94°C 变性 1 min, 36°C 退火 1 min; 72°C 延伸 2 min,40 个循环;然后 72°C 延伸 10 min; 4°C 保存。25 μL PCR 反应体系:PCR loading buffer 2.5 μL , dNTP mixture 2.0 μL , 模板 DNA 1.0 μL , Taq DNA 聚合酶 1 U, 取 0.4 μL , Mg^{2+} 2.5 μL , 引物 1.0 μL 。按以上体系和程序,先筛选引物,该试验所用随机引物购自宁夏昕泰生物公司;通过 40 组引物的筛选,该试验选择 09A08113 号随机引物,序列为 5'-TgAgggggAA-3'。然后用该引物再对各 DNA 提取样品进行 PCR 扩增;扩增完成后,取 10 μL 样品与 2 μL 上样缓冲液混匀点样,100 V 电泳,照相。

2 结果与分析

2.1 不同方法提取牛心朴子不同部位基因组 DNA 结果分析

2.1.1 不同部位及不同提取方法所得 DNA 纯度和浓度测定结果比较 从 DNA 样品的测定结果可以看出(表 1),2 种 CTAB 法提取的不同部位的 DNA,其 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 均值高于 1.80,说明得到的 DNA 中均含有 RNA(OD₂₆₀/OD₂₈₀ 为 1.6~1.8 时, DNA 纯度较好,大于 1.8 说明 RNA 含量高,小于 1.6 说明蛋白和杂质含量高);而用 SDS 法提取的不同部位 DNA, OD₂₆₀/OD₂₈₀ 均小于 1.7,说明得到的 DNA 蛋白含量高。用 3 种方法在提取过程中发现, DNA 抽提液颜色 CTAB 法 I 为无色、CTAB 法 II 为淡黄色、SDS 法为黄色,表明这 3 种提取方法对去除植物多酚及色素的效果不同, CTAB 法 I 可以更加有效地去除色素、抑制酚类物质的褐变,使色素及酚类物质在提取过程中基本除去,而 SDS 法和 CTAB 法 II 去除效果相对较差。就 DNA 的产量而言,所有样品用 CTAB 法 I 提取的 DNA 浓度、得率都相对较高,而用 SDS 法和 CTAB 法 II 提取的 DNA 产率相对较低,虽也偶有浓度、得率较高的,但是 SDS 法和 CTAB 法 II 提取的 DNA 带有一定的颜色, SDS 法提取的 DNA 颜色更深些;综合以上分析初步推测, CTAB 法 I 提取的牛心朴子 DNA 的质量应该好于其它 2 种方法。从 DNA 样品的测定结果还可以看出,牛心朴子不同部位所提基因组 DNA 的质量也有差异,叶片的浓度和得率相对较高、茎次之、根最低(表 1)。

表 1 不同提取方法所得 DNA 样品的测定结果

部位	方法	OD ₂₆₀	OD ₂₈₀	OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀	浓度	得率
					$\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	$\mu\text{g} \cdot \mu\text{g}^{-1}$
叶片	CTAB 法 I	0.6053	0.3113	1.9440	1 513	121
	CTAB 法 II	0.5490	0.2501	2.1951	1 372	109
	SDS 法	0.4320	0.2013	1.6420	1 080	86
茎段	CTAB 法 I	0.5151	0.2549	2.0201	1 287	102
	CTAB 法 II	0.4526	0.2248	2.1827	1 131	78
	SDS 法	0.4778	0.2357	1.5436	1 194	64
根	CTAB 法 I	0.3927	0.1984	1.9793	981	112
	CTAB 法 II	0.4552	0.2118	2.1492	1 138	70
	SDS 法	0.4877	0.2324	1.4670	1 219	54

2.1.2 电泳结果比较 电泳结果显示(图 1), SDS 法在牛心朴子的茎和根中几乎未提取出 DNA, 在叶片中虽提取出了 DNA, 但条带相对较微弱, 说明此方法不能有效提取牛心朴子基因组 DNA, 特别是提取其根中的 DNA; 其余 2 种方法均在牛心朴子不同部位中提出了 DNA, CTAB 法 II 提取的茎段 DNA 条带相对较弱, 而在叶和根中有严重拖尾现象, 说明 RNA 含量很高, 质量不高; CTAB 法 I 在牛心朴子 3 个部位提取的 DNA 电泳条带都较亮, 虽然也有一定的拖尾现象形成(可能是含 RNA, 也可能是 DNA 有一定程度的降解), 但相对另 2 种方法提取的 DNA, 拖尾较低, 说明提取的 DNA 质量较好; CTAB 法 I 提取的 3 个部位的 DNA 亮度较均匀一致, 质量较高。从图 1 还可以看出, 3 种方法从叶片中提取出的 DNA 条带最亮、最清晰, 说明牛心朴子叶片较容易获得完整性好、纯度高的基因组 DNA。

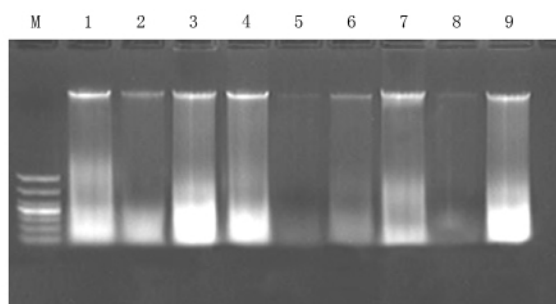


图1 牛心朴子 DNA 的电泳图谱

注: M; DNA Marker, 1~3; 叶片, 4~6; 茎, 7~9; 根; 1, 4, 7; CTAB 法I, 2, 5, 8; SDS 法, 3, 6, 9; CTAB 法II。

2.2 RAPD 扩增结果分析

以随机引物 09A08113(序列: 5'-TgAgggggAA-3')对所提 DNA 的质量进行进一步鉴定, 结果表明, 3 种方法提取的 DNA 的扩增效果存在有差异(图 2)。用 SDS 法从茎和根中提取的 DNA, PCR 反应扩增带少且不明显、不均匀; 而用 2 种 CTAB 法提取的牛心朴子 DNA 都有 RAPD 扩增带, 这与图 1 电泳图谱结果基本一致。用 SDS 法在叶片提取的 DNA 虽然有扩增带, 但条带相对另 2 种较弱; CTAB 法II所提的 DNA 条带亮, 但重复性不好, 在根中存在扩增不完全的现象, 同时在茎中存在一定弥散现象; 而 CTAB 法I所提取的牛心朴子不同部位的 DNA 其 RAPD 扩增都较完整, 条带清晰, 重复性较强, 是牛心朴子 DNA 提取的较理想的方法。从 3 个不同部位的 RAPD 扩增结果可以看出, 叶片的扩增效果较好, 而从茎和根中提取的 DNA 的扩增条或者不完全, 或者不清晰, 这可能是由于茎和根中的次生代谢物含量比叶片要高, 从而对其扩增结果有影响。

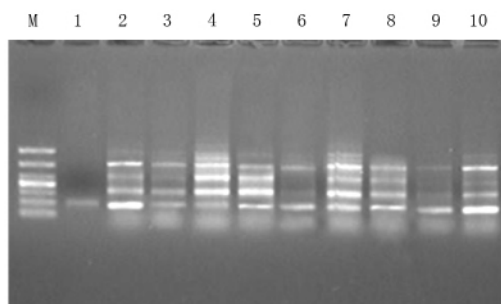


图2 牛心朴子 DNA 的 RAPD 扩增图谱

注: 随机引物 09A08113(序列: TgAgggggAA), M; DNA Marker, 1; 空白, 2~4; 叶片, 5~7; 茎, 8~10; 根; 2, 5, 8; CTAB 法I, 3, 6, 9; SDS 法, 4, 7, 10; CTAB 法II。

3 讨论

取牛心朴子 3 个不同部位(叶片、茎段、根), 用 3 种方法提取 DNA, 其中 CTAB 法II与 CTAB 法I相比, 少了水浴、分离和一步抽提, 减少了提取时间和降低了受机械损害程度。提取牛心朴子基因组 DNA 时, 由于多糖类、多酚类物质含量高而影响了 DNA 提取质量。在提取一开始就尽可能地避免或去除多糖与多酚等物质的干扰, 并且每一步操作都要轻、慢、稳, 保证 DNA 的完整性, 保证试验的顺利进行。试验中, 虽然 CTAB 法II相对于 CTAB 法I提取效果较差, 但是由于步骤少, 操作简单, 对 DNA 的破坏小, 成本也低, 因此, 该方法值得借鉴, 如果加以改进, 将也会是一种很好的 DNA 提取方法。

参考文献

- [1] 周德海, 宋玉川, 王玉军, 等. 牛心朴子草对烟草病毒病的防效试验[J]. 山东农业科学, 2007, 6(7): 1-2.
- [2] 贝盖临, 曹君迈, 雷茜, 等. 牛心朴子的组织培养与快速繁殖[J]. 种子, 2010(4): 42-44.
- [3] 汪仁莉, 张珠明, 何生虎, 等. 牛心朴子体外抑菌作用的研究[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(31): 1-3.

Comparison Study on Effects of Different Methods Extracted from *Cynanchum komarovii* Al. Genomic DNA

BEI Zhan-lin, ZHANG Xin, DU Jin, LUO Lu-jun

(College of Biological Science and Engineering, North Nationality University, Yinchuan, Ningxia 750021)

Abstract: Leaves, stems and roots of *Cynanchum komarovii* Al. were used as test material, using a modified CTAB I method, CTAB II method and SDS method to compared and analyzed the extraction effect of genomic DNA of *Cynanchum komarovii* Al. The results showed that, by the method of CTAB I all could extraction higher concentration of DNA, electrophoretic bands with complete and clear; CTAB II although the three parts could was made from DNA, bands was bright, but there were obvious smearing; SDS in the leaves to make DNA, but stems and roots of the DNA content of the proposed small electrophoretic bands was dark; three methods mentioned in the amplification of DNA the RAPD results with CTAB I was the best, CTAB II was the second, and SDS method was the worst; to different parts of *Cynanchum komarovii* Al. average purity, concentration and yield of DNA extracted from leaves was the highest, RAPD amplification was the best, followed by stem and root minimum. CTAB I was efficient DNA extraction methods of *Cynanchum komarovii* Al., to different parts of *Cynanchum komarovii* Al., the yield of DNA extracted from leaves was highest, amplified the best, that was easier to obtain high-quality leaf DNA.

Key words: *Cynanchum komarovii* Al.; genomic DNA; CTAB method; SDS method