

# 花椒 DNA 提取方法的研究

李 晓<sup>1</sup>, 杨途熙<sup>1</sup>, 魏安智<sup>2</sup>, 王 佳<sup>1</sup>, 帅焕丽<sup>2</sup>

(1. 西北农林科技大学 生命科学院, 陕西 杨凌 712100; 2. 西北农林科技大学 林学院, 陕西 杨凌 712100)

**摘 要:** 采用经过改良的 SDS 法和 CTAB 法对不同品种花椒进行基因组 DNA 提取, 用核酸蛋白分析仪测量 DNA 浓度, 将提取的基因组 DNA 进行 ISSR 分析, 以期找到一种提取花椒总 DNA 提取的最优方法。结果表明: 改良的 CTAB 法更适合花椒基因组 DNA 的提取, CTAB 法比 SDS 法提取的 DNA 纯度好, 所获得 DNA 样品的 OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 比值在 1.8~2.0 范围内, 琼脂糖凝胶电泳图谱显示条带清晰。

**关键词:** 花椒; DNA 提取; ISSR

中图分类号: S 573<sup>+</sup>.9 文献标识码: A 文章编号: 1001-0009(2011)07-0130-03

花椒属芸香科花椒属植物。原产我国, 主要产区有陕西、四川、甘肃、山西、河南、河北等地, 是特用经济树种<sup>[1]</sup>。我国是世界上花椒栽培面积、产量的第一大国。中国花椒自然群体中品种较多, 植株形态学差异较大, 种质资源十分丰富, 存在许多特异种质资源, 但通过分子生物学对花椒遗传多样性进行分析的研究报道很少<sup>[2]</sup>。DNA 的提取是分子生物学研究的基础; 样本 DNA 的浓度、纯度及结构的完整性是进行基因工程各项研究的必需条件, 而高效、高纯度的 DNA 提取方法是扩增检测成功的关键<sup>[3,4]</sup>。花椒叶片是提取 DNA 最方便的试验材料, 但其次生代谢产物较多, 其中多糖类酚类物质不仅严重干扰花椒总 DNA 的提取, 还会影响 PCR 反应的正常进行<sup>[5,7]</sup>。基于此, 该研究以花椒叶片为材料, 对 SDS 法和 CTAB 法进行改良比较, 以期找到适合花椒叶片基因组 DNA 提取的方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

试验材料包括采自陕西省凤县双十铺镇(N 33°55', E 106°52', 海拔 1 001~1 011 m)的凤县大红袍和重庆市江津区先锋镇(N 29°12', E 106°, 海拔 207~245 m)的九叶青花椒。

**第一作者简介:** 李晓(1986-), 男, 在读硕士, 研究方向为生物多样性。

**责任作者:** 杨途熙(1963-), 男, 副教授, 硕士生导师, 现主要从事生态学及植物资源利用等方面的教学与科研工作, 研究方向为植物资源的开发与利用。E-mail: y2848@126.com。

**基金项目:** 凤县花椒规范化生产技术示范推广资助项目(YLTG2006-2-14)。

**收稿日期:** 2010-12-27

### 1.2 DNA 提取方法

**1.2.1 SDS 法提取花椒基因组 DNA** 由 Dellaporta 等<sup>[8]</sup>的 SDS 方法改进而成。0.1 g 花椒幼嫩叶片(或 0.05 g 花椒叶片标本)在液氮中研磨成白色粉末装入离心管中。加入 800  $\mu$ L 的 SDS 提取液(临用前加入 2  $\mu$ L  $\beta$ -巯基乙醇, 20%的 PVP 100  $\mu$ L), 轻轻摇动至混合均匀, 65℃条件下水浴 30 min; 加入 90  $\mu$ L 15 mol/L 的 KAc, -20℃条件下冰浴 30 min; 4℃、10 000 r/min 离心 15 min; 取上清液, 加入等体积氯仿/异戊醇(V:V=24:1), 轻轻振动; 4℃、10 000 r/min 离心 15 min; 取上清液, 加入等体积异丙醇, 轻轻振动几下, 室温静置 30 min, 12 000 r/min 离心 10 min, 取沉淀加入预冷的 75%乙醇洗涤干燥; 沉淀用 500  $\mu$ L 双蒸水溶解, 静置 5 min, 加入等体积氯仿/异戊醇(V:V=24:1), 轻轻振动几下, 静置 10 min; 4℃、12 000 r/min 离心 10 min; 取上清液, 加入 1  $\mu$ L RNAase 混匀, 37℃, 1 h, 加入 600  $\mu$ L 氯仿/异戊醇(V:V=24:1), 轻轻晃动; 4℃、12 000 r/min 离心 10 min; 取上清液, 加入 2.5 mol/L 的醋酸铵 60  $\mu$ L, 加入 2 倍体积的无水乙醇, 室温静置 30 min, 12 000 r/min 离心 10 min; 去除上清, 沉淀干燥后, 用 30  $\mu$ L 双蒸水在 37℃水浴溶解 DNA, RNAase 消化 RNA。用微量紫外可见分光光度计检测 DNA 样品的浓度和纯度。最后样品 DNA 稀释至 50 ng/ $\mu$ L, 作为 PCR 反应的模板。

**1.2.2 CTAB 法提取花椒基因组 DNA** 根据 Murray 等<sup>[9]</sup>和 Saghai-Marroof 等<sup>[10]</sup>的 CTAB 法改进, 并使用聚乙烯吡咯烷酮(PVP)<sup>[11-12]</sup>。取 0.1 g 新鲜花椒叶片(标本样品用量减半)用液氮研磨至粉状。加 2%CTAB 提取液 800  $\mu$ L(临用前加入 2  $\mu$ L  $\beta$ -巯基乙醇, 20%的 PVP 100  $\mu$ L, 65℃水浴充分预热), 混匀后 65℃水浴 40 min, 中间每隔 15 min 轻轻摇晃 1 次; 取出冰浴 5 min, 然后等体

积加入等体积氯仿/异戊醇(V:V=24:1),充分混匀,4℃、12 000 r/min 离心 10 min;取上清加入等体积氯仿/异戊醇(V:V=24:1),充分混匀,4℃、12 000 r/min 离心 10 min;取上清加入 2 μL 的 10 mg/mL 的 RNase,混匀后 37℃水浴 30 min;取出加等体积氯仿:异戊醇(24:1)再抽提 1 次;取上清加 2 倍体积的冰乙醇,放入-20℃冰箱使 DNA 沉淀;用枪头吸出絮状沉淀,70%乙醇洗 3 次,晾干后溶于 50 μL 无菌水中,4℃溶解过夜。用核酸蛋白分析仪检测 DNA 样品的浓度和纯度。最后样品 DNA 稀释至 50 ng/μL,作为 PCR 反应的模板。

1.3 DNA 检测

1.3.1 紫外分光光度法检测 采用 ND-1000 微量紫外可见分光光度计(NanoDrop<sup>2</sup> ND-1000)检测基因组 DNA 在 230.260 和 280 nm 处的吸光值(OD<sub>230</sub>、OD<sub>260</sub>和 OD<sub>280</sub>),即可由计算机自动生成受检 DNA 的浓度和纯度。

1.3.2 琼脂糖凝胶检测 不同方法所提取 DNA 稀释至 50 ng/μL,在 1%琼脂糖凝胶中电泳,电泳缓冲液为 0.5×TAE,电压为 90 V,电泳大约 50 min 后,在紫外凝胶成像系统下观察 DNA 完整性,并拍照。

1.3.3 ISSR-PCR 检测 以改良 CTAB 法提取的 DNA 为模板,用 17 个碱基长度的 ISSR 引物扩增 选用 UBC873 号引物,其序列为 5'-GACAGACAGACAGACA-3'进行 ISSR 扩增。反应体系为 20 μL,1.5 U *Taq* DNA 聚合酶,2.0 mmol/L MgCl<sub>2</sub>,0.3 mmol/L dNTPs,0.3 mmol/L 引物,30 ng 模板 DNA。扩增程序为:94℃预变性 5 min,然后 94℃变性 30 s,55℃复性 45 s,72℃延伸 90 s,循环 40 次,最后 72℃再延伸 7 min。

2 结果与分析

2.1 DNA 提取

按照上述 2 种方法提取的花椒叶片总 DNA,经核酸蛋白分析仪检测,所有 DNA 样品的 OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 的比值均在 1.8~2.0 之间(表 1),说明 CTAB 法和 SDS 法都能有效地去除材料中的蛋白杂质。由图 1 可知,凝胶点样孔不干净,前端泳道小分子物质较多,说明 SDS 法不能有效的去除花椒样本中的多糖类和其它小分子物质。由图 2 可知, DNA 凝胶电泳点样孔清晰干净,前端小分子物质较少, DNA 质量较高。

表 1 不同提取方案提取 DNA 效果的比较

提取方法	材料	样品号	OD <sub>260</sub>	OD <sub>280</sub>	浓度 C /ng·μL <sup>-1</sup>
			/OD <sub>280</sub>	/OD <sub>230</sub>	
CTAB 法	凤县花椒(新鲜叶片)	1	1.835	1.998	503.6
	江津青花椒(新鲜叶片)	2	1.872	2.021	552.1
	凤县花椒(叶片标本)	3	1.844	1.94	190.4
	江津青花椒(叶片标本)	4	1.891	1.833	165.5
SDS 法	凤县花椒(新鲜叶片)	5	1.984	1.349	705.5
	江津青花椒(新鲜叶片)	6	1.848	1.656	798.7
	凤县花椒(叶片标本)	7	1.998	1.843	694.3
	江津青花椒(叶片标本)	8	1.857	1.594	662.9

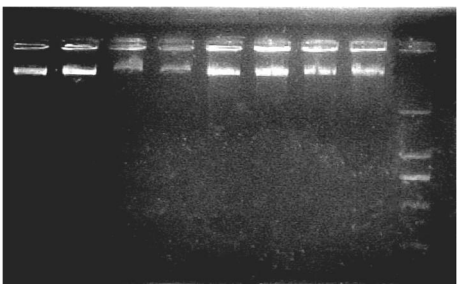


图 1 DNA 样本琼脂糖凝胶电泳结果  
注:自左到右第 1~4 泳道为 CTAB 法提取;5~6 泳道为 SDS 法提取。电泳顺序:1.凤县花椒(新鲜叶片);2.江津青花椒(新鲜叶片);3.凤县花椒(标本);4.江津青花椒(标本);5.凤县花椒(新鲜叶片);6.江津青花椒(新鲜叶片);7.凤县花椒(标本);8.江津青花椒(标本)。

2.2 ISSR 分析

用改良后 CTAB 法制备的 DNA 作为模板进行 ISSR-PCR 扩增。取 PCR 产物 10 μL 进行琼脂糖凝胶电泳。电泳结果,条带较清晰,扩增效果良好,不同品种之间呈现出较丰富的多样性。

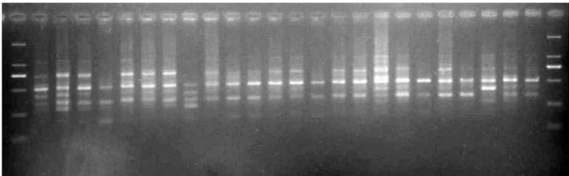


图 2 改良 CTAB 法提取的花椒样本 DNA,在引物 UBC873(共 24 个样本)PCR 扩增电泳图

3 结论与讨论

花椒的叶片组织细胞内,含有较多酚类和多糖类二次代谢产物,这些物质对酶活性和保存时间有很大影响。对于花椒 DNA 的提取,SDS 法虽提取率较高,但操作较复杂,产物中胶状不溶物和杂质较多,褐化严重。而相比于 SDS 法,CTAB 法虽然提取率较低,但能有效去除酚类和多糖类杂质,避免了 DNA 的降解和褐化,满足了 ISSR 等分子检测的要求。在抽提过程中加入 CTAB,可使蛋白质等大分子物质的除去更为彻底,同时与核酸形成特异的可溶性复合物,保护了 DNA 不受酚类物质的氧化损伤,同时氯仿的连续抽提可去除 CTAB、多糖和蛋白质复合物等杂质,提高了总 DNA 纯度。在提取缓冲液中加入 PVP 和 β-巯基乙醇,起到了防止多酚类物质的氧化作用,避免了 DNA 快速降解的可能。PVP 可以很好地抑制多酚氧化酶和细胞色素氧化酶的活性,是一种用途广泛的稳定剂和抗氧化剂,可减轻杂质的干扰。β-巯基乙醇具有抗氧化作用,增加其浓度,可防止氧化褐变,获得较好的 DNA 提取结果。这 2 种物质的加入,使改良 CTAB 法提取的 DNA 纯度较高,且颜色为纯白色。从 DNA 提取纯度和完整性看,改良 CTAB 法较 SDS 法更适用于花椒 DNA 的提取。

对于试验材料的选取,形态差异较大的花椒和青花

椒都取得了较满意的提取效果,而采样初期对材料的不同处理对 DNA 的提取有一定影响,相比于花椒标本,以花椒嫩叶作为材料进行总 DNA 的提取效果更好。该研究对比了 2 种不同的方法和不同的试验材料,结果表明,采用不同方法和材料提取花椒基因组 DNA 的质量和纯度不同。该试验利用花椒嫩叶作为材料,采用改良 CTAB 法,取得了比较满意的结果。

### 参考文献

- [1] 庄世宏,李孟楼.花椒籽油的成分分析[J].西北农业学报,2002,11(2):43-45.
- [2] 毕君,赵京献,王春荣等.国内外花椒研究概况[J].经济林研究,2002,20(1):46-48.
- [3] 邱国华,徐增富,曹吉祥等.一种简单实用的提取植物 DNA 的方法[J].植物生理学通讯,1997,33(5):368-369.
- [4] 易庆平,罗正荣,张青林等.植物总基因组 DNA 提取纯化方法综述[J].安徽农业科学,2007,35(25):7789-7791.
- [5] 毕君,曹福亮.花椒属植物化学有效成分与开发利用研究进展[J].林业科技开发,2008,22(3):9-13.

- [6] Guillemant P, Maréchal D L. Isolation of plant DNA: a fast, inexpensive and reliable method[J]. Plant Molecular Biology Reporter, 1992, 10(1): 60-65.
- [7] Fang G, Hammar S, Gruniet R. A quick and inexpensive method for removing polysaccharides from plant genomic DNA[J]. Biotechniques, 1992, 13(1): 52-54, 56.
- [8] Dellaporta S L, Wood J, Hicks J B. A plant DNA miniprep: version II[M]. Plant Mol. Biol. Rep., 1983, 19-21.
- [9] Murray M G, Thompson W F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA[J]. Nucleic Acids Res., 1980(8):4321-4325.
- [10] Saghai Maroof M A, Soliman K M, Jorgensen R A, et al. Ribosomal DNA spacerlength polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location and population dynamics[J]. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1984, 81: 8014-8018.
- [11] Cough J A, Fritz P J. Isolation of DNA from plants high in polyphenolics[J]. Plant Mol. Biol. Rep., 1990(8): 8-12.
- [12] Kim C S, Lee C H, Shin J S. Simple and rapid method for isolation of high quality genomic DNA from fruit trees and conifers using PVH[J]. Nucleic Acids Res., 1997, 25: 1085-1086.

## Explore about the Method for Extracting DNA of *Zanthoxylum* L.

LI Xiao<sup>1</sup>, YANG Tu-xi<sup>1</sup>, WEI An-zhi<sup>2</sup>, WANG Jia<sup>1</sup>, SHUAI Huan-li<sup>2</sup>

(1. College of Life Sciences, Northwest Agricultural and Forestry University, Yangling, Shaanxi 712100; 2. College of Forestry, Northwest Agricultural and Forestry University, Yangling, Shaanxi 712100)

**Abstract:** The sodium dodecyl sulfate (SDS) and improved cetyltriethyl ammonium bromide (CTAB) methods were used for the genomic DNA extraction of two kinds of *Zanthoxylum* plants in order to explore an efficient method for extracting genomic DNA from *Zanthoxylum* L. The results showed that the improved CTAB method was more suitable for the DNA extraction of *Zanthoxylum* plant. The improved CTAB method of extracting genomic DNA from *Zanthoxylum* plants was better than the SDS method, and the DNA purity of the former was higher than that of the latter. The OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> ratio of the extracted DNA with the improved CTAB method was in the range from 1.8 to 2.0 and distinct bands were found in the agarose gel electrophoresis map of ISSR.

**Key words:** *Zanthoxylum* L.; DNA extraction; ISSR

## 蔬菜品种——青菜

青菜原产我国,科学名称叫白菜,北方叫油菜,也有叫它小白菜的。长江以南为主要产区,四季生产,周年供应,是最受群众喜爱、消费量最大的一种蔬菜,更是上海人的当家菜。广为流传的“三天不见青,喉咙冒火星”中的“青”,指的就是青菜。可见,青菜在上海市民的蔬菜消费中占有何等重要的地位。

青菜性喜冷凉,又较耐低温和高温,几乎一年到头都可种植青菜,并有青菜上市(当然在最热月份主要上市小白菜、鸡毛菜)。但如果从适口性、安全性和营养性看,1、2、3月则是青菜消费的最佳季节。

冬季的青菜,经过低温锻炼,体内的碳水化合物转化为糖,油脂含量增加,可溶性蛋白质、不饱和脂肪酸、磷脂含量增加,从而提高了耐寒能力。对于消费者来说,更富营养性。吃起来软糯可口,清香鲜美,带有甜味。冬天生长慢,干物质积累多。秋季炒青菜会渗出水来;冬季炒青菜时却要往锅里加些水,原因就这里。

青菜,害虫特别喜欢吃。菜农不得不经常喷洒农药。冬季天冷,害虫处在越冬期(冬眠),不需喷药。因此,冬季吃青菜,无农药污染之虑,可以放心食用。

青菜的可贵之处不仅在于含有丰富的维生素C(约为番茄的3倍),而且含有大量不饱和脂肪酸,有利于预防心血管疾病;还含有复合碳水化合物和改性果胶,可降低癌症危险性。