

不夜城芦荟基因组 DNA 提取方法的比较研究

刘思言¹, 姚 丹¹, 关淑艳¹, 王丕武², 宋晨雪¹

(1. 吉林农业大学 生命科学学院, 吉林 长春 130118; 2. 吉林农业大学 农学院, 吉林 长春 130118)

摘 要:以不夜城芦荟的幼嫩叶片为试材, 分别采用 SDS 法和 CTAB 法以及简化的 CTAB 法对基因组 DNA 进行提取, 并利用紫外分光光度计和琼脂糖凝胶电泳法检测其 DNA 的浓度、纯度及质量, 以期筛选不夜城芦荟基因组 DNA 提取的最合适方法。结果表明: 对比不夜城芦荟基因组 DNA 提取的 3 种方法, 无论从提取浓度还是纯度上来看, SDS 法均明显优于其它方法。

关键词:不夜城芦荟; 基因组 DNA 提取; SDS 法; CTAB 法

中图分类号:S 682.33 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)03-0104-03

芦荟(*Aloe*)属单子叶植物纲百合科芦荟属多年生多浆常绿草本植物, 也称油葱、纳会、象胆、奴会^[1], 其名称源于阿拉伯语(Alloeh), 其义是“苦而有光”, 广泛分布于热带、亚热带地区。芦荟有许多种类, 目前已知有 300 多个种, 其中比较常见的有美国库拉索芦荟、木立芦荟、中华芦荟、不夜城芦荟等, 其中不夜城芦荟因其外形美观, 近年来常常被作为观赏植物, 深受人们喜爱。

芦荟中含有近 200 种化学成分, 主要包括蒽醌类次生代谢物和芦荟多糖等^[2]。芦荟凝胶可以治疗各类皮肤病, 具有很好的抗菌消炎作用, 对心脑血管病、胃肠道溃疡疗效也较好。另外, 芦荟也常常用于美容保健、护发生发、防晒护肤等领域, 完美芦荟胶的主要成分就是芦荟凝胶。在食品工业中, 各种含有芦荟成分的饮料和酸奶等已经走入人们的生活^[3]。

随着分子生物学的发展, 很多人把目光转到芦荟的遗传转化研究方面^[4-6]。对于植物转基因研究而言, 基因组 DNA 的提取效率、尤其是 DNA 的纯度会影响试验的最终结果。因此, 确定出某种植物最适的 DNA 提取方法, 对该植物分子生物学研究具有重要的参考价值^[7-8]。该试验以不夜城芦荟为试材, 采用 SDS 法、CTAB 法以及简化的 CTAB 法提取不夜城芦荟基因组 DNA, 力求筛选省时省力又高效的不夜城芦荟基因组 DNA 提取方法, 为不夜城芦荟的分子生物学研究提供

第一作者简介:刘思言(1979-), 女, 吉林四平人, 硕士, 讲师, 研究方向为生物技术。E-mail: siyan_2001@163.com.

责任作者:王丕武(1958-), 男, 吉林蛟河人, 博士, 教授, 博士生导师, 现主要从事生物技术及作物遗传育种等研究工作。

基金项目:吉林省科技厅科技引导计划资助项目(201101111); 吉林省教育厅科学技术研究资助项目(2011-41); 吉林农业大学校内启动基金资助项目(201242)。

收稿日期:2012-10-23

[12] 付长亮, 马小军, 白隆华, 等. 罗汉果组织培养研究进展[J]. 中国中药杂志, 2005, 30(5): 325-328.

[13] 孙琦, 张春庆. 植物脱毒与检测研究进展[J]. 山东农业大学学报(自然科学版), 2003, 34(2): 307-310.

Study on Stem Apex Detoxification of *Siraitia grosvenorii*

WU Qun-ying¹, LI Bo-lin², LI Jing-yun³

(1. Guilin Medical University, Guilin, Guangxi 541004; 2. Guangxi Normal University, Guilin, Guangxi 541004; 3. Guangxi Traditional Chinese Medical University, Nanning, Guangxi 530001)

Abstract: *Siraitia grosvenorii* in vitro was used as material in this experiment to eliminate Luohanguo mosaic virus (WMV-2-Luo) by combing tissue culture of shoot-tip with heat therapy, and detected by indirect ELISA method and electron microscope. The results showed that the suitable time for heat treatment was 7~15 days, the survival rate of tissue culture seedling was up to 90%~100%; 0.2~0.5 mm shoot-tip with heat treatment by 38.5°C for 10 days of *Siraitia grosvenorii* were 100% free from WMV-2-Luo.

Key words: Luohanguo mosaic virus (WMV-2-Luo); stem apex detoxification; ELISA

理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为不夜城芦荟的幼嫩叶片。SDS 法提取试剂:(1)DNA 提取液:100 mmol/L Tris · Cl(pH 8.0); 50 mmol/L EDTA (pH 8.0); 500 mmol/L NaCl; 10 mmol/L β-巯基乙醇,(2)5 mol/L KAC,(3)10% SDS,(4) TE 缓冲液:10 mmol/L Tris · Cl(pH 8.0); 1.0 mmol/L EDTA(pH 8.0)。CTAB 法提取试剂:(1)2×CTAB 提取缓冲液:2.0 g 100 mL CTAB; 1.4 mol/L NaCl; 20 mmol/L EDTA; 100 mmol/L Tris · Cl(pH 8.0),(2)PVP (聚乙烯吡咯烷酮),(3)TE 缓冲液:10 mmol/L Tris · Cl(pH 8.0); 1.0 mmol/L EDTA(pH 8.0)。

1.2 试验方法

1.2.1 芦荟基因组 DNA 的提取方法 SDS 法:(1)取新鲜叶片若干置液态氮中研磨成粉,将冻粉转移至提前加入 PVP 的离心管中,迅速加入 65℃预热的 800 μL DNA 提取液,轻轻晃动,使冻粉充分散开。(2)加入 200 μL 10% SDS,充分混匀,置 65℃水浴中轻轻晃动,以保证提取的充分,10~15 min 后,再加 160 μL 5 mol/L KAC,充分混匀,冰浴中放置 30 min。(3)12 000 r/min 离心 15 min,将上清液转入另 1 个离心管中加入等体积的氯仿/异戊醇(24:1),轻轻颠倒离心管使之混合均匀,放置片刻。(4)8 000 r/min 离心 10 min,按步骤 3 反复抽提 2~3 次。(5)将上清液转移至另 1 个离心管中,加入 2 倍体积的无水乙醇,轻轻混匀,置 -20℃沉淀 1 h。(6)8 000 r/min 离心 10 min,倒掉上清液用 70%乙醇洗涤沉淀 2~3 次,自然吹干后用 20 μL RTE 回溶沉淀。(7)37℃保温 1 h,置 -20℃冰箱中保存备用^[9]。CTAB 法:(1)取新鲜叶片若干置液态氮中研磨成粉,将冻粉转移至提前加入 PVP 的离心管中,迅速加入 600 μL CTAB 提取液,65℃水浴 30 min,水浴过程中轻轻晃动,以保证提取的充分。(2)取出离心管,冷却至室温,加入等体积的氯仿/异戊醇(24:1)轻缓颠倒混匀,静止 10 min。(3)10 000 r/min 离心 10 min,取上清液于新离心管中,加入 2/3 倍体积的异丙醇,轻缓颠倒混匀,静置 10 min。(4)10 000 r/min 离心 10 min 去上清液,用 70%的乙醇洗涤沉淀 2~3 次,室温下微干,溶于 200 μL TE 缓冲液中。(5)用等体积的氯仿/异戊醇(24:1)抽提 1~3 次。(6)取上清液,加入 0.5 倍体积的 1.0 mol/L NaCl,轻轻颠倒混匀,使之溶解,再加入 2 倍体积的无水乙醇,轻轻颠倒混匀,静置 1 h。(7)8 000 r/min 离心 10 min,除去上清液,用 70%的乙醇洗涤沉淀 2 次,自然干燥后溶于 20 μL RTE 缓冲液中。(8)37℃保温 1 h,置 -20℃冰箱中保存备用^[10-11]。简化的 CTAB 法:将上述方法中

(4)~(6)步省略,其余步骤不变。

1.2.2 DNA 质量检测 电压 5 V/cm,核酸染料染色,1%琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 提取的质量。

1.2.3 DNA 纯度和浓度的检测 利用核酸蛋白质分析仪[NanoDrop(ND-1000)Spectrophotometer]测定 DNA 样品在 OD₂₆₀/OD₂₃₀ 及 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 波长处的紫外吸收比值,从而确定样品的纯度及浓度。

2 结果与分析

2.1 琼脂糖凝胶电泳检测

2.1.1 SDS 法提取的基因组 DNA 琼脂糖凝胶电泳结果 由图 1 可知,Marker 条带较清晰,第 1、4、5、8 号条带较明亮,DNA 提取效果较好,第 2、3、6、7 号条带稍暗,所有条带未出现拖尾现象。

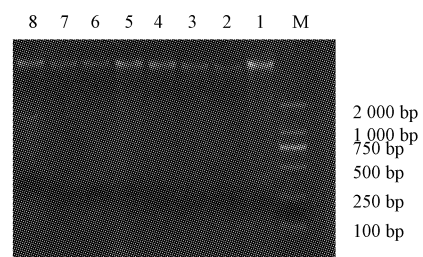


图 1 SDS 法提取的基因组 DNA 琼脂糖凝胶电泳图谱

Fig. 1 Electrophoresis pattern of DNA of *Aloe nobilis* extracted by SDS method

注:M 为 DNA 2000 Marker,1~8 为提取的样品 DNA。

2.1.2 CTAB 法提取的基因组 DNA 琼脂糖凝胶电泳结果 由图 2 可以看出,Marker 条带较清晰,图中所有条带均很明亮,第 2、4、5、8 号条带出现明显的拖尾现象。

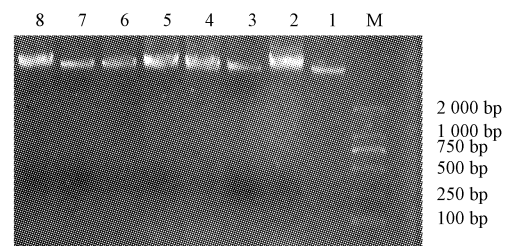


图 2 CTAB 法提取的基因组 DNA 琼脂糖凝胶电泳图谱

Fig. 2 Electrophoresis pattern of DNA of *Aloe nobilis* extracted by CTAB method

注:M 为 DNA 2000 Marker,1~8 为提取的样品 DNA。

2.1.3 简化 CTAB 法提取基因组 DNA 琼脂糖凝胶电泳结果 由图 3 可见,Marker 条带较清晰,第 1~5 号条带较清晰,第 6 号条带不明显,所有条带均有拖尾现象。

2.2 DNA 纯度和浓度检测

由表 2 所得的 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值及 DNA 样品的浓度均为利用 3 种方法提取多次基因组 DNA 所得样品的测量平均值,SDS 法所得 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值为 1.83,最接

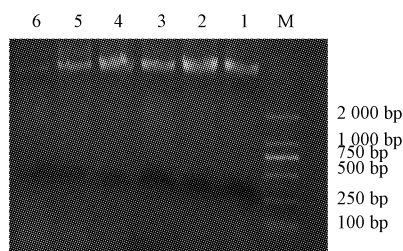


图3 简化CTAB法提取基因组DNA琼脂糖凝胶电泳图谱

Fig. 3 Electrophoresis pattern of DNA of *Aloe nobilis* extracted by Simplified-CTAB method

注: M为DNA 2000 Marker, 1~6为提取的样品DNA。

近1.8,说明样品纯度较高,其基本上没有RNA和蛋白质等杂质的污染;而CTAB法所提DNA样品 OD_{260}/OD_{280} 的值都低于1.95,说明有RNA污染;而简化的CTAB法,因为减少了抽提次数,DNA的浓度明显降低,而且 OD_{260}/OD_{280} 的比值为1.31,明显低于1.8,所得的DNA纯度和浓度都不好。

表1 不同方法提基因组DNA浓度和纯度

Table 1 The concentration and purity of extracting DNA from *Aloe nobilis* by different methods

方法	OD_{260}/OD_{280}	DNA浓度/ $\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$
SDS法	1.83	376.7
CTAB法	1.95	380.0
简化CTAB法	1.31	361.3

3 讨论与结论

该试验中,当减少了氯仿/异戊醇的抽提次数,明显降低了DNA的浓度,说明氯仿/异戊醇可有效地去除基因组DNA中的蛋白质、多糖和酚类物质。此外,用异丙醇沉淀,有利于特异性地沉淀核酸,提高核酸产量,而采用氯仿/异戊醇抽提,是由于氯仿/异戊醇易于挥发,并易溶于异丙醇,克服了由于酚等残留带来的困难。这与王景雪等^[12]中所提及到的结论基本相同,是植物基因组DNA提取中普遍存在的问题。王珍等^[13]研究表明,

CTAB法适用于水稻、大豆、玉米、小麦、马铃薯、芦笋、香石竹等大多数植物DNA的提取,而在对不夜城芦荟基因组DNA的提取中发现,SDS法明显优于CTAB法,可能是由于不夜城芦荟含有较多的酚类物质,而SDS法能更加有效地去除DNA中的酚类物质,SDS法提取的不夜城芦荟基因组DNA具有较好的纯度和较高的浓度。

试验表明,用SDS法提到的不夜城芦荟基因组DNA纯度最高,SDS法比较适用于不夜城芦荟基因组DNA的提取。

参考文献

- [1] 吕琳,何聪芬,刘家熙,等. 芦荟的生物学特性研究进展[J]. 中国农学通报,2004,20(6):89-92.
- [2] 王红星,常云霞,李景原,等. 遮荫对3种芦荟萜类物质的影响[J]. 热带作物学报,2010,31(12):2238-2242.
- [3] 李云政,秦海元,王青华,等. 国内外芦荟应用研究进展[J]. 化工进展,2000,19(2):19-22.
- [4] 张倩,马婧,何婧,等. 中国芦荟AIDREB2基因的克隆及其胁迫表达[J]. 园艺学报,2009,36(11):1659-1666.
- [5] 刘思言,姚丹,关淑艳,等. 农杆菌介导法将bFGF基因转入木立芦荟的初步研究[J]. 河南农业科学,2011,40(7):109-112.
- [6] 赵华,赵进,董银卯,等. 转TaDREB基因提高芦荟抗低温特性的研究[J]. 中国生物工程杂志,2009,29(9):45-49.
- [7] 李希臣,雷勃钧,卢翠华,等. 高效的植物DNA提取方法[J]. 生物技术,1994,4(3):39-41.
- [8] 张继红,陶能国,张小云,等. 三种豆科植物总DNA提取方法的比较[J]. 湖南农业科学,2007(2):31-33.
- [9] 赵姝华,王富德,张世草,等. 提取、纯化植物DNA方法的比较[J]. 国外农学—杂粮作物,1998,18(2):35-38.
- [10] 刘学春,潘春欣,宋云枝,等. 一种单子叶植物总DNA提取方法的改进与应用[J]. 山东农业大学学报,1995,4(26):491-495.
- [11] 张大明,陈新露,邓峥嵘. 木根麦冬干叶提取DNA用于RAPD分析[J]. 生物多样性,1996,4(2):119-122.
- [12] 王景雪,孙毅,高武军,等. 一种简便实用的植物总DNA提取方法[J]. 山西大学学报(自然科学版),2000,23(3):271-272.
- [13] 王珍,方宣钧. 植物DNA分离[J]. 分子植物育种,2003,1(2):281-288.

Study on Isolation Methods of Genomic DNA in *Aloe nobilis*

LIU Si-yan¹, YAO Dan¹, GUAN Shu-yan¹, WANG Pi-wu², SONG Chen-xue¹

(1. College of Life Sciences, Jilin Agricultural University, Changchun, Jilin 130118; 2. College of Agronomy, Jilin Agricultural University, Changchun, Jilin 130118)

Abstract: Taking the young leaves of *Aloe nobilis* as material, SDS and CTAB and simplified CTAB method were used to extract genomic DNA from *Aloe nobilis*, and the content and the purity of DNA were detected by the methods UV spectrophotometer and agarose gel electrophoresis, to compare various methods of extraction of the quality and efficiency, and find out the most appropriate method. The results showed that compared three kinds of DNA extraction methods of *Aloe nobilis* genome, either from the extract concentration or purity, SDS was significantly better than the other methods.

Key words: *Aloe nobilis*; method of DNA extraction; SDS method; CTAB method