

# 两种方法提取板栗叶片 DNA 的效果比较

陈 娟<sup>1,2</sup>, 金文龙<sup>1</sup>, 莫亿伟<sup>1,3</sup>

(1. 经济林木种质改良与资源综合利用湖北省重点实验室(黄冈师范学院), 湖北 黄冈 438000; 2. 黄冈师范学院 化学与生命科学学院, 湖北 黄冈 438000; 3. 绍兴文理学院 生命科学学院, 浙江 绍兴 312000)

**摘 要:**以来自湖北罗田地区的 9 个板栗品种为试材, 研究比较了试剂盒法和改良 CTAB 法对板栗叶片 DNA 提取效果的影响。结果表明: 用试剂盒提取的 DNA 出现部分降解的现象,  $A_{260}/A_{280}$  为 1.11~1.49, DNA 产率为 24.50~59.25  $\mu\text{g/g}$ , 很难得到高纯度的 DNA 样品; 而采用多次洗涤相结合, 并用 PVP 和  $\beta$ -巯基乙醇联合除酚的改良 CTAB 法, 能有效去除板栗叶片的多酚和多糖等物质, 所获得的 DNA 完整, 无降解现象,  $A_{260}/A_{280}$  为 1.80~1.90, DNA 产率为 60.50~102.00  $\mu\text{g/g}$ 。表明改良的 CTAB 法获得的 DNA 纯度和产率较高, 通过 SRAP 分子标记验证结果表明, DNA 的纯度达到了板栗分子标记的试验要求。

**关键词:**板栗; DNA 提取; 改良 CTAB 法; 试剂盒法; DNA 质量

**中图分类号:**S 603.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)18-0089-03

板栗(*Castanea mollissima* Blume)是我国重要的经济林木, 在长期的栽培历史过程中, 受地貌及气候类型等复杂多样的生境因子影响, 加之分离、突变、迁移、自然选择、人工选择的综合作用, 其群体已经产生了大量遗传变异, 创造了许多具有优良遗传特性的变异。随着分子生物学技术的不断发展, 前人利用同工酶<sup>[1]</sup>、RAPD、AFLP<sup>[2]</sup>、SSR<sup>[3-4]</sup>等技术, 对栗属植物的遗传多样性、亲缘关系、遗传图谱构建和分子辅助育种等进行了研究。湖北罗田地区是我国重要的板栗产区, 有着许多优异的板栗种质资源<sup>[5-6]</sup>, 只有姜德志等<sup>[7]</sup>对其 3 个品种的品质进行了研究, 而该地区的板栗种质资源和分子分类却少有报道。但是, 开展相关分子标记技术对 DNA 模板质量要求较高, 因为 DNA 的质量越高, 所获得的试验结果越能最大程度地反映出真实多态性, 所以获得高纯度的 DNA 是这些分子标记取得成功的基础。

板栗是酚类物质含量较高的植物, 采取常规方法制备得到的 DNA 含杂质较多, 受干扰影响多, 各种分子标记不能得到清晰的指纹图谱, 无法满足试验要求。该试验分别采用 TANGEN(天根)公司生产的植物 DNA 试剂盒和改良 CTAB 法进行 DNA 提取效果的比较研究,

以期为进一步开展板栗的分子标记奠定良好的基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

试验于 2012 年春季在湖北罗田县板栗主产区进行。供试 9 个板栗品种分别为:“羊毛栗”、“桂花香”、“浅刺大板栗”、“深刺大板栗”、“乌壳栗”、“八月红”、“六月暴”、“处暑红”、“玫瑰红”。取样时选取树冠外围的健康枝条芽尖未展的嫩叶为研究材料, 液氮速冻后带回实验室-80℃低温保存备用。

### 1.2 试验方法

1.2.1 试剂盒法提取板栗叶片 DNA 取板栗未展的嫩叶组织 100 mg, 加入液氮充分研磨, 用天根生化科技(北京)有限公司生产的 DNA secure plant Kit 新型植物基因组 DNA 提取试剂盒进行 DNA 提取, 具体操作见产品说明书。

1.2.2 改良 CTAB 法提取板栗叶片 DNA 根据前期试验结果, 结合板栗酚类物质含量较高的特点, 在参考程丽莉等<sup>[2]</sup>改良 CTAB 法的基础上加以改进: 在 2% CTAB 提取液中加入 1.5% 抗氧化剂  $\beta$ -巯基乙醇和 1.5% 螯合剂 PVP40, 排除酚类物质及色素的干扰, 增加 DNA 提取物的溶解性。同时在使用氯仿-异戊醇抽提并在去除 RNA 的时候加入 1/10 体积的 3 mol/L NaAc, 再加入无水乙醇沉淀 DNA, 去除多糖。

1.2.3 DNA 质量检测 分光光度计检测: 取 10  $\mu\text{L}$  DNA 溶液用 ddH<sub>2</sub>O 稀释至 250  $\mu\text{L}$ , 在 Eppendorf Biophotometer 6131 型分光光度计上检测 DNA 浓度及纯度。DNA 浓度 =  $\text{OD}_{260} \times \text{测定样品体积} \times \text{稀释倍数}$ ; DNA 得

**第一作者简介:**陈娟(1978-), 女, 博士, 副教授, 研究方向为植物生理与分子生物学。E-mail: breezy02008@163.com.

**责任作者:**莫亿伟(1971-), 男, 博士, 副教授, 研究方向为植物生理与分子生物学。E-mail: ywmo@163.com.

**基金项目:**经济林木种质改良与资源综合利用湖北省重点实验室开放基金资助项目(2011BLKF243; 2013000503)。

**收稿日期:**2013-05-06

率=DNA 浓度×总样品体积/样品鲜重。DNA 的电泳检测:取 5  $\mu$ L DNA 样品,加 2  $\mu$ L 溴酚蓝上样缓冲液,120 V 电泳 30 min 后拍照,判断 DNA 的质量和完整性。

1.2.4 SRAP 分子标记验证提取效果 为检测改良 CTAB 法 DNA 的提取效果,采用引物 Me5~Me8 组合对供试 9 个品种板栗进行 SRAP 扩增,反应体系为:20  $\mu$ L 反应体系中含 1×PCR buffer,2.5 mmol/L  $Mg^{2+}$ 、1.2 U *Taq* DNA 聚合酶、0.2 mmol/L dNTPs、0.3  $\mu$ mol/L 随机引物、20 ng DNA 模板<sup>[8]</sup>。扩增程序参照 Li 等<sup>[9]</sup>的方法进行,即 94℃ 预变性 5 min;94℃ 变性 1 min,35℃ 复性 1 min,72℃ 延伸 1 min,5 个循环;而后将复性温度提高到 50℃,35 个循环。在 MX3500P 型荧光定量 PCR 仪上扩增,扩增产物点样 10  $\mu$ L,用 1.8% 的琼脂糖凝胶检测。

## 2 结果与分析

### 2.1 试剂盒法提取板栗叶片总 DNA 的效果

由图 1 可知,当用试剂盒提取后,9 个板栗品种提取

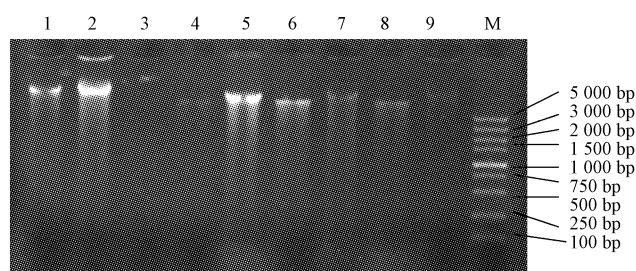


图 1 试剂盒法提取板栗总 DNA 的电泳结果

Fig.1 Result of DNA agarose electrophoresis by the method of plant genomic DNA Kit

注:1:“羊毛栗”;2:“桂花香”;3:“浅刺大板栗”;4:“深刺大板栗”;5:“乌壳栗”;6:“八月红”;7:“六月暴”;8:“处暑红”;9:“玫瑰红”;10:Mark DL 5 000。下同。

Note:1: Yangmaoli;2: Guihuaxiang;3: Qiancidabanli;4: Shencidabanli;5: Wukeli;6: Bayuehong;7: Liuyuebao;8: Chushuhong;9: Meiguihong;10: Mark DL 5 000. The same below.

的要求。而通过改良的 CTAB 法提取到的 DNA 样品,纯度较高,杂质量少, $A_{260}/A_{280}$  的比值平均在 1.80 左右,可以很好的满足进一步的试验要求,为板栗的分子生物学研究奠定了基础。而且试剂盒提取的 DNA 含量平均为 41.22  $\mu$ g/g,少于改良 CTAB 法提取到的 DNA 含量 76.78  $\mu$ g/g。另外研究还发现,尽管都用改良的 CTAB 法提取 DNA,但一些板栗品种的 DNA 纯度仍然较低,例如“六月暴”、“处暑红”的  $A_{260}/A_{280}$  分别是 1.68 和 1.73,低于 1.80 的值,这可能是该叶片比其它品种含有较多的蛋白和酚类物质所致。

### 2.4 分子标记验证提取效果

由图 3 可知,SRAP 扩增出的谱带清晰,多态性条带丰富,基本能区分出各供试材料,说明改良 CTAB 提取到的板栗基因组 DNA 能达到分子标记所要求的质量。

DNA 所得的效果并不相同,有些品种的 DNA 条带较亮,有些则较暗,条带亮度与 DNA 产量呈正相关。即第 2、5 泳道含量最高,第 1 泳道次之,第 4、6~8 泳道相对较低,而第 3 和第 9 泳道最低。同时还发现,通过试剂盒获得的 DNA 样品均有降解现象,无法满足进一步的试验需求。

### 2.2 改良 CTAB 法提取板栗叶片总 DNA 的效果

将改良 CTAB 法得到的 DNA 经过氯仿和异戊醇(24:1)抽提,然后加入 RNase 去除 RNA,再经 70%乙醇多次洗涤得到 DNA。由图 2 可知,从 9 个板栗品种叶片提取的 DNA 条带清晰,亮度一致,无弥散带,也没有拖尾的现象,表明 DNA 纯度较高。

### 2.3 2 种方法提取的 DNA 的纯度和产量比较

用核酸蛋白分析仪分别对试剂盒法和 CTAB 法提取到的 DNA 进行质量检测,由表 1 可知,试剂盒提取到的 DNA 样品纯度较低,含有较多的蛋白质和酚类杂质, $A_{260}/A_{280}$  比值平均在 1.32 左右,无法满足分子标记试验

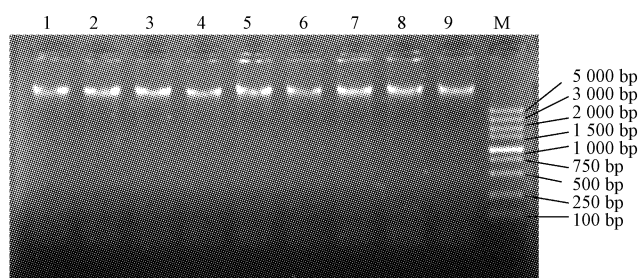


图 2 改良 CTAB 法提取板栗总 DNA 的电泳结果

Fig.2 The result of DNA agarose electrophoresis by the method of modified CTAB

表 1 2 种方法提取的板栗叶片 DNA 的纯度和质量比较

Table 1 Comparison on the yield and quality of genomic DNA extracted from the leaves of Chinese chestnuts by two methods

品种	试剂盒提取方法		改良的 CTAB 法	
	DNA 纯度 ( $A_{260}/A_{280}$ )	产量 / $\mu$ g·g <sup>-1</sup>	DNA 纯度 ( $A_{260}/A_{280}$ )	产量 / $\mu$ g·g <sup>-1</sup>
“羊毛栗”	1.36	38.50	1.80	80.63
“桂花香”	1.14	57.75	1.83	76.50
“浅刺大板栗”	1.27	24.50	1.86	69.75
“深刺大板栗”	1.44	29.50	1.89	79.50
“乌壳栗”	1.29	59.25	1.81	60.50
“八月红”	1.34	55.25	1.81	102.00
“六月暴”	1.37	40.25	1.67	74.00
“处暑红”	1.49	38.75	1.73	75.00
“玫瑰红”	1.22	27.25	1.79	73.13

注:结果为 3 次提取的平均值。

Note: Each result is the mean of three values.

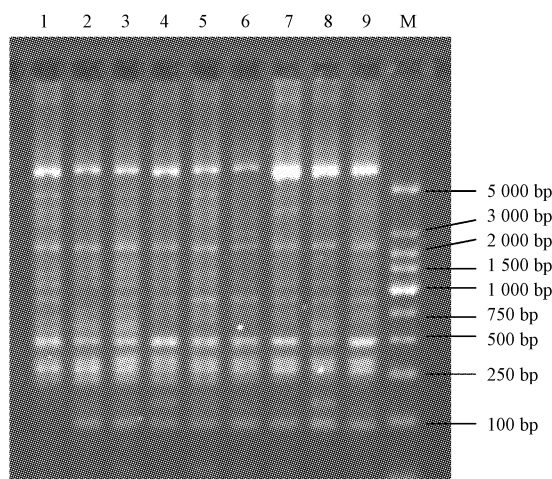


图3 SRAP 试验结果

Fig. 3 The result of SRAP molecular marker

### 3 讨论

从该试验结果可以看出,不同的板栗品种间得到的DNA纯度和产率不一致,可能是由于不同的板栗品种多糖和酚类的组成和含量具有一定的差异。不同植物品种提取DNA的方法也应该有所不同,即便是相同的植物品种,取材的部分和发育的程度不同,组织内多糖和酚类的含量与组成也有所不同,DNA提取的效果也是有差异的。这是由于随着植物个体发育,植物组织中酚类、多糖等代谢物质也随着组织器官的成熟而增加<sup>[10-12]</sup>。因此在改良的CTAB法基础上,还需要根据不同板栗的特点进一步调节试验成分组成及探索更好的操作方法,才能得到更高质量的DNA。在实际工作中可针对不同植物材料的特性和试验要求选择合适的提取

方法。另外,在试验过程中,由于板栗叶片受伤后,其中的多酚类物质很快被氧化,因此,在提取DNA前对叶片的处理十分关键,应将其存放在-80℃冰箱中,且在与提取缓冲液接触前,慎防冰冻样品融化,造成叶片氧化而变成褐色的现象,影响DNA的提取效果。

### 参考文献

- [1] 暴朝霞,黄宏文. 板栗主栽品种的遗传多样性及其亲缘关系分析[J]. 园艺学报,2002,29(1):13-19.
- [2] 程丽莉,苏淑钗,秦岭,等. 板栗叶片DNA的提取及AFLP反应体系的建立[J]. 北京农学院学报,2005,20(2):5-9.
- [3] 王同坤,董超华,马艳,等. 板栗SSR和RAPD技术体系的建立[J]. 果树学报,2006,23(6):825-829.
- [4] 艾呈祥,余贤美,张力思,等. 中国部分板栗品种的SSR标记[J]. 农业生物技术学报,2007,15(2):283-289.
- [5] 徐育海,蒋迎春,方波,等. 罗田县板栗产业生产调查[J]. 湖北农业科学,2008,47(1):67-70.
- [6] 王晴芳,徐育海. 湖北大别山区板栗产业可持续发展探讨[J]. 湖北农业科学,2011,50(23):4485-4487.
- [7] 姜德志,程水源,王燕,等. 罗田3个板栗栽培品种主要营养成分分析[J]. 湖北农业科学,2011,50(23):4482-4485.
- [8] 邱文武,孙伟生,窦美安. 菠萝SRAP反应体系的建立及优化[J]. 生物技术,2008,18(1):39-42.
- [9] Li G, Quiros C F. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), A new marker system based on a simple PCR reaction its application to mapping and gene tagging in Brassica[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2001, 103: 455-461.
- [10] 陈惠云,孙志栋,茅轶俊,等. 春兰基因组DNA提取方法的研究[J]. 分子植物育种,2006,4(1):135-142.
- [11] 刘婵,王博,段青,等. 滇山茶基因组DNA不同提取方法效果比较[J]. 江苏农业科学,2010(6):49-50.
- [12] 胡凤荣,任翠,鲍仁蕾,等. 风信子DNA不同提取方法的效果比较[J]. 沈阳农业大学学报,2011,42(5):570-573.

## Comparison on Genomic DNA Extracted from the Leaves of Chinese Chestnut by Two Methods

CHEN Juan<sup>1,2</sup>, JIN Wen-long<sup>1</sup>, MO Yi-wei<sup>1,3</sup>

(1. Hubei Key Laboratory of Economic Forest Germplasm Improvement and Resources Comprehensive Utilization, Huanggang Normal University, Huanggang, Hubei 438000; 2. College of Chemistry and Life Science, Huanggang Normal University, Huanggang, Hubei 438000; 3. College of Life Science, Shaoxing University, Shaoxing, Zhejiang 312000)

**Abstract:** New leaves of nine *Castanea mollissima* Blume varieties from Luotian country Hubei province were used as experimental materials and genomic DNA extraction methods of plant genomic DNA Kit and modified CTAB were used and compared. The results showed that the method of plant genomic DNA Kit was poor and was difficult to obtain clear bands by agarose gel electrophoresis. The ratio  $A_{260}/A_{280}$  of extracted DNA was 1.11~1.49 and the yield was 24.50~59.25  $\mu\text{g/g}$ . However, PVP and 2-mercaptoethanol were added to CTAB buffer in order to inhibit oxidation of polyphenol, and elution for many times were used to remove polysaccharide could be inhibited and most of polysaccharides in leaves could be removed efficiently. The ratio  $A_{260}/A_{280}$  of DNA extracted by modified CTAB ranged from 1.80~1.90, and the yield was 60.50~102.00  $\mu\text{g/g}$ . The result of *Castanea mollissima* Blume molecular marker also showed that the modified CTAB method was suitable for extracting high qualified DNA from *Castanea mollissima* Blume.

**Key words:** Chinese chestnut; DNA extraction; modified CTAB method; extraction Kits; DNA quality