

东方百合“Siberia”基因组 DNA 提取方法比较研究

吴超, 丁晓瑜, 黎侠, 向林, 孙崇波, 郭方其

(浙江省农业科学院 园艺研究所, 浙江 杭州 310021)

摘要:以东方百合“Siberia”为试材, 研究比较了十二烷基硫酸钠(SDS)法、溴化十六烷基三甲铵(CTAB)法及改良的 SDS 法、CTAB 法对提取百合不同部位基因组 DNA 的效果。结果表明: 利用改良的 CTAB 法提取百合不同部位的 DNA 效果最好, 点样孔无杂质, 且没有拖尾现象; 通过增加抽提次数以及改用 3 M NaAc 进行沉淀可以提高百合鳞茎和根部 DNA 的提取率, 降低提取 DNA 的污染程度。

关键词:百合; CTAB 法; SDS 法; DNA

中图分类号:Q 949.71⁺8 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)02-0108-04

百合(*Lilium*)是世界重要的花卉品种, 被誉为“球根花卉之王”, 主要分布在北半球温带地区, 全球发现的品种达百余个, 其中我国是最重要的起源国家, 自然分布品种就有 50 多个。分子生物学是现代生命科学研究的前沿, 如何将植物中的 DNA 高质量的提取出来, 是进行分子生物学研究的基础。目前关于植物 DNA 提取方面的研究很多^[1-17], 但因植物不同部位, 不同发育阶段的组织特异性给 DNA 提取带来不同要求, 而且不同的试验对植物的 DNA 要求也存在很大不同^[7]。百合中的多糖及多种次生代谢物质的含量极高, 严重影响了 DNA 的纯度和得率。百合为多年生草本球根植物, 由于组织的特异性, 其不同部位的提取方法也有很大差异^[5,8], 因此, 能够以一种最为简便的方法将各个部位基因组 DNA 得以高质量提取是当前研究的热点。现以百合不同部位为试材, 采用 4 种不同的方法并加以改良进行 DNA 提取, 以期确定一种最适合百合不同部位基因组 DNA 的提取方法。

1 材料与方法

1.1 试验材料

以东方百合品种“Siberia”为试材, 试验所取叶片为 2011 年 3 月种植的田间新鲜叶片, 试验采用的鳞茎、根系及抽薹茎叶均为该试验离体组培实验室提供。

CTAB 提取缓冲液: 100 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0); 20 mmol/L EDTA (pH 8.0); 1.4 mol/L NaCl; 2% CTAB;

2% α -巯基乙醇; 3% PVP; SDS 提取缓冲液: 100 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0); 50 mmol/L EDTA (pH 8.0); 5.0 mol/L NaCl; 2% CTAB; 2% α -巯基乙醇; 3% PVP; STE 缓冲液: 10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0); 1 mmol/L EDTA (pH 8.0); 0.1 mol/L NaCl; 120℃ 灭菌, 4℃ 保存; 其它试剂均采用国产分析级。

供试仪器: Cole parmer 恒温水浴锅; BioRAD 电泳仪; AlphaImager. EP 凝胶成像系统; Eppendorf Biophotometer 核酸蛋白测定仪。

1.2 试验方法

1.2.1 CTAB 法 取试验材料用液氮迅速研磨至细沫转入 2.0 mL 离心管中, 加入 65℃ 预热的 CTAB 提取缓冲液 700 μ L, 混合均匀, 放入 65℃ 温浴中 45 min, 水浴后冷却至室温加入 450 μ L 的氯仿: 乙醇: 异戊醇(76: 20: 4)抽提液, 颠倒混匀成乳浊液, 在 10 000 r/min 转速下离心 8 min。离心完毕后取上清液, 转移至另一支 2.0 mL 离心管中, 再重复 1 次抽提液的试验步骤后, 在上清液中加入 0.1 体积的 5 M NaCl 和 0.6 倍体积的预冷异丙醇混合均匀, 置于 -20℃ 低温下放置约 20 min, 此时析出白色絮状沉淀, 在 11 000 r/min 转速下离心 4 min, 将沉淀加入 70% 的乙醇溶液漂洗 3 次后, 转入超净工作台吹干, 风干后每管中加入 200 μ L 1×TE 缓冲液溶解, 在 -20℃ 低温下保存。

1.2.2 改良 CTAB 法 取试验材料用液氮迅速研磨至细沫转入 2.0 mL 离心管至 1.0 mL 刻度的量, 加入预处理液 STE 溶液至 1.5 mL, 混匀后放置 5~10 min, 在 5 000 r/min 转速下离心 5 min, 弃掉上清液, 迅速加入 65℃ 预热的 CTAB 提取缓冲液 700 μ L, 混合均匀。以后的步骤与 CTAB 法相同。

1.2.3 SDS 法 取试验材料用液氮迅速研磨至细沫转

第一作者简介:吴超(1981-), 女, 博士, 助理研究员, 研究方向为百合分子生物学。E-mail: ruishi666000@163.com

责任作者:郭方其(1962-), 男, 硕士, 副研究员, 研究方向为百合分子育种。

收稿日期:2013-09-16

入 2.0 mL 离心管中,加入 65℃ 预热的 SDS 提取缓冲液 700 μ L,混合均匀,放入 65℃ 温浴中 45 min,水浴后冷却至室温加入 450 μ L 的氯仿:乙醇:异戊醇(76:20:4)抽提液,颠倒混匀成乳浊液,在 10 000 r/min 转速下离心 8 min。离心完毕后取上清液,转移至另一支 2.0 mL 离心管中,再重复一次抽提液的试验步骤后,在上清液中加入 0.1 体积的 5 M NaCl 和 0.6 倍体积的预冷异丙醇混合均匀,置于 -20℃ 低温下放置约 20 min,此时析出白色絮状沉淀,在 11 000 r/min 转速下离心 4 min,将沉淀加入 70% 的乙醇溶液漂洗 3 次后,转入超净工作台吹干,风干后每管中加入 200 μ L 1×TE 缓冲液溶解,在 -20℃ 低温下保存。

1.2.4 改良 SDS 法 取试验材料用液氮迅速研磨至细沫转入 2.0 mL 离心管至 1.0 mL 刻度的量,加入预处理液 STE 溶液至 1.5 mL,混匀后放置 5~10 min,5 000 r/min 转速下离心 5 min,弃掉上清液,迅速加入 65℃ 预热的 CTAB 提取缓冲液 700 μ L,混合均匀。以后的步骤与 SDS 法相同。

1.2.5 分光光度法检测 将纯化后的 DNA 稀释 100 倍,测定 DNA 浓度及纯度。应用分光光度计测定 230、260、280、320 nm 处吸光度值(OD)以换算其 DNA 浓度,计算相关 OD 比值来分析所提 DNA 的质量。 OD_{260}/OD_{280} 大于 2.0,说明提取的 DNA 有 RNA 污染; OD_{260}/OD_{280} 小于 1.8,说明提取的 DNA 中有蛋白质的污染;若出现 OD_{260}/OD_{230} 小于 2.0,说明 DNA 中存在酚类物质污染;320 nm 的吸光值为样品的浊度及其它干扰因子。

表 2 不同部位、不同提取方法的 DNA 提取纯度比较

Table 2 Comparison of different DNA extract purity of different part by different method

部位	CTAB 法		SDS 法		改良 CTAB 法		改良 SDS 法	
	OD_{260}/OD_{280}	OD_{260}/OD_{230}	OD_{260}/OD_{280}	OD_{260}/OD_{230}	OD_{260}/OD_{280}	OD_{260}/OD_{230}	OD_{260}/OD_{280}	OD_{260}/OD_{230}
叶片	1.94±0.01	2.2±0.01	1.94±0.01	2.0±0.19	1.87±0.02	2.4±0.04	1.88±0.03	2.2±0.19
嫩茎	1.91±0.07	2.1±0.05	1.91±0.04	2.0±0.48	1.86±0.04	2.4±0.11	1.85±0.02	2.2±0.35
鳞茎	1.64±0.06	0.47±0.06	1.15±1.00	0.21±0.20	1.85±0.09	0.57±0.15	1.86±0.06	0.73±0.09
根	1.83±0.05	1.56±0.22	1.84±0.01	1.11±0.06	1.84±0.07	1.05±0.50	1.83±0.03	0.96±0.21

应用 4 种方法对鳞茎及根系进行 DNA 提取时发现样品提取浓度均低于 150.0 ng/ μ L,由表 1 可知,改良 CTAB 提取根系的浓度最低,为 24.0 ng/ μ L,改良后 SDS 方法在鳞茎提取浓度比改良 CTAB 法高 112.04% 左右。由表 2 可知,根系 DNA 提取 OD_{260}/OD_{280} 的比值均在 1.8~2.0 范围内,但 OD_{260}/OD_{230} 的比值均低于 2.0,表明根系 DNA 样品受到酚类物质的污染;应用 CTAB 法及 SDS 法提取鳞茎 DNA 样品 OD_{260}/OD_{280} 比值均低于 1.8,且 OD_{260}/OD_{230} 的比值也低于 2.0,表明应用 CTAB 法及 SDS 法提取样品污染严重,改良 CTAB 法及改良 SDS 法提取时蛋白及 RNA 的污染减弱,但仍然存在严重的酚类污染。

1.2.6 琼脂糖凝胶电泳检测 用 1.0% 的琼脂糖凝胶,在 U=100 V, I=75 mA, P=9 W 的条件下,进行电泳,在凝胶成像系统下观察、拍照。

2 结果与分析

2.1 不同部位、不同提取方法的 DNA 提取纯度和浓度的比较

从表 1 可以看出,应用 CTAB 法进行叶片 DNA 提取比 SDS 方法获得的浓度高 38.27%,改良 CTAB 提取法及改良 SDS 法的叶片 DNA 提取浓度比 CTAB 法的降低 33.67%、36.99%,但测定样品 320 nm 发现改良 CTAB 提取方法及改良 SDS 方法的浊度及干扰因子为 0,表明此 2 种方法的提取纯度更高。利用 4 种方法进行叶片、嫩茎 DNA 提取时, OD_{260}/OD_{280} 的比值均在 1.8~2.0 范围内,而 OD_{260}/OD_{230} 的比值均在 2.0 以上(表 2),表明提取样品的 DNA 样品中蛋白质、多糖及酚类物质的污染少,这 4 种方法对于百合茎叶部分均具有较好的提取效果。

表 1 不同部位、不同提取方法的 DNA 提取浓度比较

Table 1 Comparison of different DNA extract concentration of different part by different method

部位	浓度/ng· μ L ⁻¹			
	CTAB 法	SDS 法	改良 CTAB 法	改良 SDS 法
叶片	545.6±26.18	394.6±157.11	361.9±62.45	343.8±134.09
嫩茎	293.8±263.22	235.2±180.75	205.4±77.76	192.8±49.09
鳞茎	141.8±75.76	109.2±95.74	51.5±17.92	97.6±42.00
根	73.2±11.50	67.4±4.02	24.0±16.31	68.4±15.36

2.2 琼脂糖凝胶电泳分析 DNA 提取结果

应用 1% 琼脂糖凝胶电泳观察,可以很直观的了解所提 DNA 样品的完整性及纯度^[9]。从图 1-A、B 可以看出,CTAB 法提取的 DNA 条带清晰明亮,无拖尾现象,但有少量杂质滞留点样孔。而 SDS 法的电泳存在很明显的条带速度不一,拖尾现象严重。从图 1-C、D 可以看出改良 CTAB 法能够改善原有 CTAB 法的点样孔滞留现象,但提取条带亮度明显减弱。改良 SDS 方法同样比 SDS 法减轻污染程度,但仍然存在明显的拖尾情况。对于条带电泳速度不一致的情况,推测是由于样品中杂质含量较高,这些物质为多糖,蛋白质以及次生代谢物具有很高的粘附性,常与 DNA 结合形成复合物,使得样品

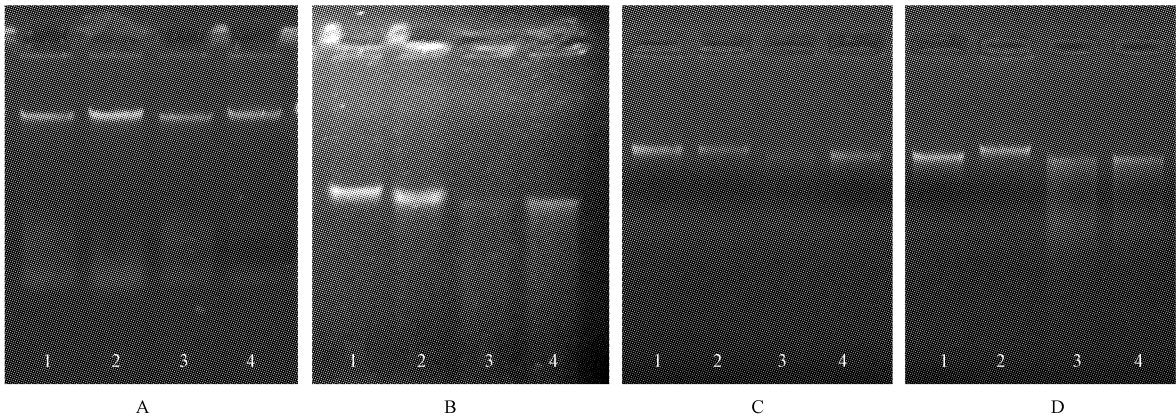


图 1 不同方法提取百合不同部位 DNA 琼脂糖凝胶电泳图谱
注:1. 叶片;2. 茎;3. 鳞茎;4. 根。A. CTAB 法;B. SDS 法;C. 改良 CTAB 法;D. 改良 SDS 法。

Fig. 1 Electrophoresis of Lily DNA for sorts of extraction methods

Note: 1. Leaves; 2. Stems; 3. Bulbs; 4. Roots. A. CTAB method; B. SDS method; C. modified CTAB method; D. modified SDS method.

无法离开点样孔或电泳速度减缓^[7]。通过比较分析,改良 CTAB 法具有很好提取效果,点样孔无杂质,且没有拖尾现象,说明该方法能够很好的去除百合 DNA 样品中的杂质,保证 DNA 提取质量。

2.3 更改提取方法对鳞茎及根系 DNA 提取效果的影响

针对百合鳞茎和根系内多糖及次生代谢物质含量高极大地影响 DNA 提取效果的问题,该试验将 2 种方法进行改善,以期得到污染程度轻,适合分子生物学试验的提取方法。首先,该试验通过增加抽提次数的方法

减少多糖、蛋白质及酚类的污染^[11],由表 3 可知,采用该方法后鳞茎与根系的提取浓度均有所增加,根系 DNA 的蛋白质及多糖污染程度改善明显,鳞茎 DNA 的 OD₂₆₀/OD₂₃₀ 比值均低于 2.0,表明酚类物质的污染还是很大;其次该试验将沉淀时增加蛋白质溶解度,降低 DNA 溶解度的 5 M NaCl 溶液更改成 3 M NaAc 溶液,试验结果表明(表 5、6),该方法能够提高鳞茎和根系的 DNA 提取浓度,鳞茎中最大 DNA 提取浓度为 657.0 ng/μL,比原有改良 SDS 提取方法的浓度高 2 倍左右。

表 3 增加抽提次数对鳞茎和根系 DNA 浓度的影响

Table 3 Effect of extraction times increase in the concentration of DNA extracted from bulb and root

部位	浓度/ng · μL ⁻¹			
	CTAB 法	SDS 法	改良 CTAB 法	改良 SDS 法
鳞茎	135.7±9.23	186.7±17.86	170.7±5.39	141.3±5.82
根	140.7±1.45	152.0±3.41	160.7±4.23	170.0±6.56

表 4 增加抽提次数对鳞茎和根系 DNA 纯度的影响

Table 4 Effect of extraction times increase in the purity of DNA extracted from bulb and root

纯度测定	CTAB 法		SDS 法		改良 CTAB 法		改良 SDS 法	
	OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀	OD ₂₆₀ /OD ₂₃₀	OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀	OD ₂₆₀ /OD ₂₃₀	OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀	OD ₂₆₀ /OD ₂₃₀	OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀	OD ₂₆₀ /OD ₂₃₀
鳞茎	1.40±0.11	0.64±0.53	1.65±0.26	0.20±0.07	1.86±0.10	0.27±0.14	1.66±0.22	0.33±0.06
根	1.92±0.06	1.06±0.07	1.99±0.02	0.91±0.09	1.89±0.01	0.96±0.19	1.86±0.07	0.90±0.27

表 5 应用 NaAc 溶液对鳞茎和根系 DNA 浓度的影响

Table 5 Effect of NaAc in the concentration of DNA extracted from bulb and root

部位	浓度/ng · μL ⁻¹			
	CTAB 法	SDS 法	改良 CTAB 法	改良 SDS 法
鳞茎	185.0±18.20	249.5±7.99	657.0±26.86	568.3±28.06
根	191.0±8.41	311.3±10.22	41.7±1.72	63.3±4.77

表 6 应用 NaAc 溶液对鳞茎和根系 DNA 纯度的影响

Table 6 Effect of NaAc in the purity of DNA extracted from bulb and root

纯度测定	CTAB 法		SDS 法		改良 CTAB 法		改良 SDS 法	
	OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀	OD ₂₆₀ /OD ₂₃₀	OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀	OD ₂₆₀ /OD ₂₃₀	OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀	OD ₂₆₀ /OD ₂₃₀	OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀	OD ₂₆₀ /OD ₂₃₀
鳞茎	1.82±0.02	0.46±0.51	2.09±0.02	0.22±0.02	1.49±0.10	0.38±0.07	1.60±0.30	0.62±0.19
根	1.88±0.02	1.64±0.45	1.81±0.02	0.60±0.05	2.24±0.26	0.75±0.26	3.95±0.07	0.90±0.27

3 讨论

对于目前的百合分子生物学研究来说,如何高质量、高产量的获得各部位基因组 DNA 仍然是亟待解决的问题,百合含有大量的多糖、酚类及一些次生代谢物质,极大的干扰了其基因组 DNA 的提取效果^[5]。该试验选取百合最常作为试验材料的 4 个部位进行 DNA 提取研究,通过比较不同的试验方法对各部位的提取效果,筛选出最优化的提取条件及步骤。经试验发现不同部位对不同方法的提取敏感性存在很大差异。百合的茎叶部分含有多糖及酚类物质,易与 DNA 样品结合出现褐化现象,针对该现象,主要解决方法是在提取液中添加适量的 β -巯基乙醇及 PVP,但经该试验发现在加入提取液之前,加入预冷的 STE 溶液进行前期材料处理,可以去除更多的杂质,大大提高 DNA 样品的纯度,降低干扰物质的含量。

百合是多年生球根植物,所以鳞茎和根系同样是试验中选取的主要部位,但这 2 个部位获得 DNA 产量低、质量差、易降解^[8],无法满足很多分子生物学试验要求。经过多次试验发现存在以下原因:一是水分含量高,造成在液氮中研磨不充分,提取量受到严重影响;二是细胞中糖分及其它次生代谢物含量极高,对提取样品造成严重污染。为了解决这些问题,该试验通过更改抽提次数及助沉淀盐溶液的方法来解决,结果表明抽提次数的增加能够提高 DNA 样品的纯度但提取浓度会降低,推测产生的主要原因是次生代谢物与 DNA 结合形成粘稠物质,在去除其同时带走了部分 DNA 样品;而更改的 NaAc 溶液对鳞茎 DNA 提取浓度影响较大,能够增加 2 倍左右的提取量。

从试验结果分析来看,改良 CTAB 法较其它 3 种方法更适合百合各部位的 DNA 提取,能够获得较高纯度及质量的 DNA 样品。应用预冷的 STE 溶液进行材料前期处理,能够提高提取 DNA 样品的纯度。增加抽提

次数能够减轻鳞茎与根系 DNA 提取污染的问题,以及 3 M NaAc 溶液更适合用来增加蛋白的溶解度,提高 DNA 的得率。

参考文献

- [1] 陈庆榆,缪成贵,刘晓峰. 棉花高质量 DNA 的提取及 SRAP 反应体系的优化[J]. 生物学杂志,2010,27(5):31-34.
- [2] 陈忠良,秦翠鲜,郭元元,等. 一种适用于甘蔗 SSR-PCR 的 DNA 快速提取方法[J]. 广西农业科学,2010,41(11):1155-1157.
- [3] 葛亚英,沈晓岚,田丹青. 红掌基因组 DNA 提取实验[J]. 江苏农业科学,2010(1):64-65.
- [4] 黄艳岚,张超凡. 甘薯叶片基因组 DNA 提取方法[J]. 湖南农业科学,2011(1):4-6.
- [5] 刘紫英,袁斌. 香水百合基因组 DNA 提取方法的比较研究[J]. 江苏农业科学,2009(1):47-49.
- [6] 马岩涛,张磊,任贤,等. 枸杞基因组 DNA 提取方法的比较[J]. 广东农业科学,2011(1):154-156.
- [7] 石庆华,代培红,许磊,等. 刺山柑基因组 DNA 提取方法的比较[J]. 新疆农业科学,2010,47(8):1512-1516.
- [8] 童巧珍,周日宝,刘湘丹,等. 百合鳞片 DNA 提取及 RAPD 分析[J]. 中南林业科技大学学报,2010,30(1):48-53.
- [9] 吴秋云,罗文彬,邱永祥,等. 一种快速提取甘薯基因组 DNA 方案的建立[J]. 山西农业大学学报,2006(2):119-124.
- [10] 吴田,蓝增全. 葡萄柚基因组 DNA 提取方法的比较及 ISSR-PCR 体系的优化[J]. 中国农学通报,2010,26(23):48-52.
- [11] 杨苓,付燕,邓群仙,等. 一种高质量枇杷基因组 DNA 提取方法[J]. 北方园艺,2010(20):126-129.
- [12] 杨清,苏光荣,韩蕾,等. 版纳甜龙竹 DNA 提取方法及 AFLP 反应体系建立研究[J]. 华北农学报,2010,25(增刊):32-37.
- [13] 岳继承,李洪生,夏其志,等. 不同方法提取棉花 DNA 的比较[J]. 江西棉花,2010,32(6):11-15.
- [14] 张俊环,孙浩元,杨丽,等. 杏叶片 DNA 提取和荧光 AFLP 反应体系的建立[J]. 北方园艺,2010(19):145-148.
- [15] 张帅,王晓光,邓先珍,等. 乌桕基因组 DNA 提取方法研究[J]. 湖北林业科技,2010,162(2):27-31.
- [16] 张弢. 红掌基因组 DNA 提取方法的优化[J]. 安徽农业科学,2009,37(19):8879-8880.
- [17] 赵丽华. 石榴 ISSR-PCR 反应体系的正交设计优化[J]. 生物技术,2010(19):148-152.

Comparative Study on Genomic DNA Extraction Methods From the Oriental Lily 'Siberia'

WU Chao,DING Xiao-yu,LI Xia,XIANG Lin,SUN Chong-bo,GUO Fang-qi

(Institute of Horticulture,Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou,Zhengjiang 310021)

Abstract: Taking the Oriental lily 'Siberia' as material,SDS,CTAB,modified SDS and modified CTAB methods to extract genomic DNA were compared. The results showed that the modified CTAB method was the best method to extract DNA from lily. There were no impurities and tail in sample,the quantity and quality of the DNA from lily bulbs and shoots were significantly improved by increasing extraction times and using 3 M NaAc,and reduced pollution rate.

Key words: lily;CTAB method;SDS method;DNA