

适用于新疆野核桃 SSR-PCR 的快速提取 DNA 的方法

王肇延, 董玉芝, 陈虹, 王瑞芬

(新疆农业大学 林学与园艺学院, 新疆 乌鲁木齐 830052)

摘要:以新疆野核桃幼叶为试材,采用活性炭改良的高盐低 pH 法和常用的改良 CTAB 法进行 DNA 提取,并检测提取的 DNA。结果表明:快速提取法提取 DNA 的质量与 CTAB 法相比无明显差异。除研磨样品的时间外,快速提取法完成一次提取所需时间为 35 min 左右,约为 CTAB 法的 1/3;提取 100 个样品所消耗的药品价值为 7.8 元,与 CTAB 法相比节省成本约 60%。该研究为新疆野核桃遗传多样性的分析奠定了坚实的基础,也为其它大规模研究样品 DNA 的提取提供了技术支持。

关键词:活性炭;快速提取 DNA;野生核桃

中图分类号:S 664.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2011)19-0100-04

DNA 的提取是生物分子水平研究的基础,根据分子标记的不同,所需 DNA 的质量、用量均不相同,如 SSR 分子标记需要 DNA 的质量为中高,PCR 反应体系中 DNA 模板的用量为 10~120 ng;而 RFLP 需要高质量的 DNA,用量为 5~30 μg ^[1-2]。新疆野核桃是栽培核桃的直系祖先,拥有大量的优良基因及丰富的遗传多样性,是我国重要的野生果树资源,其组织中含有大量的多糖、多酚和色素等物质,在 DNA 提取过程中极难完全除去^[3]。前人针对核桃的特点,在 CTAB 法的基础上进行优化、改良^[4],均已获得较高质量的 DNA^[5],但这些方法的提取步骤较复杂,会占用大量研究时间^[6-7],并且所用到的试剂中氯仿、Tris-饱和酚等存在较大毒性,对实验人员不利^[8]。因此,这些方法并不适用于提取 DNA 份数较多的试验,但目前未见快速、无毒、适合大规模核桃样品 DNA 提取的相关研究。该研究针对上述情况,建立了一种快速、低毒、适合样品数量繁多的 DNA 提取方法,并且已应用于大规模野核桃 SSR-PCR 的检测中。

1 材料与方法

1.1 试验材料

于 2009~2010 年 4 月中旬至 6 月,在新疆巩留县野核桃沟自然保护区采集试验所用野核桃材料。将采

集的野核桃幼嫩叶片用硅胶干燥法处理,并将处理好的试验材料密封,保存于避光、干燥、通风的环境。

高盐低 pH 提取缓冲液:0.1 M NaAc(pH 4.8)、0.05 M EDTA(pH 8.0)、0.5 M NaCl、0.8% PVP、1.4% SDS,分装后高压灭菌,室温保存。CTAB 提取缓冲液:2% CTAB、1.4 M NaCl、0.8% PVP、0.1 M Tris-HCl(pH 8.0)、0.02 M EDTA(pH 8.0),高压灭菌,室温保存。

1.2 试验方法

取 0.02 g 硅胶干燥的野核桃幼叶置于研钵中,加入适量液氮快速将其研磨成粉状装入 1.5 mL 离心管中待用。

1.2.1 快速提取法(改良高盐低 pH 法) 向装有材料的离心管中加入适量灭菌的活性炭和 600 μL 预热 65℃的高盐低 pH 提取缓冲液,置于 65℃水浴中颠倒混匀 10 min;加入 1/2 体积的 KAc 混匀,室温静置 5 min,12 000 r/min、室温离心 5 min,取上清液(若上清液中仍有杂质,可重复 1 次);加入 0.7 倍体积的 4℃异丙醇,混匀、-20℃沉淀 10 min 后,10 000 r/min、室温离心 5 min,弃上清;用 4℃70%乙醇洗涤 2~3 次,4℃无水乙醇洗涤 1 次,自然风干,加入 50 μL 的 1×TE,使 DNA 完全溶解,-20℃保存备用。

1.2.2 改良 CTAB 法 向装有材料的离心管中加入预热 65℃的 CTAB 提取液 600 μL 充分混匀,置于 65℃水浴中 30 min,每 5 min 充分颠倒混匀 1 次;冰浴 5 min,向离心管中加入等体积的氯仿-异戊醇,颠倒混匀至不分层(大约 5 min),10 000 r/min、室温离心 5 min;取上清液于新离心管中,加入等体积的苯酚-氯仿-异戊醇,颠倒混匀至不分层(大约 5 min),12 000 r/min、20℃离心 5 min;取上清液,加入等体积的氯仿-异戊醇,颠倒混匀(大约 5 min),10 000 r/min、

第一作者简介:王肇延(1985-),男,在读硕士,研究方向为保护生物学。E-mail:match900@qq.com。

责任作者:董玉芝(1955-),女,博士,教授,现主要从事林木遗传育种方面的研究工作。E-mail:dysz830052@126.com。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30860230);2010 年新疆财政林业科技专项资金资助项目;新疆维吾尔自治区森林培育重点学科资助项目。

收稿日期:2011-06-28

室温离心 5 min; 取上清液, 加入 2 倍体积 4℃ 的无水乙醇, 混匀后至 -20℃ 沉淀 30 min, 12 000 r/min、20℃ 离心 5 min; 弃上清液, 用 4℃ 70% 乙醇洗涤 2~3 次, 4℃ 无水乙醇洗涤 1 次, 自然风干, 加入 50 μL 的 1× TE, 使 DNA 完全溶解, -20℃ 中保存备用。

1.2.3 DNA 的鉴定 用紫外法和琼脂糖电泳对全部野核桃叶片基因组 DNA 进行质量检测, 操作如下: 用 1× TE 做空白对照, 并取 1 μL DNA 用 dd H₂O 稀释至 20 μL , 用岛津 BioSpec-mini 蛋白质核酸分析仪测定 DNA 原液的 OD_{260/280} 值和浓度, 根据 OD_{260/280} 值确定提取 DNA 的纯度。用 1 μL 混有荧光染料的溴酚蓝与 5 μL DNA 样品混合, 以 λ DNA Hind III Marker 为参照, 用 0.8%~1% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的大小及降解情况, 并用 UVP 凝胶成像系统进行观察和拍照。采用鼎国生物合成的 ZMZ5 引物^[9] (5'-GGCTTCCTTCCCTTCTAT-3', 5'-GCTGCTTCTGCTTGCTT-3')。利用刘晓丽等^[10] 建立并优化的核桃 SSR 反应体系和 PCR 扩增程序。根据引物合成提供的温度及实际凝胶电泳的结果, 最终将扩增程序的退火温度确定为 56℃。将 SSR-PCR 扩增产物用 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶检测其扩增产物并观察拍照。

2 结果与分析

2.1 DNA 质量的比较

2.1.1 琼脂糖凝胶电泳检测 由图 1 可知, 全部点样孔及其附近无条带, 表明所提取的 DNA 中几乎无多酚、蛋白等杂质残留; DNA 条带明亮、整齐、无拖尾现象, 表明所提取 DNA 的质量很高; 野核桃 DNA 条带在 23 130 bp 附近, 表明 2 种方法提取的 DNA 有较高的完整性。泳道 4 和 4' 的 DNA 条带明显比泳道 2 和 2' 的 DNA 条带明亮, 泳道 3 和 3' 的 DNA 条带也比泳道 1 和 1' 的 DNA 条带明亮, 说明快速提取法提取的 DNA 在浓度上要明显高于改良 CTAB 法。分析原因, 快速提取法的操作步骤明显少于改

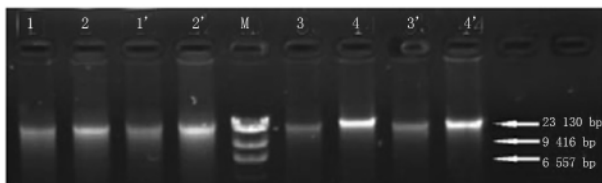


图 1 比较 2 种 DNA 提取方法的电泳结果

注: 泳道 M: λ Hind III DNA Marker; 泳道 1、2 的提取方法为改良 CTAB 法; 泳道 3、4 号提取方法为改良高盐低 pH 法; 泳道 1、3 为同一样品; 泳道 2、4 为同一样品; 泳道 1'、2'、3'、4' 为泳道 1、2、3、4 的重复。

Fig. 1 Results of agarose electrophoresis of comparing with 2 kinds of extraction DNA methods

Note: Lane M: λ Hind III DNA Marker. Lane 1 and 2 of the extraction method is the modified CTAB method; lanes 3 and 4 extraction method is high-pH improved method; lanes 1, 3 are the same sample; lanes 2, 4 are the same sample; lane 1', 2', 3', 4' are the repeat of lanes 1, 2, 3, 4.

良 CTAB 法, 在操作过程中 DNA 的损耗少; 快速提取法提取 DNA 的时间短, DNA 降解量相应减少。

2.1.2 紫外法检测 从表 1 可看出, 2 种提取方法获得 DNA 的 OD_{260/280} 均在 1.8~2.0 之间 (结合图 1), 表明 DNA 的纯度都比较高; 从 DNA 浓度的整体上看, 快速提取法获得 DNA 浓度的平均值 0.9045 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 是改良 CTAB 法获得 DNA 浓度均值 1.5 倍以上。

表 1 2 种提取方法所获 DNA 浓度、纯度的比较

Table 1 Compare with the DNA's purity and concentration of 2 sorts of extraction methods

DNA 的编号 Number of DNA	1	2	1'	2'	3	4	3'	4'
OD _{260/280}	1.914	1.900	1.929	1.955	1.837	1.819	1.849	1.896
浓度 Concentration/ $\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$	0.444	0.653	0.564	0.711	0.804	1.021	0.857	0.937

2.1.3 SSR 分子标记检测 采用快速提取法和改良 CTAB 法提取的基因组 DNA 经 SSR 扩增检测 (图 2), 结果发现二者 DNA 扩增条带带型完全一致, 并且条带极为清晰。说明 2 种方法提取基因组 DNA 的质量均满足 SSR 分子标记技术的要求。图 3 是快速提取法提取的 24 份野生核桃基因组 DNA 经 SSR-PCR 扩增的结果, 表明该法提取的 DNA 除扩增的条带清晰, 还具有良好的重复性和稳定性。

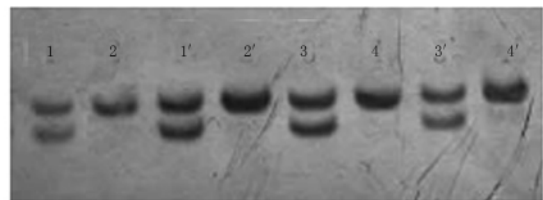


图 2 不同提取方法对野核桃基因组 DNA SSR-PCR 扩增的影响

Fig. 2 Effects of different DNA extraction methods on SSR-PCR amplification of DNA from 2 wild walnuts using primer ZMZ5

2.2 比较 2 种提取 DNA 方法提取时间和药剂的使用

2.2.1 2 种方法提取 DNA 所需时间的比较 由表 2 可知, 改良 CTAB 法处理样品的时间为 100 min, 而快速提取法处理样品所需时间仅为 35 min, 约是改良 CTAB 法处理时间的 1/3。对比 2 种方法可知, 改良高盐低 pH 法处理样品的时间极短, 能够明显提高提取效率。

2.2.2 提取所用药剂的比较 由表 3、4 可知, 快速提取法在提取 100 株野核桃样品所使用的药品成本仅为 7.8 元, 而改良 CTAB 法所使用的药品成本是 19.3 元。使用改良 CTAB 法提取全部 (4 457 株) 野核桃样品的 DNA 所需花费的药品成本约为 860 元, 而快速提取法的药品成本仅是前者的 2/5, 可节省 522 元。由表 4 可知, 研究中快速提取法使用的毒性挥发药剂仅有 2 种, 并且这 2 种毒剂使用极少, 对人体几乎不造成伤害; 而改良 CTAB 法使用的毒性挥发药剂是前者的 2 倍, 其中氯仿、异戊醇对人体中枢神经系统有较强的伤害。

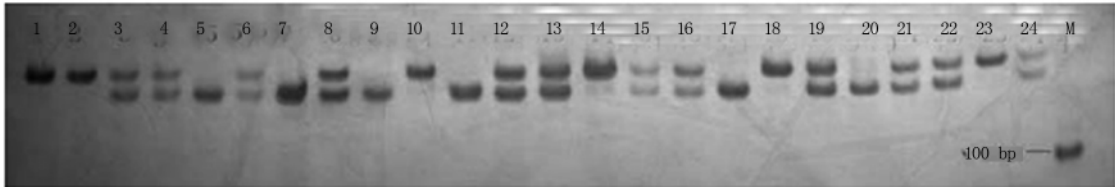


图 3 利用引物 ZMZ5 对 24 份野生核桃 DNA 进行 SSR-PCR 扩增的结果
Fig. 3 SSR-PCR amplification of 24 wild walnuts' DNA using primer ZMZ5

表 2 对比 2 种提取方法消耗的时间

Table 2		Compare with the spending time of 2 kinds of extraction methods							min		
提取方法	Extract method	水浴时间	Water bath time	冰浴时间	Ice-bath time	抽提时间	Extraction time	醇沉时间	Precipitation tieme	时间总和	Total time
快速提取法		10		0		15		10		35	
Rapid DNA extraction method											
改良 CTAB 法		30		5		30		35		100	
Improve CTAB method											

表 3 对比 2 种方法提取 DNA 使用药品的用量与成本

Table 3			Compare with dosage and cost of 2 kinds of extraction methods		
快速提取法 Rapid DNA extraction method			改良 CTAB 法 Improve CTAB method		
药品名称 Name of drug	用量 Dosage/100 份	成本 Cost/元	药品名称 Name of drug	用量 Dosage/100 份	成本 Cost/元
活性炭	2 g	0.1	氯仿-异戊醇	80 mL	6.0
KAc(pH4.8)	100 mL	4.0	苯酚-氯仿-异戊醇	40 mL	8.5
异丙醇	28 mL	1.7	无水乙醇	80 mL	2.4
高盐低 pH 提取液	60 mL	2.0	CTAB 提取液	60 mL	2.4

注:以上药品均采购于北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司。
Note:The above drugs were purchased from Beijing Dingguo Changsheng biotechnology company limited.

表 4 对比 2 种提取方法使用的药品成本和挥发毒剂

Table 4 Compare with the drug costs and toxicity volatile reagent of 2 sorts of extraction methods		
提取方法 Extract method	药品成本 Pharmaceutical cost	毒性挥发毒剂 Toxicity volatilize agentia
快速提取法 Rapid DNA extraction method	7.8 元/100 份样品	异丙醇、冰乙酸
改良 CTAB 法 Improve CTAB method	19.3 元/100 份样品	Tris-饱和酚、氯仿、 异戊醇、盐酸

综上所述,快速提取法具有高质、高产、高效、经济、低毒等优点,是大规模提取新疆野核桃 DNA 的最适方法。

3 讨论与结论

随着分子标记技术的发展,研究人员的研究范围越来越广,需要对大量的样品进行分析,这就要求对 DNA 提取过程进行简化,以提高效率,促进分子标记技术的广泛应用。

针对不同的物种,研究人员提取 DNA 的快速方法也不尽相同。但大多数是以传统方法为基础进行部分优化的改良方法,如李义良等^[11]提取湿地松和加勒比松顶芽的基因组 DNA、姚伟等^[12]提取甘蔗基因组 DNA、李丽淑等^[13]提取野生稻总 DNA 均是在常规 CTAB 法的基础上根据实际情况进行部分优化,使提取速度大幅度提升的同时保证 DNA 的质量不变或更优。也有少部分研究者建立了新的方法,也能达到快速提取的目的,如穆春华等^[14]以玉米幼叶为材料建立了一种以 EDTA、CTAB、KCl 为主要试剂,结合组织研磨棒液氮研磨为主要步骤的基因组 DNA 快速提取方法;应天玉等^[15]建立了一种快速提取植物 DNA 的方法,该法可在 40 min 内完成提取,且提取的 DNA 是无 RNA 污染的纯净 DNA。

该研究使用的材料是富含多糖、多酚、色素及其它

次生代谢物质的新疆野核桃叶片;使用的提取方法是快速提取法(改良的高盐低 pH 法)。该方法有效地提升了提取 DNA 的速度,同时还具有低毒、成本低等优点。在提取过程中使用冰乙酸等低毒性试剂,且提取 100 个野核桃样品使用的药品成本仅为 7.8 元。每完成一轮 DNA 的提取仅需要 1 h,且提取 DNA 的质量与常规 CTAB 法提取的质量无明显差异,还能应用于 SSR 等各类分子标记技术,是一种快速提取大规模研究材料 DNA 的理想方法^[16]。

参考文献

[1] 周延清. DNA 分子标记技术在植物研究中的应用[M]. 北京:化学工业出版社,2005.
[2] 阮成江,何祯祥,周长芳. 植物分子生态学[M]. 北京:化学工业出版社,2005:16.
[3] Porebski S, Bailey L G, Baum B R. Modification of a CTAB extraction protocol for plant containing high polysaccharide and polyphenol components[J]. Plant Molecular Biology Reporter, 1997, 15(1): 8-15.
[4] 张虎平,牛建新,王国安,等. 适于核桃基因标记的 DNA 提取方法[J]. 生物技术, 2003, 13(5): 18-19.
[5] 李超,罗淑萍,秦伟,等. 新疆核桃亲缘关系的 ISSR 分析[J]. 新疆农业科学, 2010, 47(9): 1722-1727.
[6] 马蕾蕾,徐世昌,曹远银. 植物种子 DNA 快速提取新方法[J]. 沈阳农业大学学报, 2005, 36(5): 626-627.
[7] Mitja Križ man, Jernej Jakš e, Deač Barievč, et al. Robust CTAB - activated charcoal protocol for plant DNA extraction[J]. Acta agriculturae Slovenica, 2006, 87: 427-433.
[8] 李筱婷,陈卓君,许文涛,等. 一种适于 PCR 扩增的植物基因组快速提取新方法[J]. 农业生物技术学报, 2010, 18(2): 394-399.
[9] Dangl G S, Woest K, Aradhya M K, et al. Characterization of 14 microsatellite markers for genetic analysis and cultivar identification of walnut[J]. Journal of the American Society for Horticultural Science, 2005, 130(3): 348-354.
[10] 刘晓丽,何天明,张美勇,等. 核桃 SSR 反应体系的优化[J]. 果树学报, 2007, 24(2): 140-145.
[11] 李义良,赵奋成,张应中,等. 适用于微卫星标记的湿地松、加勒比松 DNA 快速提取法[J]. 生物技术通报, 2010(1): 83-86.
[12] 姚伟,余爱丽,徐景升,等. 甘蔗基因组 DNA 简单和快速提取方法[J]. 农业生物技术学报, 2005, 13(1): 121-122.

苹果体细胞悬浮培养及植株再生研究

李玉生, 吴永杰, 赵艳华, 吴雅琴, 程和禾, 陈 龙

(河北省农林科学院 昌黎果树研究所, 河北 昌黎 066600)

摘 要:以苹果试管苗叶片的再生不定芽嫩叶为试材,对苹果体细胞悬浮系的建立及植株再生的影响因素进行了研究。结果表明:在 MS+NAA 0.5 mg/L+BA 2.0 mg/L 培养基上可诱导获得高活力的愈伤组织。将该愈伤组织转入 MS+2,4-D 2.0 mg/L+BA 1.0 mg/L 液体培养基中培养,采用无菌筛网分离获得含单个细胞和少于 8~10 个细胞的小细胞团进行继代培养,建立体悬浮细胞培养系。将悬浮细胞转到 MS+2,4-D 2.0 mg/L+BA 1.0 mg/L 的固体增殖培养基上暗培养 25 d 后,可形成微型愈伤组织,将该愈伤组织转到 MS+BA 5.0 mg/L+IAA 0.5 mg/L 的植株再生培养基上暗培养 30 d 后转入光下,光照培养 30 d 后 53% 的愈伤组织可再生植株。该研究建立的苹果体细胞悬浮培养技术,不仅可用于细胞融合及遗传转化过程中杂种细胞和转化细胞的分离及植株再生研究,而且对于利用组织培养技术筛选变异株系 also 具有重要意义。

关键词:苹果;愈伤组织;悬浮培养;植株再生

中图分类号:S 661.1 文献标识码:A 文章编号:1001-0009(2011)19-0103-04

苹果的常规杂交育种年限长,难度较大,其主要原因在于苹果是高度杂合的木本植物,杂交后代广泛分离,且童期较长。细胞融合技术及基因工程则为快速定向改良苹果新种质开辟了一条崭新的途径。以细胞融合为目的的苹果原生质体和细胞培养技术研究始于

20 世纪 80 年代,迄今已在一些基因型上获得再生植株^[1],但由于基因型间的差异以及单细胞再生技术的不成熟,目前尚无苹果融合细胞再生植株的报道。

1989 年 James 等^[2]首次获得苹果的转化植株,现在一些功能基因如 *rolB* 基因等已经转入到苹果中^[3]。然而由于受到转化效率低的制约,苹果基因工程育种也进展缓慢。在研究中发现由于抗性筛选对苹果转化植株再生的抑制,导致获得转化的愈伤组织容易,获得转化植株困难,从而极大地限制了苹果转化效率的提高^[4]。若降低筛选压,则会出现大量逃逸植株和嵌合体^[5]。因此如何从嵌合体中分离转化细胞并再生植株成为提高苹果转化效率的关键因素。

第一作者简介:李玉生(1980-),男,硕士,助理研究员,现主要从事果树生物技术研究工作。E-mail:showersound_1980@126.com。
责任作者:吴永杰(1972-),男,博士,副研究员,现主要从事果树遗传育种与分子生物学研究工作。E-mail:wuyongjie007@163.com。
基金项目:河北省自然科学基金资助项目(C2007000968)。
收稿日期:2011-07-18

[13] 李丽淑,黄金艳,张向军,等.一种快速提取野生稻总 DNA 的方法(英文)[J].广西农业科学,2005,36(3):189-192.

[14] 穆春华,张发军,李文才,等.玉米叶片基因组快速提取方法研究[J].玉米科学,2010,18(3):170-172.

[15] 应天玉,杨育,袁玉峰.一种快速的植物 DNA 制备方法[J].东北林业大学学报,2003,31(2):61-62.

[16] 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(自然科学版),2006,26(2):119-124.

Rapid DNA Extraction Method from Xinjiang Yili Wild Walnut for SSR-PCR

WANG Zhao-yan, DONG Yu-zhi, CHEN Hong, WANG Rui-fen

(College of Forestry and Horticulture, Xinjiang Agricultural University, Urumqi, Xinjiang 830052)

Abstract: The DNA from Xinjiang wild walnut leaves was extracted through high salt and low pH method was improved by active charcoal and improved CTAB method. The results showed that the quality of the extracted DNA from the two method was tested had no difference obviously. In addition to time of grinding samples, completing the rapid extraction method once need spent 35 minutes that was about 1/3 of CTAB method spending. It spent 7.8 Yuan that was about 40% of CTAB method spending that using rapid extraction method extracted 100 samples' DNA. The research laid solid foundation for analysis the genetic diversity of Xinjiang wild walnut. Meanwhile, it was for offering technical support that was extraction DNA of the large-scale samples.

Key words: active charcoal; rapid DNA extraction; wild walnut