

不同方法提取青藏高原蕨麻总 DNA 的比较研究

吉日木图, 李军乔

(青海民族大学 化学与生命科学学院, 青海 西宁 810007)

摘要:以改良 CTAB 法、改良 SDS 法、试剂盒法提取青藏高原蕨麻总 DNA; 用紫外分光光度法测定提取的青藏高原蕨麻的总 DNA 浓度和质量; 用琼脂糖凝胶电泳法、分光光度法测定提取的青藏高原蕨麻的总 DNA 质量, 以期筛选出青藏高原蕨麻总 DNA 提取的最佳方法。结果表明: 用改良 SDS 法提取的蛋白质含量最高, OD_{260}/OD_{280} 1.61 左右, 用改良 CTAB 法提取的 DNA 的 OD_{260}/OD_{280} 1.76 左右; 用试剂盒法提取的 DNA 的 OD_{260}/OD_{280} 1.70 左右; 用改良 CTAB 法提取 DNA 的浓度在 $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ 。

关键词: 蕨麻; 总 DNA 提取; 改良 CTAB 法; 改良 SDS 法; 试剂盒法

中图分类号: S 681.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2011)06-0152-03

蕨麻(*Potentilla anserina* L.) 属蔷薇科(Rosaceae)委陵菜属(*Potentilla* L.) 多年生草本植物^[1], 别称人参果。根延长, 在中部或末端膨大呈纺锤形或椭圆形的块根, 含丰富淀粉, 根皮棕褐色, 里面粉白色。茎匍匐, 紫红色, 节上生根, 并形成新植株。生于高山草甸、山坡湿润草地、河滩、水沟边、路边和畜圈附近, 分布于海拔 1 700 ~ 4 400 m 的青海、西藏、甘肃等地。可治疗贫血和营养不良等症, 又可供甜制食品及酿酒用; 根含鞣料, 可提制栲胶, 并可入药作收敛剂; 茎叶可提取黄色染料; 又是蜜源植物和饲料植物。因此为获得质量含量较高的青藏高原蕨麻, 现对基因组提供方法进行研究, 并且为下一步分子标记研究遗传多样性和种群遗传分化程度提供了提取总 DNA 的方法, 并对研究蕨麻的遗传变异特点及尽可能地保护蕨麻天然种群奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

采自青海省湟源县的青藏高原蕨麻(*Potentilla anserina* L.) (经青海大学韦梅琴副教授鉴定) 新鲜的嫩叶片后立即使用变色硅胶干燥保存, 带回实验室。

1.2 试验试剂

提取 DNA 的试剂: $2\times$ CTAB 提取缓冲液: 2% CTAB, 100 mmol/L Tris-HCl, 20 mmol/L EDTA, 1.4

mol/L NaCl, pH 8.0 附加 0.2% β -巯基乙醇和 2% PVP, 现配现用; $2\times$ SDS 提取缓冲液: 2% SDS, 100 mmol/L Tris-HCl, 50 mmol/L EDTA, 500 mmol/L NaCl, pH 8.0 附加 0.2% β -巯基乙醇和 2% PVP, 现配现用; 5 mol/L KAc; TE 溶液 (10 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA, pH 8.0); 氯仿: 异戊醇 (24:1) 现配现用; RNase A (10 mg/mL); 无水乙醇; 异戊醇; 76% 乙醇; 70% 乙醇; 液氮。

检测 DNA 的试剂: 0.8% 琼脂糖凝胶; $1\times$ TBE 电泳缓冲液; 100 bp DNA ladder; $6\times$ loading Buffer。

1.3 试验仪器

电泳仪 (DY Y-6D 型); 核酸电泳槽 (DYCP-31DN 型); 台式高速离心机 (H-1650); 凝胶成像系统 (G-BOX-HR); 微波炉; 微量加样器; 数显恒温水浴锅 (HH-4); 低温冰箱; 电子天平 (FA1004N)。

2 试验方法

2.1 DNA 提取方法

2.1.1 改良 CTAB 法 参照李荣华等^[2] 改进的 CTAB 提取植物 DNA 方法和植物分子生物学实验手册的 CTAB 法分离总基因组 DNA^[3,4] 作适当的改进。准确称取用变色硅胶吸干的植物叶片 20 mg 与液氮共研成细粉, 将粉末装于 1.5 mL 的 Eppendorf 管中, 然后加入 450 μL 65 $^{\circ}\text{C}$ 预热的 CTAB 提取缓冲液, 充分混匀, 放入 65 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅中保温 80 min。期间每隔 15 min 用手轻微振荡。冷却至室温后加入等体积预冷的 24:1 的氯仿: 异戊醇后, 摇床上摇动 10 min。在 10 000 r/min, 离心 10 min。重复上述步骤 2 次。取上清液转移至新的离心管中, 加入 1/100 体积 RNase A, 混匀, 37 $^{\circ}\text{C}$ 保温 30 min。用预冷的 24:1 的氯仿: 异戊醇抽提 2 次, 取上清液转

第一作者简介: 吉日木图 (1986-), 男, 内蒙古兴安盟人, 在读硕士, 研究方向为药用微生物。

通讯作者: 李军乔 (1968-), 女, 教授, 硕士生导师, 研究方向为植物资源与利用。E-mail: ljqlily2002@126.com。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (C110208)。

收稿日期: 2010-12-24

移至新的离心管中, 第一方案: 加入 2/3 体积的预冷的异丙醇或第二方案: 2 倍体积的预冷的无水乙醇, 仔细混匀, 4℃放置 2 h 沉淀 DNA。将上述混合溶液在 10 000 r/min, 离心 5 min。小心倒掉上清液, 保留 DNA 沉淀于管底。加入预冷的 76%乙醇 600 μL 洗涤沉淀, 10 000 r/min 条件下离心 5 min, 倒去上清液。重复上一步 1 次。加入预冷的 70%乙醇 600 μL 洗涤沉淀, 10 000 r/min 条件下离心 5 min, 倒去上清液。重复上一步 1 次。干燥 DNA 沉淀, 在见到无色胶状物附在管壁时, 加入 100 μL TE 溶液溶解沉淀的 DNA。得到的样品于冰箱-20℃保存备用。

2.1.2 改良 SDS 法 参照郭宝生等^[5]改良 SDS 法快速提取小样品量棉花总 DNA 及其纯化, 何燕等^[6] SDS 法提取青稞叶片总 DNA 的改进方法和植物分子生物学实验手册的 Dellaporta、Wood 和 Hicks 法分离总基因组 DNA^[3, 7]作适当的改进。

2.1.3 新型植物基因组 DNA 快速提取试剂盒法 首先 API 缓冲液中加入 0.2%β-巯基乙醇和 2%PVP, 现配现用, 然后步骤按说明书进行。最后一步采用 2 种方法, 第 1 种是用 EB 洗脱液, 第 2 种是用 ddwater 洗脱。

2.2 DNA 浓度、纯度及质量检测

取原液 35 μL, 加 TE 缓冲溶液稀释(稀释 15 倍), 混匀, 用 UV-2800 分光光度计, 测定 DNA 在波长 260/280 nm 处的吸收值, 根据 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 判断 DNA 的大致纯度; 因为 DNA 在紫外区有强吸收, 最大吸收波长为 260 nm, 而蛋白质在 280 nm 有强吸收。如果 DNA 中含有蛋白质, 则 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 小于 1.7; 如果含有 RNA, 则 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 大于 2.0。纯的 DNA 溶液 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 为 1.7~1.9。DNA 浓度(μg/mL)= OD₂₆₀/0.02×L×稀释倍数= OD₂₆₀×50 μg/mL×稀释倍数(其中 L 为比色皿光径 1 cm; OD₂₆₀ 为 260 nm 波长处的光吸收值; 0.02 为 1 mL 溶液内含 1 μg DNA 钠盐时的光吸收值; DNA 产率(μg/g)=DNA 浓度(μg/mL)×提取 DNA 体积(mL)/材料重(g)。

2.3 DNA 琼脂糖凝胶电泳检测

取 3 μL DNA 样品和 2 μL 6×Loading buffer 混匀, 在 0.8%的琼脂糖凝胶(含有 0.5 μg/mL 溴化乙锭)上样, 在 1×TBE 电泳缓冲液中, 5 V/cm 电压下电泳; 电泳结束后, 在凝胶成像分析系统上, 观察、拍照。

3 结果与分析

3.1 DNA 浓度、纯度及质量检测结果

由表 1 可知, 在不同方法中, 采用等重量的植物叶片, 提取的 DNA 都溶于相同体积溶液中。用改良 CTAB 法提取青藏高原蕨麻总 DNA 比用改良 SDS 法和试剂盒法提取青藏高原蕨麻总 DNA 含有较少的蛋白质, 纯度和产量最高。改良 CTAB 法和改良 SDS 法中用

无水乙醇沉淀比用异丙醇沉淀的 DNA 浓度要高, 尤其是用改良 SDS 法更加明显。试剂盒法中, 用 EB 提取比用 ddH₂O 提取 DNA 的浓度和产量高一些。用改良 CTAB 法提取的 DNA 用无水乙醇沉淀, OD₂₆₀/OD₂₈₀ 1.76 左右, DNA 的浓度在 100 μg/mL 左右, DNA 产量 772.5 μg/g。

表 1 青藏高原蕨麻叶片总 DNA 紫外检测结果

总 DNA 提取方法	OD ₂₆₀	OD ₂₈₀	OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀	DNA 浓度 /μg·mL ⁻¹	DNA 产量 /μg·g ⁻¹
改良 CTAB 法 (异丙醇沉淀)	0.144	0.082	1.756	108.0	540.0
改良 CTAB 法 (无水乙醇沉淀)	0.206	0.116	1.775	154.5	772.5
试剂盒法(ddwater 提取)	0.068	0.040	1.700	51.0	255.0
试剂盒法(EB 提取)	0.074	0.043	1.721	55.5	277.5
改良 SDS 法 (异丙醇沉淀)	0.042	0.026	1.615	31.5	157.5
改良 SDS 法 (无水乙醇沉淀)	0.194	0.1238	1.577	145.5	725.5

3.2 电泳检测 DNA

0.8%的琼脂糖凝胶电泳表明(图 1), L: 100 bp DNA ladder, 1~3: 改良 CTAB 法(用异丙醇沉淀), 4~6: 改良 CTAB 法(用无水乙醇沉淀), 7~9: 试剂盒法(用 ddwater 提取), 10~12: 试剂盒法(用 EB 提取), 13~15: 改良 SDS 法(用异丙醇沉淀), 16~18: 改良 SDS 法(用无水乙醇沉淀)。提取青藏高原蕨麻总 DNA 均在 1 500 bp 以上, 呈较整齐的一条线。用改良 CTAB 法提取青藏高原蕨麻总 DNA 比用改良 SDS 法和试剂盒法提取青藏高原蕨麻总 DNA 含有较少的蛋白质, 电泳的条带整齐、宽、亮度高且无拖尾, 琼脂糖胶的前沿中 RNA 和部分降解的 DNA 较少。用改良 CTAB 法提取的 DNA 含量比用改良 SDS 法和试剂盒法提取 DNA 含量要高一些, 从条带的亮度可以判断。改良 CTAB 和改良 SDS 法中, 用无水乙醇沉淀比用异丙醇沉淀提取的 DNA 含量高一些。

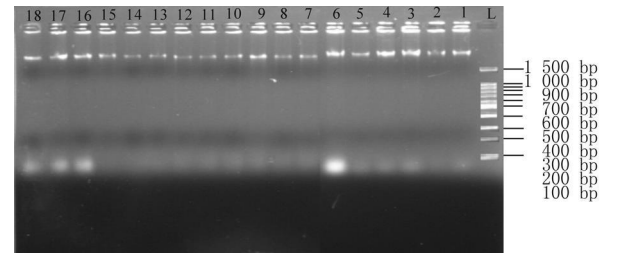


图 1 青藏高原蕨麻叶片总 DNA 琼脂糖电泳图

4 讨论与结论

获得高质量的基因组 DNA 是分子生物学研究的基础。但因多糖、酚等次生物质的存在而影响了 DNA 的提取质量, 所以如何有效去除这些物质也是基因组 DNA 的提取关键。

首先是材料的处理。因青藏高原蕨麻叶片柔软, 容易褐变, 所以采样的时候用变色硅胶干燥处理。在研磨过程中, 确保不要让液氮挥发干净, 否则会造成 DNA 的严重降解。同时在 DNA 提取裂解液中加入适量 PVP 和 β -巯基乙醇, 因为它属于还原性物质, 可以防止多酚类物质氧化, 有效减少褐变。PVP 和 β -巯基乙醇可以除去酚类化合物, 但二者单独使用效果并不理想, 将二者同时按照一定比例加入较好。试验采用使用前在 $2\times$ CTAB 提取缓冲液中加入 2% PVP, 0.2% β -巯基乙醇, 试验结果较理想, 提取的 DNA 为无色透明, 没有一点褐化。为保证基因 DNA 的完整性, 各项操作动作应温和, 避免剧烈震荡和过度搅拌。

其次是多糖、蛋白质及其它杂质的处理。CTAB 和 SDS 是一种去污剂^[3], 既能溶解细胞膜, 又能较好去除多糖的干扰。用氯仿/异戊醇抽提 3 次, 每次抽提时间均不少于 10 min, 去除蛋白质的效果甚佳。加入 RNase A 温浴处理后去除了 RNA 的干扰, 效果比较好。用无水乙醇沉淀后, 即可得到较多气泡的絮状 DNA 沉淀, 但用异丙醇沉淀效果略差。用 76% 和 70% 乙醇洗涤沉淀, 除

去含有的杂质。

总之, 用改良 CTAB 法用无水乙醇沉淀比起用试剂盒法和改良 SDS 法, 原理清楚, 步骤有条理, 操作的每一步目的性强、简便、快捷、成本便宜, 提取的 DNA 浓度和产量高, 可以在分子生物学领域中应用。

参考文献

- [1] 中国科学院西北高原生物研究所青海植物志编辑委员会. 青海植物志[M]. 西宁: 青海人民出版社, 1997.
- [2] 李荣华, 夏岩石, 刘顺枝, 等. 改进的 CTAB 提取植物 DNA 方法[J]. 实验室研究与探索, 2009, 28(9): 14-16.
- [3] Clark M S(英). 植物分子生物学: 实验手册[M]. 翟礼嘉 译. 北京: 高等教育出版社, 海德堡: 施普林格出版社, 1998.
- [4] Dellaporta S L, Wood J, Hicks J B. A plant DNA minipreparation: version II[J]. Plant Mol. Biol. Rep., 1983, 1(4): 19-21.
- [5] 郭宝生, 张辉, 耿军义, 等. 改良 SDS 法快速提取小样品量棉花总 DNA 及其纯化[J]. 棉花学报, 2005, 17(5): 320.
- [6] 何燕, 卓嘎, 旦巴. SDS 法提取青稞叶片总 DNA 的改进方法[J]. 西藏科技, 2005, 7(147): 14-15.
- [7] Murray M G, Thompson W F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA[J]. Nucleic Acids Res., 1980(8): 4321-4325.

The Comparative Study of Different Methods for Total DNA Extraction in Tibet Plateau *Potentilla anserine*

Jirimutu, LI Jun-qiao

(Qinghai Nationalities University, Chemistry and Life Science College, Xining, Qinghai 810007)

Abstract: Improved CTAB method, improved SDS method, kit method was used for the extraction of total DNA in Tibet Plateau *Potentilla anserine*, to determine the concentration and quality of *Potentilla anserine* by UV spectrometry, and to examine the quality of total DNA extraction in Tibet Plateau *Potentilla anserine* with agarose gel electrophoresis. The results showed that the content of protein were the highest by improved SDS method, and OD_{260}/OD_{280} value were around 1.61, OD_{260}/OD_{280} value of improved CTAB method were around 1.76. Kit method and the concentration of DNA extraction by Improved CTAB method were 100 μ g/mL.

Key words: *Potentilla anserine*; total DNA extraction; improved CTAB method; improved SDS method; kit method

农家实用小常识

1 以肥治虫 磷酸氢氨和氨水是肥料而不是农药, 但因具有挥发性和有强烈的刺激、腐蚀、熏蒸作用, 因此可以用这 2 种肥料来消灭体形小、耐力弱的蚜虫和红蜘蛛, 如可以用 1% 的磷酸氢氨液、或 0.5% 氨水喷洒农作物, 既可以扑灭蚜虫和红蜘蛛, 又起到追肥的作用。

2 沼液防治病虫 用沼液 50 kg, 加 2.5% 敌杀死 10 mL, 搅匀灌玉米心叶, 可防治玉螟; 每 667 m^2 取沼液 1 000 kg 加清水 1 000 kg, 泼浇水稻, 可以防治水稻螟虫。

3 小苏打防虫 用 150 ~ 400 倍的小苏打水溶液喷黄瓜、甜瓜、草莓、茄子等植物可以防治白粉病。