

杏仁基因组 DNA 微量提取的改良方法

姜生秀, 兰海燕

(新疆大学 生命科学与技术学院, 新疆生物资源与基因工程重点实验室, 新疆 乌鲁木齐 830046)

摘要:基于报道的大豆干种子提取方法, 对高脂肪的杏仁进行了基因组 DNA 提取方法的改良研究, 并以提取的基因组为模板进行了 PCR 扩增验证。结果表明:改良的 SDS 法提取的杏仁基因组 DNA 具有纯度和浓度高、条带清晰、降解少等优点, 并在高倍稀释条件下仍能获得有效扩增。

关键词:杏仁; 基因组; SDS

中图分类号:Q 946.2 **文献标识码:**B **文章编号:**1001-0009(2012)20-0105-03

植物基因组 DNA 的提取方法很多, 从原理上主要分为 CTAB 法和 SDS 法。所选用材料通常为植物叶片等幼嫩组织, 但由此会受到季节或时间的限制, 且提取需用液氮研磨, 比较繁琐费时^[1]。自 Chunwrongse 等建立了水稻和小麦干种子直接提取基因组 DNA 的方法以来^[2], 不少学者对 SDS 法和 CTAB 法进行了不同的改进, 分别以大豆、玉米、枸杞、棉花等干种子为材料进行了基因组 DNA 的提取, 并取得了明显的改良效果。目前, 还没有对富含脂肪的杏仁干种子基因组 DNA 提取方法的报道。杏仁属于含脂肪和蛋白质很高的干果, 其含量分别占干重的 50%~60% 和 23%~27%, 显著高于大豆、玉米等的相应成分含量。研究发现, 大豆干种子基因组提取方法对杏仁并不理想。为此, 该试验基于朱振雷等^[2]的报道并参考其他学者的方法^[3], 在对杏仁基因组 DNA 提取过程中, 根据 DNA 的质量和 PCR 扩增结果, 改进并优化出了对杏仁基因组提取的有效方法, 这为含高脂肪和蛋白质的干种子基因组 DNA 的提取提供了一定的参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为去除果皮和种皮的杏仁若干粒。

1.2 试验方法

1.2.1 杏仁基因组 DNA 的提取 基于朱振雷等^[2]有关大豆种子 DNA 的提取方法并进行了相应改进。改进后具体步骤如下: 取上述杏仁 1 粒, 切成薄片并研碎后, 称取约 30 mg 至研钵中, 向研钵中加入 700 μ L 65℃预热的 SDS 提取液 (100 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0);

25 mmol/L EDTA; 2.5% SDS; 2.5% NP-40; 2.5% Tween-20), 充分研磨后转移至 1.5 mL 离心管中, 65℃水浴 30 min; 加 700 μ L 酚/氯仿/异戊醇 (25:24:1), 轻轻颠倒充分混匀, 静置 10 min, 12 000 r/min 离心 10 min; 取上清, 加入 600 μ L 氯仿/异戊醇 (24:1) 抽提 2 次, 轻轻颠倒充分混匀, 静置 10 min, 12 000 r/min 离心 10 min; 取上清, 加入 6 μ L RNase, 以及 100 μ L 5 mol/L KAc (pH 4.8) 和 700 μ L 预冷的无水乙醇, 静置 10 min, 12 000 r/min 离心 10 min; 弃上清, 70% 乙醇洗涤沉淀, 12 000 r/min 离心 2 min; 放置超净台中吹干, 用 50 μ L TE 溶液于 65℃水浴溶解约 10 min, 随后用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量。

1.2.2 PCR 扩增 该试验使用核果类果树 ITS 序列扩增引物, 引物序列如下^[4]: P1: 5'-AGG GGA TAA CAA TTT CAC ACA GG-3', P2: 5'-CGC CAG GGT TTT CCC AGT CAC GAC-3', PCR 反应程序为: 94℃预变性 4 min; 94℃变性 1 min, 55℃退火 1 min, 72℃延伸 2 min, 共 30 个循环; 最后 72℃保温 7 min。PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

2 结果与分析

2.1 杏仁基因组 DNA 提取方法比较

该研究对朱振雷等^[2]关于大豆种子基因组 DNA 的提取方法进行了相应改进, 具体见表 1。在改进方法中增加了 NP-40、Tween-20、SDS 等表面活性剂的比率, 这对脂肪含量高的材料研磨均匀及充分分散有帮助。同时针对高油分杏仁难以研磨粉碎的特点, 在样品研磨过程中加入预热的 SDS 提取液以充分分散组织、破碎细胞。随后过程中用氯仿/异戊醇多抽提 1 次以提高 DNA 的纯度。最后加入 5 mol/L KAc 帮助 DNA 沉淀。

第一作者简介:姜生秀(1987-), 女, 在读硕士, 研究方向为生物化学与分子生物学。E-mail: yanyunjiang1987@163.com.

收稿日期:2012-06-11

表 1 2 种基因组提取方法操作步骤的比较

	改进前的方法 ^[2]	改进后的方法
SDS 提取液各组分	0.5% NP-40	2.5% NP-40
比例	0.5% Tween-20	2.5% Tween-20
	0.5% SDS	2.5% SDS
	10 mmol/L Tris-HCl	100 mmol/L Tris-HCl
	5 mmol/L EDTA	25 mmol/L EDTA
破碎细胞方式	加预热的 SDS 提取液	加预热的 SDS 提取液研磨
	直接水浴	后再水浴
KAc 的添加	无	有
氯仿/异戊醇抽提次数	1 次	2 次

2.2 杏仁基因组 DNA 质量检测结果

由改进前与改进后方法分离的 DNA 质量表现明显差异。表 2 数据显示,改进后的方法提取的基因组样品 3、4、6 的 A_{260}/A_{280} 均在 1.80 左右, A_{260}/A_{230} 均大于 2.0,说明其 DNA 不含蛋白质,纯度和浓度均较高;样品 5 为改进方法提取,但未加 KAc,其 A_{260}/A_{230} 小于 2.0,可能含有其它杂质,但纯度也较高;改进前的方法提取的基因组样品 1、2 的 A_{260}/A_{280} 和 A_{260}/A_{230} 值均较低,说明有蛋白质和其它杂质污染,且浓度较低。经比较显示,改进方法提取的 DNA 质量较好。

表 2 2 种方法提取的杏仁 DNA 的纯度和浓度比较

样品编号	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}	DNA 浓度/ $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$
1	1.67	1.09	215.3
2	1.72	2.20	201.4
3	1.84	3.36	563.0
4	1.88	3.02	412.6
5	1.86	1.76	782.1
6	1.85	2.54	424.4

将以上不同方法提取的基因组 DNA 经琼脂糖凝胶分析显示(图 1),1 和 2 的 DNA 有拖尾现象,显示降解趋势;3、4、6 条带清晰,降解不明显,由此进一步显示改进后的方法具有显著优势。

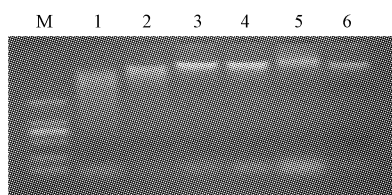


图 1 2 种方法提取的基因组 DNA 的比较

注:M;DL 2 000 marker; 1~2: 改进前; 3~6: 改进后。

2.3 基因组 DNA PCR 扩增效果比较

以 2 种方法提取的 DNA 原液为模板(图 2A),以核果类 ITS 序列通用引物扩增获得大小均为 750 bp 左右的片段,与预计大小一致,且亮度差异不显著。但当模板稀释 10 倍后(图 2B),扩增的 ITS 序列在亮度方面出现明显差异,改进前的 DNA 扩增片段较暗(1~2 泳道),且泳道前端有较多小片段;而改进后的 DNA 扩增效果较好(3~6 泳道)。由此表明,在 DNA 浓度较低时更能显示改进方法分离的 DNA 质量相对较高。

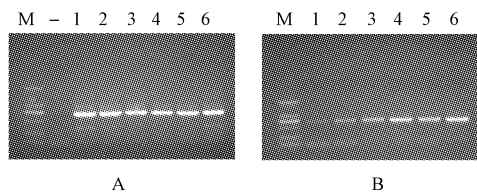


图 2 2 种方法提取 DNA 原液的 PCR 扩增结果(A)和稀释 10 倍后的 PCR 结果(B)

注:M;DL 2 000 marker;-:阴性对照;1~2:改进前 DNA 的 PCR 结果;3~6:改进后 DNA 的 PCR 结果。

3 结论与讨论

影响植物基因组 DNA 提取效果的因素很多,如植物材料的选取、细胞提取液的用量、酚/氯仿/异戊醇的用量及其比例、氯仿/异戊醇用量^[5]及其所选用的方法等,要根据不同的植物选用不同的方法,常用的方法有 SDS 法和 CTAB 法,但对不同的植物材料还要根据需要对传统方法进行改造,该试验就是以改进的 SDS 法对杏仁基因组进行了提取。

杏仁含粗脂肪 50%~60%,蛋白质 23%~27%,导致其基因组难以分离。该试验基于朱振雷等^[2]有关大豆种子 DNA 的提取方法,通过增加提取液中 SDS、NP-40(非离子型去垢剂)、Tween-20(离子型去垢剂)等去污剂的浓度,从而有效去除杏仁中所含大量脂肪,并促使细胞破碎。

该试验除改进 SDS 提取液组成外,还将预热的 SDS 提取液加入后研磨。由于杏仁所含脂肪太高,很难研磨均匀,将 65℃ 预热的 SDS 提取液先加入再研磨,由此增大样品与提取液的接触,从而细胞充分破碎,脂肪分散均匀,有利于 DNA 高效释放。此外,还加入高浓度的 KAc 以帮助 DNA 的有效及充分沉淀。而增加氯仿/异戊醇抽提次数,可以更好地除去蛋白等杂质,以便得到纯度和浓度较好的 DNA 样品^[6]。

DNA 模板的质量直接影响 PCR 反应的效率,DNA 降解严重时甚至导致无扩增,而 DNA 的质量则受提取方法的影响^[7]。因此,要根据植物材料选用不同方法或对已有方法进行改进。该研究结果显示,利用改良前方法提取的基因组 DNA 做 PCR 模板,当稀释一定倍数(该试验中稀释 10 倍)时,PCR 条带明显度比改良后方法弱(图 2B),由此显示用改良法提取的杏仁基因组的质量较好,用于 PCR 也得到了良好的扩增效果,可以满足后续分子生物学研究要求。

参考文献

- [1] 王振东,孙仓,王惠. 不同方法从大豆不同组织中提取基因组 DNA 效果的比较[J]. 大豆科学,2008,27(1):42-45.
- [2] 朱振雷,束永俊,李勇,等. 大豆种子 DNA 快速提取方法的改良及应用[J]. 东北大学农业学报,2009,40(10):60-63.

金银花疏松愈伤组织诱导及细胞悬浮培养研究

武丽娜

(邢台学院 生物化学系,河北 邢台 054001)

摘要:以“巨花一号”金银花为试材,研究了外植体、培养基对金银花疏松愈伤组织的诱导以及初始接种量和蔗糖浓度对金银花悬浮细胞生长的影响。结果表明:幼叶最易诱导愈伤组织,其诱导及增殖的最适培养基为 MS+2,4-D 2.0 mg/L+KT 0.5 mg/L;细胞悬浮培养中愈伤组织最适初始接种量为 60 g/L,培养基中蔗糖浓度为 35 g/L 时细胞生长最好。

关键词:金银花;疏松愈伤组织;细胞悬浮培养

中图分类号:S 567.7⁺9 **文献标识码:**B **文章编号:**1001-0009(2012)20-0107-03

金银花(*Lonicera japonica*)为忍冬科多年生半常绿缠绕木质藤本植物,由于花初开为白色,后转为黄色,因此得名金银花^[1]。金银花是重要的药用植物,在中医临床上应用具有悠久的历史。金银花中富含绿原酸、异绿原酸和黄酮类化合物,其中绿原酸的含量最大,绿原酸有抗菌、抗病毒、保肝利胆、降血压、降血脂、清除自由基等功能^[2],还具有抗逆转录酶的活性,可能作为抗 HIV 的先导化合物^[3]。但是由于金银花的栽培周期长,有效成分提取工艺复杂^[1],从人工栽培的金银花中提取的绿原酸等次生代谢产物已不能满足人类日益增长的需求。

因此,用细胞工程的方法利用金银花生产绿原酸势在必行。但国内有关金银花细胞悬浮培养的研究鲜有报道,现拟通过对金银花疏松愈伤组织诱导和细胞悬浮培养的研究,找到诱导疏松的、适合进行悬浮培养的金银花愈伤组织的最适培养基及金银花细胞悬浮培养的适宜条件,以期对金银花细胞大规模培养生产次级代谢产物的研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

选用邢台学院组培实验室扦插的金银花植株,品种为邢台市巨鹿县出产的“巨花一号”。

1.2 试验方法

1.2.1 外植体筛选 取金银花的茎、幼叶和芽作为外植体,用蒸馏水浸泡,用毛笔轻轻刷去表面的绒毛,用灭菌

作者简介:武丽娜(1977-),女,河北石家庄人,硕士,讲师,研究方向为分子生物学。E-mail:xtwulina1977@sina.com.

收稿日期:2012-05-16

[3] 田苗苗,周延清,牛敬媛,等.单粒干燥大豆种子基因组 DNA 提取的有效方法[J].生物学通报,2005,40(10):38-39.

[4] 刘艳玲,徐立铭,程中平.基于 ITS 序列探讨核果类果树桃、李、杏、梅、樱的系统发育关系[J].园艺学报,2007,34(1):23-28.

[5] 熊劲芳,向育君,张正奇.花生总 DNA 的快速提取与纯化研究[J].

生物学杂志,2003,20(2):32-34.

[6] 魏琦超,畅丽萍,周岩,等.一种简便实用的玉米干种子基因组 DNA 提取方法[J].广东农业科学,2009(6):165-167.

[7] 王晓丹,吕慧颖,张敬,等.以 PCR 为目的的大豆叶片 DNA 提取方法的比较研究[J].分子植物育种,2004,2(6):891-894.

The Improved Method of Apricot Genomic DNA Trace Extraction

JIANG Sheng-xiu, LAN Hai-yan

(College of Life Science and Technology, Xinjiang University, Xinjiang Key Laboratory of Biological Resources and Gene Engineering, Urumqi, Xinjiang 830046)

Abstract: Based on the genomic extraction method reported in soybean seeds, the improved method was used for genomic DNA isolation of high fat almond, and the genome extracted as a template for the PCR amplification verification. The results showed that the DNA extraction in improved SDS method had these advantages: purity and concentration was high, the strip was clear, degradation was less, and in high dilution conditions could still obtain effective amplification.

Key words: almond; genome; SDS