

# 适于 AFLP 分析的非洲紫罗兰 DNA 提取方法研究

孙永健<sup>1</sup>, 孙 宁<sup>2</sup>, 曹智攀<sup>3</sup>, 陈小强<sup>2</sup>, 张乃楠<sup>2</sup>, 张 磊<sup>2</sup>

(1. 天津天狮学院, 天津 301700; 2. 天津农学院, 天津 300384; 3. 中国医学科学院 天津血液学研究所, 天津 300020)

**摘 要:**以非洲紫罗兰同一植株的叶片和茎段为试材, 采用新鲜组织提取、烘干组织提取、冷冻干燥组织提取的 3 种不同预处理方法, 并采用 DNA Kit、CTAB-I、CTAB-II 3 种提取方法, 比较分析了 DNA 片断大小及不同方法提取 DNA 的纯度与得率, 以期确定适用于多酚、多糖、水分含量高的非洲紫罗兰的 DNA 提取方法。结果表明: 采用冷冻干燥组织提取法, 经改良的 CTAB-II 法, 即在 2 次抽提步骤中, 加入一步利用 CTAB 沉淀液沉淀 DNA 的方法最适合非洲紫罗兰 DNA 提取。这样得到的基因组 DNA 可作为后续分子水平研究的优良 PCR 模板。

**关键词:** DNA 提取; 非洲紫罗兰; CTAB; 冷冻干燥; AFLP 分析

**中图分类号:** S 681.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2012)22-0104-04

随着分子生物学技术的飞速发展, 基因分析在花卉学上的应用日趋广泛, 基因组 DNA 的提取和纯化作为基因分析的关键步骤, 其方法的灵敏度、特异性直接影响基因分析的结果。因此, 许多学者一直在努力探索各种基因组 DNA 的提取方法<sup>[1-5]</sup>。由于不同植物的内含物种类及含量存在一定差异, 在实际工作中, 科技工作者通常会根据研究对象和目的不同对现有 DNA 提取方法进行修正。非洲紫罗兰(*Saintpaulia ionantha*)为苦苣苔科多年生常绿宿根草本花卉, 又名非洲堇。目前, 世界各地的园艺品种已达上千种, 是极好的室内观赏花卉。在基因水平上对非洲紫罗兰进行研究, 有利于开展其种质资源创新和新品种培育工作<sup>[6-7]</sup>。该研究试图通过对不同方法的比较和分析, 最终确定一套最适于非洲紫罗兰 DNA 的提取的方法, 为多酚、多糖、水分含量高的植物组织的 DNA 提取提供借鉴<sup>[8]</sup>。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试样品为同一植株叶片和茎段的非洲紫罗兰, 该植株是从香港非洲紫罗兰协会的“伊华堇舍”引进的稳定型缟花品种“Sunray Trail”。

**第一作者简介:** 孙永健(1983-), 男, 硕士, 助教, 现主要从事生物化学及分子生物学方面的教学与研究工作。E-mail: syjwonderful@yahoo.com.cn.

**责任作者:** 张磊(1952-), 男, 本科, 教授, 现主要从事遗传学及植物细胞工程方面的研究工作。

**基金项目:** 天津市科技支撑计划重点资助项目(09ZCKFNC01600)。

**收稿日期:** 2012-07-18

### 1.2 试验方法

**1.2.1 材料的预处理** 鼓风干燥法: 将新鲜的供试材料放在滤纸上, 置入设定好的鼓风干燥箱。温度设定为 65℃, 干燥 6 h, 待材料烘干后, 取出置于 -20℃ 下保存备用。冷冻干燥法: 将新鲜的供试材料用纱布裹好, 置入 -20℃ 下冷冻 24 h。取出放在培养皿中, 将培养皿敞口放在真空冷冻干燥机中, 抽真空冷冻干燥 24 h, 待材料干燥后, 取出置入 -20℃ 下保存备用。

**1.2.2 DNA 的提取** DNA Kit 法: 根据 TIANGEN 植物基因组提取试剂盒说明书进行。CTAB-I 法: (1) 准确称取 0.5 g 样品于事先预冷过的研钵中, 加液氮研成细粉, 迅速转入 2 mL 的离心管中, 加入 1.3 mL 65℃ 预热的 CTAB 提取液, 上下颠倒充分混匀。在 65℃ 水浴中保温 30 min, 每隔 10 min 上下颠倒缓慢混匀 10 次。(2) 取出后冷却至室温, 在转速为 14 000 r/min 下, 离心 10 min。取上清 800 μL 转入另一个 2 mL 离心管中, 加入等体积 (800 μL) 的氯仿/异戊醇 (体积比为 24 : 1), 上下颠倒充分混匀。在转速为 12 000 r/min, 时间为 10 min 的条件下进行离心。(3) 重复第 (2) 步 1~2 次。(4) 吸取上清 700 μL 转入 1.5 mL 离心管中, 先加入 1/10 体积约 70 μL 的乙酸钠, 再加入等体积约 700 μL 预冷的异丙醇, 于 -20℃ 静置 2 h 以上或至沉淀出现。(5) 在温度为 4℃, 转速为 14 000 r/min, 时间为 15 min 的条件下进行离心。弃去上清, 70% 乙醇洗沉淀 2 次 (2 mL 和 1 mL 各 1 次), 期间将沉淀转入 1.5 mL 离心管中, 室温晾干。(6) 加入 100 μL TE (pH 8.0), 室温下溶解 DNA 至沉淀消失, 65℃ 保温 15 min。加入 10 mg/mL RNase A 2 μL (终浓度 200 ng/μL), 混匀, 37℃ 保温 2 h 以上。(7) 20℃ 静置 12 h 以上, -20℃ 保存。CTAB-II 法: (1)、(2) 步方法同

CTAB-Ⅱ法。(3)取上清 600  $\mu\text{L}$  转入另 1 个离心管中,加入 2 倍体积(1 200  $\mu\text{L}$ )的 CTAB 沉淀液,上下颠倒 1 min 让其混匀,静置 30 min。在转速为 12 000 r/min,时间为 10 min 的条件下进行离心。(4)弃去上清,倒置挥发掉水分,加入 800  $\mu\text{L}$  浓度为 1.2 mol/L 的 NaCl 溶液,将沉淀溶解,混匀。加入等体积(800  $\mu\text{L}$ )的氯仿/异戊醇,颠倒混匀 5 min。在转速为 12 000 r/min,时间为 10 min 的条件下进行离心。(5)、(6)、(7)步同 CTAB-Ⅱ法的(4)、(5)、(6)步。(8)加入 TE(pH 8.0)0.4 mL,再加入等体积(0.5 mL)的氯仿/异戊醇(24:1),轻轻颠倒摇匀 2 min,在转速为 10 000 r/min,时间为 10 min 的条件下进行离心。(9)重复 CTAB-Ⅱ法的(4)、(5)步。(10)加入 100  $\mu\text{L}$  TE (pH 8.0),室温下溶解 DNA 至沉淀消失,65℃保温 15 min。20℃静置 12 h 以上,-20℃保存。

1.2.3 DNA 的检测 DNA 片段大小:取所提 DNA 溶解液 8  $\mu\text{L}$  加 2  $\mu\text{L}$  溴酚蓝,用 1%琼脂糖凝胶(含 50  $\mu\text{L/L}$  EB),在 0.5×TBE 电泳缓冲液中 80 V 电泳,待溴酚蓝迁移至胶的 2/3 时停止电泳,取出凝胶在紫外透射分析仪上观察结果并照相。DNA 纯度和得率:取 20  $\mu\text{L}$  DNA 提取液,加入 1 980  $\mu\text{L}$  TE 制成 100 倍稀释液,用 UV-1600 型紫外可见分光光度计测定其在波长 230、260 和 280 nm 下的吸收值。 $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{230}$  应大于 2.0,当小于 2.0 时,表明溶液中有残存的盐和小分子杂质,如核苷酸、氨基酸、酚等。纯的 DNA 溶液其  $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$  应为 1.8,大于 1.9 则有 RNA 污染,小于 1.6 说明有蛋白质或酚类污染。核酸浓度可按以下公式计算:DNA 浓度( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )= $\text{OD}_{260} \times 50 \times \text{N}$ (样品稀释的倍数)/1 000。对于双链 DNA, $\text{OD}_{260}=1.0$  时溶液浓度为 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,DNA 的得率按以下公式计算:DNA 质量浓度( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )×原提取液体积( $\mu\text{L}$ )/叶片鲜重(g)。CTAB-Ⅱ法提取 DNA 的 AFLP 检测:在 37℃条件下,用限制性内切酶 *EcoRI* 和 *MseI* 对 CTAB-Ⅱ法提取的 DNA 双酶切 4 h,酶切反应体系 15  $\mu\text{L}$ (模板 DNA 0.2  $\mu\text{g}$ ,*EcoRI* 和 *MseI* 内切酶各 2.5 U;10×Buffer 1.5  $\mu\text{L}$ ;去离子水补齐体系)。连接体系 25  $\mu\text{L}$ (酶切产物 15  $\mu\text{L}$ , $T_4$  连接酶 2 U, $T_4$  DNA 10×Buffer 2.5  $\mu\text{L}$ ,5 pM 的 *EcoRI* adaptor 1  $\mu\text{L}$ ,50 pM 的 *MseI* adaptor 1  $\mu\text{L}$ )。预扩增体系 20  $\mu\text{L}$ (连接产物 1  $\mu\text{L}$ ,50  $\mu\text{M}$  的 *EcoRI* 预扩引物 0.2  $\mu\text{L}$ ,50  $\mu\text{M}$  的 *MseI* 预扩引物 0.2  $\mu\text{L}$ ,1 U *Taq* DNA 聚合酶,2 mM dNTP 2  $\mu\text{L}$ ,10×PCR Buffer 2  $\mu\text{L}$ )。预扩增反应程序为:94℃,30 s;56℃,1 min;72℃,1 min;共 24 个循环。选择性扩增体系 20  $\mu\text{L}$ (稀释 20 倍的预扩产物 5  $\mu\text{L}$ ,50  $\mu\text{M}$  的 *EcoRI* 引物和 50  $\mu\text{M}$  的 *MseI* 引物各 0.1  $\mu\text{L}$ ,*Taq* DNA 聚合酶 0.8 U,2 mM 的 dNTP 2  $\mu\text{L}$ ,10×PCR Buffer 2  $\mu\text{L}$ )。扩增程序为:94℃预变性 30 s,[94℃变性 30 s,65℃(-0.7℃/循环)复性 30 s,72℃延伸 1 min]×13 个循环,[94℃变性

30 s,56℃复性 30 s,72℃延伸 1 min]×23 个循环,72℃保持 5 min。PCR 产物加入变性胶上样缓冲液 20  $\mu\text{L}$ ,95℃下变性 5 min,然后迅速置于冰上冷击,取 2~3  $\mu\text{L}$  变性产物在 6%变性聚丙烯酰胺凝胶上进行电泳检测。

表 1 AFLP 分析的接头和引物序列

	<i>EcoRI</i> (E) 5'-3'	<i>MseI</i> (M) 5'-3'
接头 1	CTCGTAGACTGCGTAAC	GACGATGAGTCTGAG
接头 2	AATTGGTACGCAGTC	TACTCAGGACTCAT
预扩增引物	GACTGCGTACCAATTC (E0)	GATGAGTCTCTGAGTAA (M0)
	GACTGCGTACCAATTCAC (E1)	GATGAGTCTCTGAGTAACAC (M1)
选择扩增引物	GACTGCGTACCAATTCACG (E2)	GATGAGTCTCTGAGTAACTA (M2)
	GACTGCGTACCAATTCATC (E3)	GATGAGTCTCTGAGTAACCG (M3)
	GACTGCGTACCAATTCAGA (E4)	GATGAGTCTCTGAGTAACGT (M4)

## 2 结果与分析

### 2.1 材料的预处理方法对 DNA 提取的影响

2.1.1 新鲜组织的提取 采用 CTAB-Ⅱ法,对非洲紫罗兰新鲜的叶片与茎段进行 DNA 的提取,电泳结果见图 1。叶片 DNA 所在泳道几乎无光亮的条带存在,茎段 DNA 所在的泳道呈一条微弱的亮带。说明基本没有从新鲜的叶片组织中提取到 DNA,并且从新鲜茎段中所提取到的 DNA 非常少,不足以作为后续试验的高质量的模板 DNA,因此以新鲜组织作为供试材料不能达到理想的效果,需要对材料进行前期的处理。

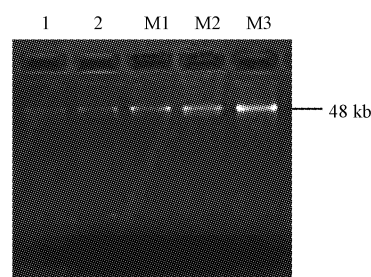


图 1 新鲜材料 DNA 提取结果

注:1:叶片 DNA;2:茎段 DNA;M1: $\lambda$ DNA(25 ng/ $\mu\text{L}$ );M2: $\lambda$ DNA(50 ng/ $\mu\text{L}$ );M3: $\lambda$ DNA(100 ng/ $\mu\text{L}$ )。图 2、3 同。

2.1.2 烘干组织的提取 采用 CTAB-Ⅱ法,对经过 65℃,6 h 烘干处理的非洲紫罗兰叶片与茎段进行 DNA 的提取,电泳结果见图 2。尽管叶片与茎段所在泳道呈现的光亮条带明显,但 DNA 的弥散现象较为严重,说明所提取的 DNA 发生了降解,即烘干法的处理过程中对供试材料的 DNA 产生了损伤,导致其降解,不能为后续试验提供优质的 DNA 模板。

2.1.3 冷冻干燥组织的提取 采用 CTAB-Ⅱ法,对经冷冻干燥处理的非洲紫罗兰叶片与茎段进行 DNA 的提取,电泳结果见图 3。叶片与茎段所在泳道均呈现 1 条较整齐的亮带,无弥散现象,表明提取量较多,DNA 完整无降解,可以作为高质量的 DNA 模板。说明冷冻干燥法在对材料处理的过程中,对 DNA 没有伤害,而且可以将含水量高的材料中的水分充分挥发掉。

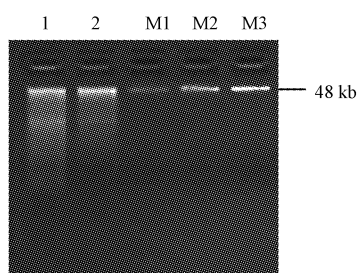


图2 烘干材料 DNA 提取结果

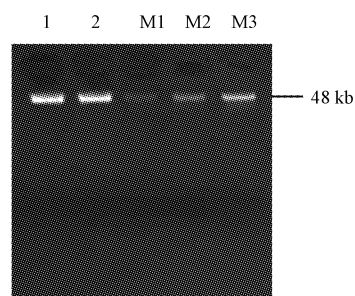


图3 冷冻干燥材料 DNA 提取结果

## 2.2 不同方法提取 DNA 的片断大小

分别采用 DNA Kit、CTAB-I 和 CTAB-II 3 种方法对经冷冻干燥处理的非洲紫罗兰叶片进行 DNA 提取。由图 4 可知,利用 3 种方法得到 DNA 的片段大小不同。CTAB-I 和 CTAB-II 法提取的 DNA 的片段长度为 48 kb。DNA Kit 法提取 DNA 片段长度明显比 CTAB 法提取 DNA 片段少约 800 bp。从 3 种方法提取 DNA 片段长度来看,CTAB 法优于 DNA Kit 法。

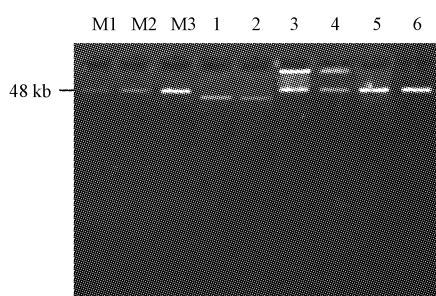


图4 3 种方法提取的 DNA 片段大小对比

注:1,3,5;叶片 DNA;2,4,6;茎段 DNA;1,2;DNA Kit 法;3,4;CTAB-I 法;5,6;CTAB-II 法;M1:λDNA (25 ng/μL);M2:λDNA (50 ng/μL);M3:λDNA (100 ng/μL)。

## 2.3 不同方法提取 DNA 的纯度与得率

由 3 种方法提取的 DNA 电泳结果见图 4。经 CTAB-I 法提取的 DNA,点样孔残留发亮现象较严重,表明 DNA 纯度较低,糖类、酚类、单宁等杂质含量较多,会影响后续 AFLP 分析的酶切反应。DNA Kit 法与 CTAB-II 法所提 DNA 纯度较高。经紫外分光光度计测定结果见表 2,不同的方法提取 DNA 的  $A_{260}/A_{280}$  和  $A_{260}/A_{230}$  比值差别较大。DNA Kit、CTAB-I、CTAB-II 法

提取 DNA 的  $A_{260}/A_{280}$  比值分别为 1.823、1.719、1.807;  $A_{260}/A_{230}$  比值分别为 2.946、2.127、3.551。CTAB-II 法提取的 DNA 样品纯度最高。DNA Kit、CTAB-I、CTAB-II 法得率分别为 0.274、0.251、0.309 mg/g。其中,CTAB-II 法得率最高。从 3 种方法得到 DNA 的纯度和得率考虑,可选择 CTAB-II 法为非洲紫罗兰 DNA 最适宜的提取方法。

表2 不同种方法提取 DNA 的纯度和得率

方法	$A_{280}$	$A_{260}$	$A_{230}$	$A_{260}/A_{280}$	$A_{260}/A_{230}$	DNA 浓度 / $\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$	DNA 得率 / $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$
DNA Kit	0.150	0.274	0.093	1.823	2.946	1.370	0.274
CTAB-I	0.146	0.251	0.118	1.719	2.127	1.255	0.251
CTAB-II	0.171	0.309	0.087	1.807	3.551	1.545	0.309

注:表中不同波长下吸光度值为多个材料的平均值。

## 2.4 CTAB-II 法提取 DNA 的 AFLP 扩增

为了进一步证明 CTAB-II 法是适于非洲紫罗兰基因组 AFLP 分析的 DNA 提取方法,将利用其得到的基因组 DNA 进行了 AFLP 扩增。扩增产物的电泳结果(图 5)表明,扩增产物带型清晰、整齐、稳定、无拖尾现象,条带集中在 150~650 bp 之间。该结果表明 CTAB-II 法提取的 DNA 质量较高,能用作 PCR 模板来开展非洲紫罗兰分子水平的研究。

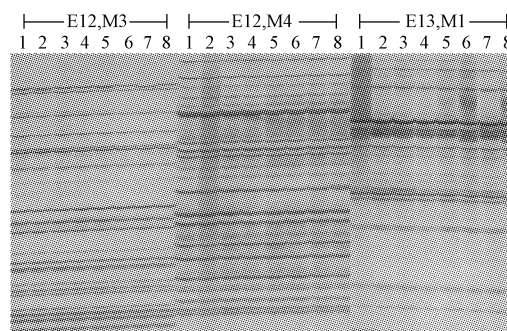


图5 AFLP 标记部分引物组合的扩增效果

注:1,3,5,7;叶片;2,4,6,8;茎段。

## 3 讨论

在植物 DNA 提取过程中,获得足够高质量 DNA 是研究人员追求的主要目标,它与后续研究工作能否顺利进行密切相关<sup>[9]</sup>。提取植物 DNA 的方法中关键的 3 步为:破碎细胞壁和细胞膜使 DNA 释放到提取裂解液中;消除蛋白质、多糖、色素等杂质的污染;防止 DNA 的降解。一般认为质量好的 DNA 的标准是:分子量保留较大;可被限制性内切酶完全消化;有清晰的和强的 PCR 扩增式样。植物细胞内含物种类和数量是影响 DNA 质量的重要因素。研究表明,提取非洲紫罗兰 DNA 的困难在于其组织中含有大量水分和较多的酚类及多糖类物质<sup>[10]</sup>。

利用新鲜的组织进行 DNA 提取时,组织内的水分在研磨过程中被释放出来,稀释了后续加入的 CTAB 裂



解液,导致细胞裂解不充分,DNA 得率便大大下降甚至完全不能提取到 DNA。虽然烘干的方法能够很好的去除组织中所含的水分,但是 DNA 在长时间的高温环境中受到了破坏,导致部分降解,质量下降,也不能够作为后续试验的高质量模板。研究表明,采用真空冷冻干燥机对含水量大的植物组织进行冻干处理,既可以很好的去除水分,又对组织中的 DNA 起到了良好的保护作用,为 DNA 的提取提供了一个良好的材料基础。

由于 DNA Kit 法的原理是对 DNA 进行特异性的吸附,因此所提取的 DNA 纯度较高,基本不含其它细胞内含物。但对于所提 DNA 片段长度来说,CTAB 法优于 DNA Kit 法,而且 DNA Kit 法的成本也较高。CTAB-II 法是在 2 次抽提之间增加了一步加入 CTAB 沉淀液的步骤,并在 DNA 沉淀再溶解后,增加了再次抽提,和二次沉淀的步骤,这样可以最大限度的将所提取的 DNA 与其它细胞内含物分开。提高了 DNA 的纯度,避免了蛋白多糖等物质将 DNA 包裹,影响后续的酶切试验。另外,多酚类物质会氧化生成一些褐色的非可溶性物质与 DNA 结合,在提取缓冲液中加入适量的抗氧化剂能有效抑制多酚类物质氧化褐变。该研究中 CTAB 法在原来方法基础上将裂解缓冲液中加入质量分数为 2% 的 PVP 有效防止了多酚类物质的氧化<sup>[11-12]</sup>。

## 参考文献

- [1] 吴忠兰,宋玉霞,马洪爱,等. 用改进的 CTAB 法提取肉苁蓉基因组 DNA[J]. 宁夏大学学报(自然科学版),2008,29(1):78-80.
- [2] Porebski S, Bailey G, Bernard R. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components[J]. Plant Molecular Biology Reporter, 1997, 15(1): 8-15.
- [3] 谢让金,邓烈. 一种适合 AFLP 分析的柑橘 DNA 提取方法[J]. 生物技术, 2007, 17(6): 27-28.
- [4] Pierre G, Haurencem D. Isolation of plant DNA: a fast, inexpensive, and reliable method[J]. Plant Mol Biol Rep, 1992, 10: 60-65.
- [5] 熊光明,梁国鲁,阎勇,等. 适用于 AFLP 分析用的柑橘 DNA 提取方法[J]. 果树学报, 2002, 19(4): 267-268.
- [6] 许庆霖. 非洲紫罗兰-最可人的室内花卉(上)[J]. 中国花卉盆景, 1998(11): 22-23.
- [7] 林子. 非洲紫罗兰的温室规模化生产[J]. 中国花卉园艺, 2007(2): 10-13.
- [8] 孙永健. 非洲紫罗兰核型及 DNA 甲基化表观遗传作用的研究[D]. 天津: 天津农学院, 2010.
- [9] 李海渤. 茴香总 DNA 提取方法的比较研究[J]. 北方园艺, 2008(3): 189-192.
- [10] 黄永芳,廖国春,吴雪辉,等. 一种适合 AFLP 分析的油茶 DNA 提取方法[J]. 广东林业科技, 2009, 25(1): 23-26.
- [11] 许婉芳. 去除顽拗植物 DNA 提取过程中干扰物质的方法[J]. 闽西职业大学学报, 2002(3): 56-58.
- [12] 程志学,陈清华,于远,等. 适合 AFLP 分析用的节瓜基因组 DNA 提取方法的研究[J]. 分子植物育种, 2009, 7(2): 420-424.

## Study on DNA Extraction of *Saintpaulia ionantha* for AFLP Reaction System

SUN Yong-jian<sup>1</sup>, SUN Ning<sup>2</sup>, CAO Zhi-pan<sup>3</sup>, CHEN Xiao-qiang<sup>2</sup>, ZHANG Nai-nan<sup>2</sup>, ZHANG Lei<sup>2</sup>

(1. Tianjin Tianshi College, Tianjin 301700; 2. Tianjin Agricultural University, Tianjin 300384; 3. Tianjin Institute of Hematology, Chinese Academy of Medical Sciences, Tianjin 300020)

**Abstract:** Taking the same leaves and stems of *Saintpaulia ionantha* as materials, fresh tissue extraction, drying tissue extraction, freeze drying tissue extraction, 3 different pre-treatment were adapted, also DNA Kit, CTAB-I, CTAB-II 3 different extraction methods were adopt, to compare DNA fragment size, purity and yield through different extraction method. The best DNA extraction method for *Saintpaulia ionantha* which contained more polysaccharide polyphenols and moisture was determined. The results showed CTABII method and the material processed by freeze-drying before test, namely, in the second extraction steps, added CTAB preprecipitation in the method of DNA precipitation method. DNA received by this method could be used as template for PCR in study at further molecular research.

**Key words:** DNA extraction; *Saintpaulia ionantha*; CTAB; freeze-drying; AFLP analysis