

文章编号: 1001-1498(2006)06-0725-04

基于 CTAB 法提取毛竹基因组 DNA 的探讨

高志民¹, 范少辉¹, 高 健¹, 李雪平¹, 蔡春菊¹, 彭镇华^{2*}

(1. 国际竹藤网络中心, 国家林业局竹藤科学与技术重点开放实验室, 北京 100102;

2. 中国林业科学研究院林业研究所, 北京 100091)

摘要:应用 CTAB 法、改良 CTAB 法、改良 CTAB 高盐沉淀法对毛竹基因组 DNA 进行了提取,并用紫外分光光度计(UV3300)、琼脂糖凝胶电泳和 PCR 分析对提取的 DNA 进行了检测,对 DNA 的产量、质量、PCR 效果等方面进行了综合比较。结果表明:改良 CTAB 高盐沉淀法是提取高质量毛竹基因组 DNA 的较好方法。

关键词:毛竹;基因组 DNA;CTAB 法

中图分类号: S795

文献标识码: A

Extract Genomic DNA from *Phyllostachys edulis* by CTAB-Based Method

GAO Zhi-min¹, FAN Shao-hui, GAO Jian¹, LI Xue-ping¹, CAI Chun-ju¹, PENG Zhen-hua²

(1. International Center for Bamboo and Rattan, SFA Key Laboratory on Bamboo and Rattan Science and Technology, Beijing 100102, China;

2. Research Institute of Forestry, CAF, Beijing 100091, China)

Abstract: CTAB method, improved CTAB method, improved CTAB-high salt precipitation method were used to extract genomic DNA from the leaves of *Ph. edulis*. The DNA samples obtained were tested by UV spectrophotometer 3300, agarose gel electrophoresis and PCR method. The differences in yield, quality and PCR result of the obtained DNA were compared. The results revealed that improved CTAB-high salt precipitation method was an inexpensive and reliable method for the genomic DNA extraction of *Ph. edulis*.

Key words: *Phyllostachys edulis*; Genomic DNA; CTAB method

毛竹 (*Phyllostachys edulis* (Caar) H. de Lehaie) 隶属禾本科 (Poaceae)、竹亚科 (Bambusoideae)、刚竹属,是我国分布最广、面积最大、经济价值最高的竹种之一,有着广泛的开发前景,急需对毛竹进行系统的生物学研究。制备毛竹基因组 DNA 是对毛竹进行基因结构、功能研究、性状改良的重要步骤,然而竹类植物材料中的蛋白质、多糖以及酚、脂类等次生代谢物质给 DNA 的提取和纯化造成很大的困难,毛燕等^[1]对毛竹等 9 种竹叶片的研究结果表明,竹叶中蛋白质、多糖的含量较高,其中蛋白质的平均含量为 131.6 g · kg⁻¹,多糖的平均含量为 148.9 g · kg⁻¹。另外竹叶中还含有黄酮、多酚等次生物质,这

些物质都影响 DNA 的提取质量,从而影响分子生物学的进一步开展。

目前,植物基因组 DNA 的提取方法主要有 CTAB 法和 SDS 法。CTAB 法最大的优点是能除去多糖,主要用于草本植物和不含或少含酚类的植物 DNA 的提取^[2],SDS 法可获得分子量较高的 DNA,但多糖类含量较多^[3]。用这些方法提取毛竹基因组 DNA 比较难取得良好的效果。本研究通过对 CTAB 法及其改进方法提取基因组 DNA 的比较,获得了毛竹基因组 DNA 的有效提取方法,为进一步开展毛竹的分子生物学研究打下基础。

收稿日期: 2005-09-21

基金项目: 国际竹藤网络中心青年基金“花雄性不育突变体的鉴定及其调控基因的初步定位研究”,国家林业局 948 项目 (2005-4-38)

作者简介: 高志民 (1971—),男,河北唐山人,博士。

*通讯作者

1 材料与方 法

1.1 DNA 提取方 法

1.1.1 CTAB 沉淀法^[4] 取 0.1 g 毛竹 (取自北京植物园竹种园) 幼嫩叶片, 将提取的 DNA 溶解于 40 μL Milli-Q 超纯水 (MQW) 中, 存于 -20°C 冰箱中备用。

1.1.2 改良 CTAB 法 提取液配制: DNA 提取液 (Tris-HCl pH 8.2)、细胞裂解液 ($1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl pH 7.5, $0.25\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ EDTA pH 8.0, $5\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl, 2% CTAB) 与 5% Sarkosyl 按 5:5:2 混合, 在使用前加入 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 至终浓度 $0.02\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

取 0.1 g 毛竹幼嫩叶片, 于液氮中迅速研磨成粉末, 然后快速转移至 1.5 mL 离心管中, 置于冰中; 加入 65 μL 预热的 DNA 提取液 650 μL , 在 65 $^\circ\text{C}$ 水浴中保温 40~60 min, 5 min 后轻摇 1 次, 之后每隔 20 min 轻摇 1 次; 加入 650 μL 的氯仿/异戊醇 (24:1), 充分混匀, 在室温下轻摇混均, 然后以 $13\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min; 吸出上清液放入新的 1.5 mL 离心管中, 重复步骤, 吸出上清液放入新的 1.5 mL 离心管中, 加入 0.6~1.0 倍体积的 -20°C 预冷的异丙醇, 轻轻摇匀并于 -20°C 冰箱中放置 30 min 使 DNA 充分沉淀; 用离心机 (Eppendorf 5417C) $12\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 弃上清液, 收集沉淀; 用 1 mL 70% 乙醇洗涤沉淀, $12\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 弃上清液, 在超净工作台风干, 用 40 μL MQW 溶解 DNA, 存于 -20°C 备用。

1.1.3 改良 CTAB 高盐沉淀法 同 1.1.2;

用 1 mL 70% 乙醇洗涤沉淀, $12\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 弃上清液, 在超净工作台内风干, 用 MQW 200 μL 溶解 DNA; 加入 200 μL 的 $5\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 NaCl, 混均后加入 2 倍体积的无水乙醇, -20°C 冰箱中沉淀 20 min; $13\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 弃上清液; 加入 70% 乙醇 1 mL 洗涤沉淀, $13\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 弃上清液, 在超净工作台内风干, 用 40 μL MQW 溶解 DNA, 存于 -20°C 备用。

1.2 DNA 的检测方 法

1.2.1 DNA 浓度和纯度检测 取 4 μL DNA 样品用 MQW 稀释 500 倍, 用紫外分光光度计 (UV3300) 测定波长在 230、260、280 nm 处的光吸收值, 根据 260 nm 处的光吸收值计算 DNA 浓度, 根据 260/280、260/230 值确定 DNA 的纯度。

1.2.2 DNA 凝胶电泳检测 以噬菌体 DNA 为标记, 取 DNA 溶液 4 μL , 上样缓冲液 (含 0.25% 溴酚

蓝, 40% 蔗糖) 4 μL , 混匀, 点入含 $0.5\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 溴化乙锭的 0.8% 琼脂糖凝胶中, 用 $1\times\text{TAE}$ 缓冲液电泳, 于凝胶成像系统 (Alpha2200) 下观察, 获取图象。

1.2.3 PCR 检测 取 3 种方法提取的总 DNA 1 μg 作为模板, 用拟南芥 (*Arabidopsis thaliana* L.) 的 SNP 引物进行 PCR 扩增反应, 正向引物 F24C20-F: 5'-GATGATGCTCTTTGTCGTC-3', 反向引物 F24C20-R: 5'-CCAAATCTCTCTCTCTCA GCC-3', 预期大小为 0.6 kb 左右。反应体系为 20 μL , 其中包括: $10\times$ PCR Buffer 2 μL , $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ dNTP 2 μL , $5\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 正、反向引物各 2 μL , 模板 1 μL , Taq 酶 1 μL , 用 MQW 补足体积至 20 μL 。PCR 反应在 PTC-200 型扩增仪中进行。反应程序为 95 $^\circ\text{C}$ 4 min, 然后 94 $^\circ\text{C}$ 1 min, 57 $^\circ\text{C}$ 1 min, 72 $^\circ\text{C}$ 1 min, 40 个循环, 72 $^\circ\text{C}$ 10 min。反应结束后, 取 10 μL 扩增产物电泳检测。

2 结果与分 析

2.1 DNA 的波长扫描结果

DNA 在 260 nm 处有特异的紫外吸收峰, 且吸收强度与系统中的 DNA 浓度成正比^[5]。图 1 显示

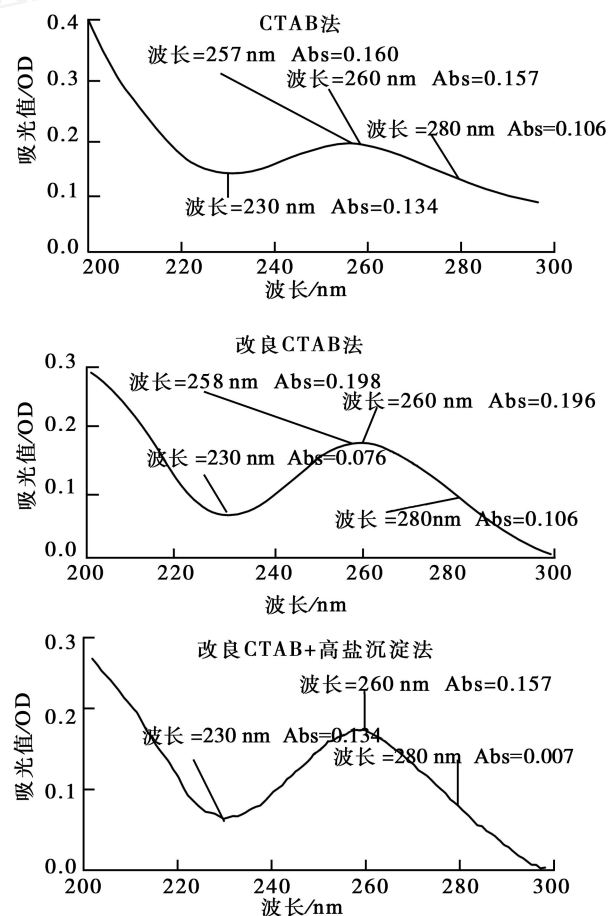


图 1 3 种方法提取的毛竹基因组 DNA 的波长扫描图

用 3 种方法提取的基因组 DNA 都在紫外 257 ~ 260 nm 处出现最高峰值,在 280 nm 处光密度曲线呈下降趋势,说明试验样品的最大吸收峰位于 260 nm 处附近,这也与核酸扫描曲线的要求相吻合;但是 CTAB 法和改良 CTAB 法的最大吸光值的出现都略微早于 260 nm,分别在 257、258 nm,说明了可能有其它杂质的存在,而改良 CTAB 高盐沉淀法的最大吸光值恰好在 260 nm 出现,从一定程度上说明了 DNA 的纯度较高。

2.2 DNA 的纯度与产量

DNA 的纯度常用 OD_{260} 与 OD_{280} 的比值来判定。当 $OD_{260}/OD_{280} > 2.0$ 时表示有 RNA 污染, $OD_{260}/OD_{280} < 1.6$ 时表示有蛋白质污染, OD_{260}/OD_{280} 为 1.6 ~ 2.0 时,表示提取的 DNA 纯度较高^[6]。

从表 1 可以看出,CTAB 法提取 DNA 的 OD_{260}/OD_{280} 的值为 1.378 5 ~ 1.657 1,表明提取的样品 DNA 中蛋白质未除尽,且盐离子含量较高; OD_{260}/OD_{230} 为 0.856 1 ~ 1.705 9,说明 DNA 样品中所含的

酚类物质也比较多;每 0.1 g 毛竹幼嫩叶片可提取 200 μ g 左右的 DNA。改良 CTAB 法提取 DNA 的 OD_{260}/OD_{280} 的值为 1.603 4 ~ 1.692 3,且 OD_{260}/OD_{230} 为 1.823 5 ~ 2.315 8,表明提取的 DNA 样品中蛋白质和酚类的污染较少;每 0.1 g 毛竹幼嫩叶片可提取约 100 μ g DNA。改良 CTAB 高盐沉淀法提取 DNA 的 OD_{260}/OD_{280} 的值一般为 1.8 ~ 2.0,表明提取的样品 DNA 中蛋白质和盐离子含量都较低; $OD_{260}/OD_{230} > 2$,说明 DNA 样品中基本无酚类物质的污染;每 0.1 g 毛竹幼嫩叶片可提取约 55 μ g DNA。

从表 1 的数据来看,DNA 的产量以 CTAB 法的最高,改良 CTAB 法次之,而改良 CTAB - 高盐沉淀法则由于增加沉淀步骤而降低,但其 OD_{260}/OD_{280} 、 OD_{260}/OD_{230} 的值比较理想,因此,综合考虑 3 种提取方法的质量优劣顺序为:改良 CTAB 高盐沉淀法 > 改良 CTAB 法 > CTAB 法。

表 1 3 种方法提取的毛竹基因组 DNA 紫外检测分析结果 (3 次平均值)

方法	样品号	OD_{230}	OD_{260}	OD_{280}	OD_{260}/OD_{230}	OD_{260}/OD_{280}	DNA 产量 / (μ g · μ L ⁻¹)
CTAB 法	1	0.135	0.158	0.105	1.170 4	1.504 8	3.950
	2	0.102	0.174	0.105	1.705 9	1.657 1	4.350
	3	0.285	0.244	0.177	0.856 1	1.378 5	6.100
	4	0.199	0.221	0.148	1.110 6	1.493 2	5.525
改良 CTAB 法	1	0.038	0.088	0.052	2.315 8	1.692 3	2.200
	2	0.057	0.108	0.066	1.894 7	1.636 4	2.700
	3	0.049	0.098	0.059	2.000 0	1.661 0	2.450
	4	0.051	0.093	0.058	1.823 5	1.603 4	2.325
改良 CTAB 高盐沉淀法	1	0.015	0.050	0.024	3.333 3	2.083 3	1.250
	2	0.021	0.054	0.029	2.571 4	1.862 1	1.350
	3	0.028	0.071	0.038	2.535 7	1.868 4	1.775
	4	0.029	0.057	0.032	1.965 5	1.781 3	1.425

2.3 分子量检测

一般认为,10 kb 以上的 DNA 片段作为模板,基本上就可符合 RAPD 分析的要求^[7]。在图 2 中可以看出 3 种提取方法所得到的毛竹基因组 DNA 的大小在 50 kb 左右,但不同方法的电泳效果差异比较明显。CTAB 法提取的毛竹基因组 DNA 的带型明显不整齐,前后都有拖尾现象,点样孔颜色较深,且 RNA 含量比较高,说明样品中蛋白、多糖等杂质的含量比较高,从而影响电泳效果;而改良 CTAB 法的样品的点样孔较暗,而且带型也比较整齐,说明样品中杂质较少。在改良 CTAB 法的基础上再用高盐沉

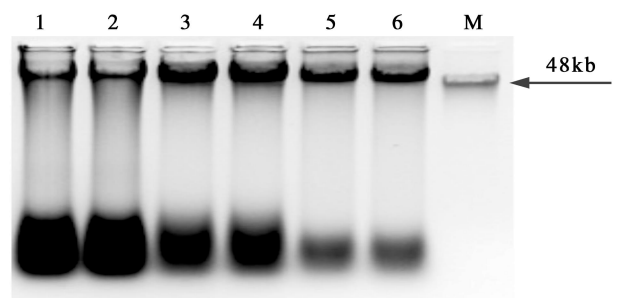


图 2 3 种方法提取的毛竹基因组 DNA 的电泳图
1、2 CTAB 法;3、4 改良 CTAB 法;
5、6 改良 CTAB 高盐沉淀法;M 为 DNA

淀法沉淀,对提取毛竹基因组 DNA 的效果较好,这与前面紫外检测结果一致。

2.4 PCR检测

把 3 种方法提取的 DNA 作为模板进行 PCR 检测,结果见图 3。CTAB 法所得 DNA 的 PCR 反应与改良 CTAB 法和改良 CTAB 高盐沉淀法相比,效果明显较差,而且在重复实验时发现 CTAB 法所得 DNA 作为模板进行 PCR 反应的稳定性也较差,这与毛竹中的复杂内含物有关。正如其它研究报道所述,影响 PCR 扩增的 DNA 杂质往往不是 RNA 或蛋白质这些大分子物质,而是多糖和酚类等小分子物质^[8]。

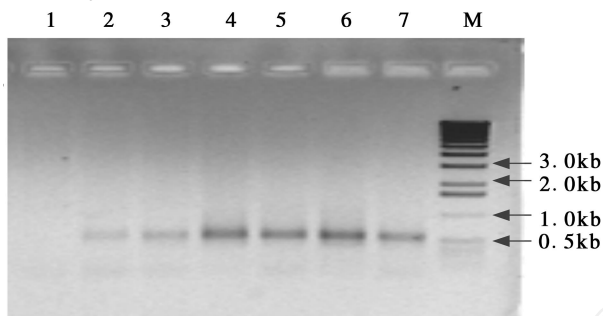


图 3 用 3 种方法提取的毛竹 DNA 的扩增结果
1 水对照 2、3 CTAB 法 4、5 改良 CTAB 高盐沉淀法;
6、7 改良 CTAB 法;M 分子量标记

3 讨论与小结

(1) 在毛竹基因组 DNA 的琼脂糖凝胶电泳检测中,本研究选用了噬菌体 DNA 标记 (TaKaRa 产品,货号为 D3010) 为 48 502 bp,所以估计实验所得毛竹基因组 DNA 约为 50 kb,这与报道的采用 CTAB 法提取植物基因组 DNA 约为 23 kb^[9,10] 有较大的差异。因此,采用 CTAB 法提取毛竹基因组 DNA 的大小问题有待于进一步验证。

(2) 对 CTAB 法、改良 CTAB 法和改良 CTAB 高盐沉淀法提取的毛竹基因组 DNA 产量、质量及 PCR 效果的比较结果表明,与 CTAB 法相比,改良 CTAB 法和改良 CTAB 高盐沉淀法均能够获得较高质量的 DNA,同时具有比 CTAB 法优越之处:

1) 在保证高质量的前提下,操作简单易行,可以节省时间。常规的 CTAB 法中需要使用巯基乙醇,需要在通风橱中进行,不仅操作不便费时,而且

挥发气味不利于人体健康,而改良 CTAB 法和改良 CTAB - 高盐沉淀法避免了使用巯基乙醇,代之以 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 、 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 溶解后形成 NaHSO_3 ,作为还原剂起到防止酚类氧化的作用,这有利于减少有害试剂的污染。

2) 试验成本降低。苯酚是很强的蛋白质变性剂,而且具有很强的腐蚀性,在操作过程中需要戴手套操作,而改良 CTAB 法和改良 CTAB 高盐沉淀法中用氯仿/异戊醇 (24:1) 来抽提 2 次同样取得了良好的效果,从一定程度上可以降低提取成本。

3) 多糖常与 DNA 同时沉淀并使沉淀物呈胶冻状。CTAB 高盐沉淀法是在 CTAB 法的基础上,加入 NaCl 使终浓度达到 $2.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$,从而使 CTAB 未能去除的多糖保留在溶液中,达到去除多糖的目的。

总之,针对毛竹试验材料中富含蛋白、多糖、多酚等物质的特殊性,其基因组 DNA 的提取采用改良 CTAB 法和改良 CTAB 高盐沉淀法都能取得良好的效果,在一般的 PCR 反应中用改良 CTAB 法提取的 DNA 就可以满足要求,若需要高质量的 DNA 则可以采用改良 CTAB 法再加高盐沉淀法进行提取。

参考文献:

- [1] 毛燕,王学利. 毛竹等九种竹叶中蛋白质和总糖含量的测定 [J]. 竹子研究汇刊, 1998 (2): 18 ~ 20
- [2] 袁长春,施苏华,叶创兴. 从富含酚类的茶类植物叶中提取纯净的总 DNA [J]. 中山大学学报论丛, 2001, 21 (3): 1 ~ 4
- [3] 邹喻苹,汪小全,雷一丁,等. 几种濒危植物及其近缘类群总 DNA 的提取与鉴定 [J]. 植物学报, 1994, 36 (7): 528 ~ 533
- [4] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual [M]. New York: Cold spring harbor laboratory press, 1989
- [5] 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
- [6] 徐宝梁,苏宁,陈颖,等. 转基因棉籽检测中 DNA 模板提取方法研究 [J]. 生物技术, 2004 (4): 25 ~ 27
- [7] 汪小全,邹喻苹,张大明. RAPD 应用于遗传多样性和系统学研究中的问题 [J]. 植物学报, 1996, 38 (12): 954 ~ 962
- [8] 夏铭,栾非时,李景鹏. RAPD 影响因素的研究及实验条件的优化 [J]. 植物研究, 1999, 19 (2): 95 ~ 201
- [9] 张进忠,王永芬,王建波. 地黄品种遗传多样性 RAPD 分析 [J]. 河南农业科学, 2006 (6): 97 ~ 100
- [10] 汪结明,项艳,沈周高,等. 杨树基因组 DNA 提纯方法的优化及其 RAPD 鉴定 [J]. 中国农学通报, 2006, 22 (5): 59 ~ 62