

快速微量提取竹子叶片 DNA 的方法

文兰^{1,2} 高健^{1*} 李雪平¹ 高志民¹ 李潞滨² 彭镇华^{1,2*}

(国际竹藤网络中心 北京 100102)

(中国林业科学研究院林业研究所 北京 100091)

摘 要 介绍了一种快速微量提取角竹叶片DNA的方法。该方法简便易行,操作简单,所需材料少,提取的DNA纯度较高,OD₂₆₀/OD₂₈₀一般在1.9左右,可满足一般的RAPD、SSR、转基因植株的PCR检测为基础的实验需要。

关键词 角竹;基因组DNA;快速法;微量

A Rapid Method for Isolation DNA from Small Amount Leave of Bamboo

Abstract: In this article a rapid method for isolation of genomic DNA from frozen *Phyllostachys fimbriatigula* leave was proposed. The method is very simple and rapid. The isolated DNA has good purity with OD₂₆₀/OD₂₈₀ from 1.9 to 2.1, and can meet the requirement for PCR-based technology, such as RAPD, SSR and PCR detection of transgenic plants.

Key Words: *Phyllostachys fimbriatigula*; genomic DNA; rapid method; small amount leave

植物基因组 DNA 的分离是生物工程中的基本操作之一,对此已有大量研究报道。依据所采用的原理不同,植物基因组 DNA 的提取方法主要有 SDS 和 CTAB 法,这两种方法各有优缺点,但步骤较为繁琐,所用时间较长,需要较多的植物材料,有时不能满足现代分子生物学研究的需要。故而如何快速而高质量地提取基因组 DNA 的问题就显得非常重要。CTAB 法和 SDS 法作为一种常规植物 DNA 提取的方法已被广泛使用,禾本科植物上的应用也不少,如水稻等,而竹子和水稻同属禾本科,在进化上有较近的亲缘关系。竹叶中的蛋白质,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。毛燕等对毛竹等 9 种竹叶的研究结果表明,竹叶中蛋白质,多糖的含量较高,其中蛋白质的平均含量为 13.16%,多糖的平均含量为 14.89%。另外竹叶中还含有黄酮、多酚等次生物质,这些都影响大量 DNA 的提取质量,从而影响分子生物学研究的进一步开展,由于竹类植物杂质含量较高,减少材料有助于提高基因组 DNA 的提取质量。本文在此基础上建立了一种快速微量提取角竹叶片 DNA 的方法,与其他的微量 DNA 提取方法相比具有 DNA 得率高,操作简单,以及材料需要少的优点。

1 材料与方法

1.1 材料

本实验以籼竹超族倭竹族刚竹亚族刚竹属刚竹组的角竹 (*Phyllostachys fimbriatigula* Wen) 为实验材料(取自中国林科院良乡基地,北京)。

1.2 仪器和设备

离心机 (Eppendorf 5417C), 紫外分光光度计 (UV 3300), 水平电泳仪 (Biorad), 紫外凝胶成像系统 (Alpha 2200), PCR 仪, 恒温水浴锅等。

1.3 试剂

DNA 提取缓冲液 (1 M Tris-HCl, (pH 8.0), 0.5 M EDTA, (pH 8.0), 5 M NaCl, 20% SDS (w/v)), Tris 饱和酚:氯仿:异戊醇 (25:24:1), 无水乙醇, 异丙醇, 75% 乙醇, TAE 缓冲液, 琼脂糖 (0.8%)。

1.4 方法与步骤

(1) 从 -80℃ 冰箱中取出角竹竹叶, 在电子天平上称取 0.02 g 叶片于液氮中研磨至灰白状粉末放入 1.5 ml 的装有已 65℃ 预热 25 min 的 DNA 提取液 600 ul 的 Eppendorf 管中, 65℃ 恒温水浴 15 min, 其间摇匀 2 次。

* 国家林业局“948”项目资助。

(2) 加入等体积的 Tris 饱和酚: 氯仿: 异戊醇 (25: 24: 1), 混匀约 10s 后, 放入 60℃ 的水浴锅中恒温水浴 10 min, 离心 (12 000 rpm, 10 min)。取上清液于新的 Eppendorf 管分装, 即每管装上清液约 300 ul, 加入 300 ul 异丙醇, 混匀, 见絮状物, -20℃ 沉淀 15 min。

(3) 取出 Eppendorf 管离心 (12 000 rpm, 10 min), 弃上清液。用 75% 乙醇溶液洗涤 DNA 沉淀 2 次, 每次静置约 5 min, 除去乙醇, 于通风橱内风干, 40 min 后, 加 50 ul 水溶解沉淀, 于 -20℃ 或 4℃ 贮存备用。

1.5 基因组 DNA 的 PCR 检测

将提取的基因组 DNA, 用毛白杨 SNP 引物进行 PCR 扩增反应, 正向引物 5' CGC CAC AAT GAA TCC ACA AG3', 反向引物 5' GTT ATA TGC CTG GCA ACT TC3', 反应体系为 25 ul: 10× PCR buffer 2.5 ul, 2.5 mM dNTP 4 ul, 10 uM 正、反向引物各 1 ul, 模板 1 ul, Taq 酶 0.2 ul, 用灭菌水补足体积至 25 ul, 扩增反应在 Biometra PCR 仪中进行。反应程序为 94℃ 5 min, 然后 94℃ 1 min, 53℃ 35 s, 72℃ 1 min 30 s, 45 个循环, 72℃ 10 min。反应结束后, 取 8 ul 扩增产物电泳检测。

2 结果与分析

2.1 质量与产量检测

仅仅根据 DNA 在 260 nm 处的 OD 值是无法判断基因组 DNA 质量的好坏, 因为提取的基因组 DNA 中还含有其它杂质, 如蛋白质、多糖、酚等, 这些也都影响 DNA 在 260 nm 处的光吸收值, 所以一般根据 OD_{260}/OD_{280} 的比值来判断 DNA 的纯度。 $OD_{260}/OD_{280} > 2.0$, 表示有 RNA 等小分子物质污染, $OD_{260}/OD_{280} < 1.8$ 时表示有蛋白质等物质污染, OD_{260}/OD_{280} 在 1.8~2.0 之间, 表示提取的 DNA 模板纯度较高。表 1 列出了快速微量法提取角竹基因组 DNA 的紫外检测结果。

表 1 快速微量法提取角竹基因组 DNA 紫外分析结果

No.	OD_{260}	OD_{280}	OD_{260}/OD_{280}	Concentration (ug/ul)
	0.026	0.013	2.00	0.52
1	0.025	0.012	2.08	0.50
	0.026	0.013	2.00	0.52
	0.042	0.022	1.91	0.84
2	0.040	0.021	1.90	0.80
	0.042	0.022	1.91	0.84

从上表可以看出, 用快速微量法提取的角竹基因组 DNA OD_{260}/OD_{280} 的平均比值在 1.9, 只有个别样品的比值超过 2.0。表明提取的样品 DNA 中杂质去除较彻底, DNA 中蛋白质和盐离子等其他杂质含量较低, 提取的基因组 DNA 纯度高, 能满足一些以 PCR 扩增为基础的实验。

2.2 分子量检测

一般说来, 分子量大于 10kb 的 DNA 就可以符合 RAPD 的要求。从图 1 中可以看到快速微量法提取的角竹基因组 DNA 在高分子量区有明显的主带, 表明 DNA 具有良好的完整性, 由图 1 可知, 角竹的分子量在 50kb 左右。快速微量提取的角竹基因组 DNA 的电泳效果为理想, 点样孔暗, 带型整齐且亮, 前后拖尾较弱。电泳结果显示该法提取的基因组 DN 具有不同程度的 RNA 污染, 但并不会对后续 PCR 扩增产生影响。

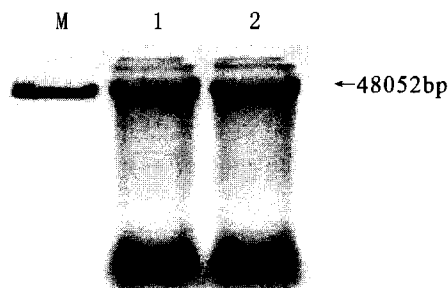


图 1 快速微量法提取的角竹基因组 DNA 电泳效果

注: M 为 λ DNA, 其分子量为 48 052 bp, 1, 2 为快速微量法提取的角竹基因组 DNA。

2.3 所得 DNA 样品 PCR 检测

将快速微量法提取所得的基因组 DNA 样品直接进行 PCR 反应, 结果如图 2 所示。从中可以看出每个样品 PCR 扩增出明显的目的带, 其分子量为 0.5 kb, 带型整齐, 亮度比另一条带 (其分子量大小介于 0.5 kb 和 1.0 kb 之间, 约 0.8 kb) 强, 扩增出目的带大小以外的带与 DNA 所含的杂质有关。因此, 快速微量法提取角竹基因组 DNA 能满足以 PCR 为基础的实验。

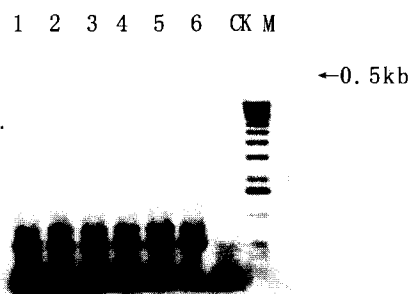


图 2 快速微量法所得角竹基因组 DNA PCR 扩增效果

注: M 为 1kb 的 DNA marker, 1~6 为角竹基因组 DNA PCR 扩增结果。

3 小结与讨论

通过对快速微量提取角竹基因组 DNA 的产量、质量的检测以及分子量、PCR 扩增测, 对材料少或冷冻储存时间较长的竹子, 当下游实验对 DNA 质量要求不高时, 可采用本实验方法。本实验方法的优点是:

(1) 操作步骤简化, 完成整个实验约 90 min 左右, 并且提取的 DNA 产量高, 纯度好, 无杂质, 可直接用于 PCR 扩增。

(2) 在 DNA 提取过程中, 去除蛋白质十分关键。由于苯酚能破坏蛋白质的二级结构, 使蛋白质变性, 从溶液中沉淀出来; 而氯仿能将苯酚从溶液中萃取出来, 我们采用了酚-氯仿抽提的方法。与其他微量提取方法, 本方法仅需 1 次酚-氯仿抽提就可以使 OD_{260}/OD_{280} 达到 1.9~2.0。

(3) 采用的均为常规试剂与仪器。如常用的陶瓷研钵研棒, 液氮等。因此本方法可以用于 RAPD、SSR、转基因植株的 PCR 扩增为实验基础的实验。

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. 竹子研究汇刊, 1998, 17(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. 中山大学学报论丛, 2001, 21(3): 1~4
- 3 邹喻萍, 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. 植物学报, 1994, 36(7): 528~533
- 4 Sambrook J.; Fritsch E F. Maniatis. Molecular cloning, T1989
- 5 王齐红, 黄骥, 张红生. 一种快速微量提取植物叶片 DNA 的方法. 生物技术通讯, 2004, 15(5): 479~480
- 6 赵艳丽, 刘国琴. 一种快速提取小麦 DNA 的方法. 郑州工程学院学报, 2002, 23(3): 62
- 7 李维平, 赵文明, 雷萍. 一种少量提取植物组织的快速方法. 西北农林科技大学学报, 2002, 30(6): 125~128

联合国环境署呼吁保护竹子

联合国环境规划署今天公布一份研究报告说, 全球的竹子正在遭受人类活动的破坏, 全球 1 200 种竹子有一半面临绝种的危险, 许多依赖竹子生存的动物也爱到危及。环境署说, 人类对竹子的利用包括建筑、制作手工艺品和食用竹笋等, 全球每年对竹子的贸易总额高达 20 亿美元。环境署指出, 由于人类对竹林的过度开发, 导致竹子大量减少, 而全球有许多珍奇动物依赖于竹子生存, 或以其为食, 或以其为巢。环境署警告, 如果竹继续遭到大规模破坏, 这些动物将失去赖以生存的环境和资源而濒临灭绝。环境署执行主任特普费尔说, 竹子是地球上最古老和最迷人的生命形式之一, 许多珍奇的动物如大熊猫、大猩猩和狐猴都依赖于竹子生存; 竹子 also 具有很高的经济价值, 全球竹子贸易总额相当于香蕉和美国的牛肉。特普费尔指出, 当前各国普遍忽视竹子的重要性, 也忘记许多动物靠竹子生存, 他希望人类爱惜竹子、保护竹林和靠竹子生存的动物。

——联合国新闻

马达加斯加竹资源保护和生物多样性的的重要性

马达加斯加的 25 种竹子的天然林分布都小于 2 万 km², 而且有多达 10 种竹子的天然林分布不足 2 000 km²。虽然过去的植物保护标准被认为与《世界自然保护联盟 (IUCN) 濒危植物红色名录》的入选标准相似, 但目前还没有一种马达加斯加的竹子被 IUCN 列为全球性保护植物。除了地域性和受到潜在威胁之外, 许多马达加斯加木本竹子也是其它物种生存的基础。最具代表性的例子可能要属竹林狐猴了。共有 3 种已经被识别出来的竹林狐猴, 它们在马达加斯加的栖息地各不相同: 它们是灰驯狐猴、阔鼻驯狐猴和金竹狐猴。竹林狐猴的存在成为竹子在天然林分布较广的标志性特征, 竹子的不同部位是这些狐猴的主要食物来源。灰驯狐猴以嫩笋、竹叶柄为食, 有时以部分竹种的竹肉为食。数量稀少、体型较大的阔鼻驯狐猴基本只吃竹肉, 主要以氰化物含量较高的巨型竹种 (*Cathariostachys madagascariensis*) 的竹笋为食。金竹狐猴也以这些竹种的叶柄和嫩笋为食, 也吃其他小型竹子。除了狐猴, 其他动物也依赖于竹子。有一种热带雨林小生境是依靠“竹井”而存在的, “竹井”是指那些灌满雨水的倒下的竹杆。一些动物把它们作为繁殖的场所, 其它则把它们当做躲避潜在捕食者的庇护所。

——国际竹藤组织