

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 3 300, 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 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中备用。

1.1.2 改良 CTAB 法 提取液配制:DNA 提取液(Tris-HCl pH8.2)、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 $0.02\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

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;②加入 $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预热的 DNA 提取液 $650\text{ }\mu\text{L}$,在 $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴中保温 $40\sim 60\text{ min}$,5 min 后轻摇 1 次,之后每隔 20 min 轻摇 1 次;③加入 $650\text{ }\mu\text{L}$ 的氯仿/异戊醇(24:1),充分混匀,在室温下轻摇混匀,然后以 $13\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$,离心 10 min;④吸出上清液放入新的 1.5 mL 离心管中,重复步骤③,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 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预冷的异丙醇,轻轻摇匀并于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中放置 30 min 使 DNA 充分沉淀;⑤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;⑥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 $40\text{ }\mu\text{L}$ MQW 溶解 DNA,存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 备用。

1.1.3 改良 CTAB-高盐沉淀法 ①~⑤同 1.1.2;⑥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 $200\text{ }\mu\text{L}$ 溶解 DNA;⑦加入 $200\text{ }\mu\text{L}$ 的 $5\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 NaCl,混均后加入 2 倍体积的无水乙醇, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中沉淀 20 min;⑧ $13\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 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 $40\text{ }\mu\text{L}$ MQW 溶解 DNA,存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 备用。

1.2 DNA 的检测方 法

1.2.1 DNA 浓度和纯度检测 取 $4\text{ }\mu\text{L}$ 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 λ 噬菌体 DNA 为标记,取 DNA 溶液 $4\text{ }\mu\text{L}$,上样缓冲液(含 0.25% 溴酚

蓝,40% 蔗糖) $4\text{ }\mu\text{L}$,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 $1\text{ }\mu\text{g}$ 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'-GATTGATGCTCTTTGTCGTCC-3',反向引物 F24C20-R:5'-CCAATTCCTCTTCTTCTCAGCC-3',预期大小为 0.6 kb 左右。反应体系为 $20\text{ }\mu\text{L}$,其中包括: $10\times\text{PCR Buffer}$ $2\text{ }\mu\text{L}$, $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ dNTP $2\text{ }\mu\text{L}$, $5\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 正、反向引物各 $2\text{ }\mu\text{L}$,模板 $1\text{ }\mu\text{L}$,Taq 酶 $1\text{ }\mu\text{L}$,用 MQW 补足体积至 $20\text{ }\mu\text{L}$ 。PCR 反应在 PTC-200 型扩增仪中进行。反应程序为 $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 4 min,然后 $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 1 min, $57\text{ }^{\circ}\text{C}$ 1 min, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 1 min,40 个循环, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 10 min。反应结束后,取 $10\text{ }\mu\text{L}$ 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

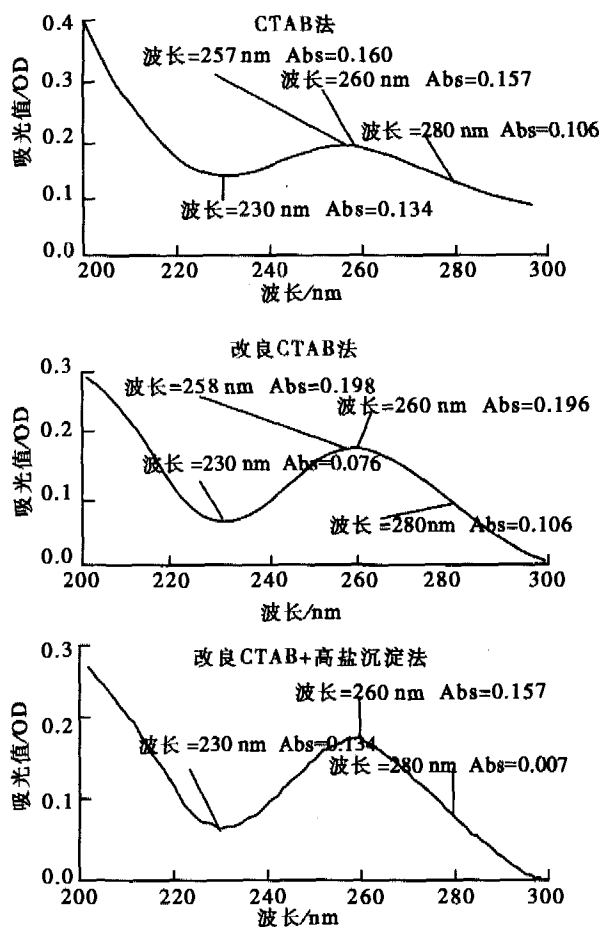


图 1 3 种方法提取的毛竹基因组 DNA 的波长扫描图

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1.3785~1.6571,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0.8561~1.7059,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 μg 左右的DNA。改良CTAB法提取DNA的 OD_{260}/OD_{280} 的值为1.6034~1.6923,且 OD_{260}/OD_{230} 为1.8235~2.3158,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 μg 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 μg 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/ $(\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1})$
CTAB法	1	0.135	0.158	0.105	1.1704	1.5048	3.950
	2	0.102	0.174	0.105	1.7059	1.6571	4.350
	3	0.285	0.244	0.177	0.8561	1.3785	6.100
	4	0.199	0.221	0.148	1.1106	1.4932	5.525
改良CTAB法	1	0.038	0.088	0.052	2.3158	1.6923	2.200
	2	0.057	0.108	0.066	1.8947	1.6364	2.700
	3	0.049	0.098	0.059	2.0000	1.6610	2.450
	4	0.051	0.093	0.058	1.8235	1.6034	2.325
改良CTAB-高盐沉淀法	1	0.015	0.050	0.024	3.3333	2.0833	1.250
	2	0.021	0.054	0.029	2.5714	1.8621	1.350
	3	0.028	0.071	0.038	2.5357	1.8684	1.775
	4	0.029	0.057	0.032	1.9655	1.7813	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

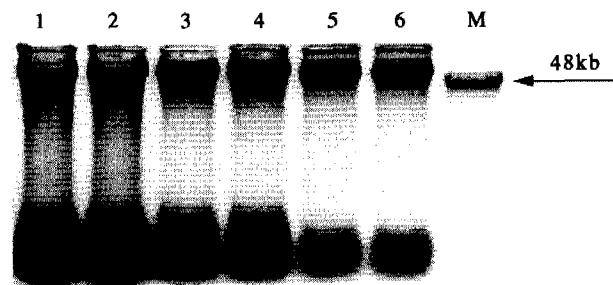


图2 3种方法提取的毛竹基因组DNA的电泳图
1、2 CTAB法;3、4 改良CTAB法;
5、6 改良CTAB-高盐沉淀法;M为 λ DNA

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]。

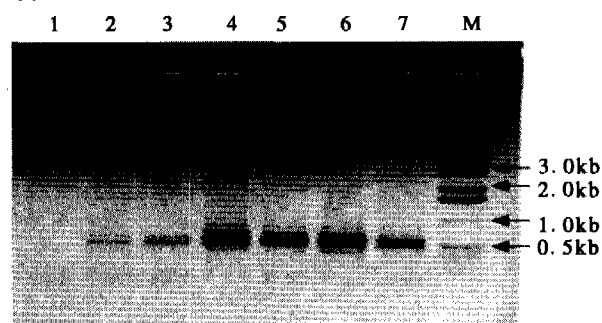


图3 用3种方法提取的毛竹DNA的扩增结果

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 λ 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 β -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 β -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