

文章编号: 1000-5013(2009)01-0071-04

黑木相思基因组 DNA 的快速提取

胡 薇, 陈 宇, 林来水, 林思祖

(福建农林大学 林学院, 福建 福州 350002)

摘要: 用 SDS 高盐介质法和 $1.5 \times$ CTAB 法提取黑木相思幼叶及叶状柄基因组 DNA, 将其与 $2 \times$ CTAB 法、 $3 \times$ CTAB 法、改进的 CTAB 法进行比较, 并用紫外光谱吸收、凝胶电泳、限制性内切酶消化、RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) 和 ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) 等方法进行鉴定. 结果表明, 叶状柄多糖的质量分数较幼叶少, 更易于基因组 DNA 的提取; SDS 高盐介质法与 $1.5 \times$ CTAB 法提取叶状柄的基因组 DNA 得率为 $180.0 \sim 697.5 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, 分子质量为 48 kb , $D(260)/D(280) = 1.750 \sim 1.955$, 无需经 RNase 处理, 可直接用于限制性酶切和 RAPD 及 ISSR 分析; $1.5 \times$ CTAB 法所提的基因组 DNA 的纯度优于 SDS 高盐介质法. 综合考虑认为, $1.5 \times$ CTAB 法可作为黑木相思基因组 DNA 快速提取的简便方法.

关键词: 黑木相思; 基因组 DNA; 提取; CTAB 法

中图分类号: Q 781; Q 949.751.9

文献标识码: A

黑木相思 (*Acacia melanoxylon*) 属含羞草科 (Mimosaceae) 金合欢属 (*Acacia mill*), 自然分布于澳大利亚亚布里斯班以南, 至南澳洲的东南部和塔斯马尼亚岛, 天然分布于南纬 $22 \sim 43^\circ$. 20 世纪 90 年代引入我国, 是较为耐寒的相思树种, 强阳性、耐干旱、耐瘠薄, 根系有生物固氮能力, 具有提高和恢复地力的生态作用^[1], 可以解决闽北地区针叶树种长期连作地力衰退、土壤酸化、林种单一问题^[2]. 从分子水平对黑木相思的基因资源及遗传基础进行研究, 进而为分子辅助育种奠定基础, 是黑木相思研究的一个重要组成部分. 目前, 黑木相思在分子生物学方面的研究较少, 而获取高质量的总 DNA 是开展分子生物学研究的前提. 由于黑木相思含有大量多糖、多酚和次生代谢物质, 给 DNA 的提取带来一定的难度. SDS (十二烷基硫酸钠) 高盐介质法^[3]较常规 SDS 法省去了添加液氮研磨和水浴加热抽提等操作, 简便快速, 而 CTAB (十六烷基三甲基溴化铵) 法由于其中含有去多糖功效显著的组分而被选为常用的基因组 DNA 提取方法. 本文将 SDS 高盐介质法和 CTAB 法应用于黑木相思基因组 DNA 提取.

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试黑木相思分别采自福建农林大学组培幼苗和漳浦中西林场, 实验所用材料包括幼叶和叶状柄.

1.2 DNA 提取

取 0.2 g 上述实验材料的幼嫩叶片放入研钵内, 加少量石英砂和 1 mL 相应裂解液 (CTAB 裂解液需 65°C 预热; SDS 裂解液: $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris (pH= 8.0), $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA (pH= 8.0), $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl, 质量分数为 2% 的 SDS, 质量分数为 2% 的 β 巯基乙醇; 常规 CTAB 裂解液: $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris (pH= 8.0), $0.025 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA, $1.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl, 质量分数为 3% CTAB) 迅速研磨至匀浆状, 再加入 1 mL 裂解液混匀. 分装两个 2 mL 离心管后, 按以下 4 种方法进行 DNA 提取.

1.2.1 SDS 高盐介质提取法 具体方法参见文[3].

收稿日期: 2008-01-15

通信作者: 胡 薇 (1966-), 女, 现为福建师范大学生命科学学院 (福建 福州 350007) 副教授, 主要从事植物分子生物学的研究. E-mail: huwei@fjnu.edu.cn.

基金项目: 福建省自然科学基金资助项目 (B0410007)

1.2.2 常规的 $3 \times \text{CTAB}$ 法^[4] (1) 将上述盛匀浆的离心管置于 $65\text{ }^\circ\text{C}$ 热水中水浴裂解 60 min . (2) 于离心机($10\ 000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$)离心 10 min , 取上清液, 加入等体积的酚-氯仿 ($V(\text{酚}): V(\text{氯仿}) = 1: 1$), 缓慢混合至上清液呈乳状. (3) 于离心机($10\ 000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$)离心 10 min , 小心将上清液移至新的离心管中, 加入等体积的氯仿-异戊醇 ($V(\text{氯仿}): V(\text{异戊醇}) = 24: 1$), 缓慢混合. (4) 于离心机($10\ 000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$)离心 10 min , 取上清液, 置干净离心管中, 加 2 倍体积预冷的无水乙醇, 轻轻转动离心管, 可见絮状沉淀. (5) 弃上清液, 并将 2 管絮状 DNA 合并, 用体积分数为 70% 乙醇洗涤沉淀 2 次, 无水乙醇洗涤沉淀 1 次, 自然风干后将其溶于适量的 TE(Tris-EDTA) 溶液中.

1.2.3 常规的 $2 \times \text{CTAB}$ 法 操作同常规的 $3 \times \text{CTAB}$ 法, 裂解液改用 $2 \times \text{CTAB}$ 裂解液($0.1\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris($\text{pH} = 8.0$), $0.025\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA, $1.5\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl, 质量分数 2% 的 CTAB).

1.2.4 $1.5 \times \text{CTAB}$ 法 裂解液用 $1.5 \times \text{CTAB}$ 裂解液($0.1\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris($\text{pH} = 8.0$), $0.025\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA, $1.5\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl, 质量分数 1.5% 的 CTAB, 质量分数 2% 的 β -巯基乙醇, 质量分数 3% 的 PVP40 (聚乙烯吡咯烷酮)). (1) 将上述盛匀浆的离心管置于 $65\text{ }^\circ\text{C}$ 热水中水浴裂解 60 min . (2) 于离心机($7\ 000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$)中离心 10 min , 取上清液, 加入等体积的酚-氯仿 ($V(\text{酚}): V(\text{氯仿}) = 1: 1$), 缓慢混合至上清液呈乳状并静置于冷冻离心机中 10 min . (3) 于离心机($12\ 000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$)中离心 10 min , 小心将上清液移至新的离心管中, 加等体积的氯仿-异戊醇 ($V(\text{氯仿}): V(\text{异戊醇}) = 24: 1$), 缓慢混合并静置于冷冻离心机中 10 min . (4) 于离心机($12\ 000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$)中离心 10 min , 取上清液, 置干净离心管中, 加 2 倍体积预冷的无水乙醇, 轻轻转动离心管, 可见絮状沉淀. (5) 弃上清液, 并将 2 管絮状 DNA 合为 1 管, 用体积分数为 70% 的乙醇洗涤沉淀 2 次, 无水乙醇洗涤沉淀 1 次, 自然风干后将其溶于适量的 $0.1 \times \text{TE}$ 溶液中.

1.2.5 改进的 CTAB 法^[5] 称取 0.2 g 黑木相思嫩叶, 置研钵中, 加入少量石英砂, 放入 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱冷冻 25 min . 取出后加入 1 mL 预处理液($0.1\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA, 质量分数 2% 的 β -巯基乙醇, 质量分数 3% 的 PVP40, 预处理液需置冰箱预冷, β -巯基乙醇在研磨时加入)迅速研磨, 再加 1 mL 预处理液, 分装于 2 个 2 mL 的离心管中. 于离心机($5\ 000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$)中离心 5 min , 弃上清液, 沉淀加 1 mL 预处理液, 混匀, 再离心 5 min , 弃上清液, 得沉淀. 裂解方法同 $1.5 \times \text{CTAB}$ 法.

1.3 DNA 检测

用 752 型紫外光栅分光光度计, 测定提取的 DNA 样品在波长 $260, 280\text{ nm}$ 处的光密度值(D). 根据 $A(260)$ 估算样品得率, 根据 $D(260)/D(280)$ 比值判断样品的大致纯度. 上样于质量分数 0.6% 的琼脂糖凝胶, 于 $3\text{ V} \cdot \text{cm}^{-1}$ 电场中电泳(DYY-12 型电脑三用电泳仪), 溴乙锭染色, 检测得到 DNA 的大致相对分子量.

1.4 酶切反应

Hind II 单酶切反应体积为 $20\text{ }\mu\text{L}$, 含 $0.5\text{ }\mu\text{g}$ 样品 DNA, 酶活为 83.35 nKat , 缓冲液(buffer)为 $2\text{ }\mu\text{L}$. 酶切条件: $37\text{ }^\circ\text{C}$, 4 h . 酶解产物上样于质量分数 0.8% 的琼脂糖凝胶上, 电泳, 溴乙锭染色, 在凝胶成像系统上观察并拍照.

1.5 RAPD 和 ISSR 反应

以上述 $1.5 \times \text{CTAB}$ 法提得的样品 DNA 为模板, 用筛选的 RAPD 随机引物 S1206(10 bp) 和 ISSR 引物 UBG-836(18 bp), 在 Biometra T1 型 Thermocycler PCR 仪(德国)上进行扩增. RAPD 扩增体系: 总体积 $10\text{ }\mu\text{L}$, 内含 50 ng 模板 DNA, $2.0\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MgCl₂, $0.2\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 引物, $200\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ dNTP, 8.335 nKat 的 TaqDNA 聚合酶, $10 \times \text{buffer}$. RAPD 扩增程序: $94\text{ }^\circ\text{C}$ 预变性 180 s , $94\text{ }^\circ\text{C}$ 变性 60 s , $37\text{ }^\circ\text{C}$ 复性 90 s , $72\text{ }^\circ\text{C}$ 延伸 120 s , 循环 42 次; $72\text{ }^\circ\text{C}$ 延伸 300 s 后于 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 保存. ISSR 扩增体系: 总体积 $10\text{ }\mu\text{L}$, 内含 20 ng 模板 DNA, $2.5\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MgCl₂, $0.25\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 引物, $200\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ dNTP, 8.335 nKat 的 TaqDNA 聚合酶, $10 \times \text{buffer}$. ISSR 扩增程序: $94\text{ }^\circ\text{C}$ 预变性 300 s , $94\text{ }^\circ\text{C}$ 变性 35 s , $56\text{ }^\circ\text{C}$ 复性 90 s , $72\text{ }^\circ\text{C}$ 延伸 90 s , 循环 35 次; $72\text{ }^\circ\text{C}$ 延伸 10 min , 后于 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 保存. 扩增产物用质量分数 1.5% 琼脂糖凝胶于 $3\text{ V} \cdot \text{cm}^{-1}$ 电场中电泳, 溴乙锭染色后在 WD-9403C 型紫外分析仪上检测并拍照记录.

实验所用 TaqDNA 聚合酶购自 TaKaRa 公司, 随机引物及其他试剂购自上海生工生物工程技术有限公司.

2 结果与分析

2.1 DNA 提取结果

采用 5 种方法提取的 DNA 质量和得率(η), 如表 1 和图 1 所示. 表 1 中, 方法 1~ 4 提取的 DNA 样品 $D(260)/D(280)$ 比值介于 1.824~ 1.944 之间, $D(260)$ 和 $D(230)$ 比值介于 0.722~ 2.021 之间, 方法

表 1 不同方法提得的 DNA 质量及得率

Tab. 1 The quality and ratio of DNA extracted by different methods

方法	DNA 提取法	$D(230)$	$D(260)$	$D(280)$	$D(260)/D(280)$	$D(260)/D(230)$	$\eta/\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$
1	SDS 高盐介质法	0.097	0.070	0.036	1.944	0.722	262.5
2	常规 3× CTAB 法	0.014	0.013	0.007	1.857	0.929	130.0
3	常规 2× CTAB 法	0.021	0.033	0.018	1.833	1.571	247.5
4	1.5× CTAB 法	0.046	0.093	0.051	1.824	2.021	697.5
5	改进的 CTAB 法	-	-	-	-	-	-

1, 4 的得率较高, 随着 CTAB 质量分数的增加, DNA 的损耗增大. 可见, SDS 高盐介质法提取的 DNA 多糖质量分数偏高. 相比之下, 1.5× CTAB 法所提取的总 DNA 质量和纯度要优于其他方法; 改进的 CTAB 法对黑木相思叶片 DNA 的损耗极大, 尤其是对幼叶的 DNA 提取几乎全部损失, 加入无水乙醇

没有出现絮状的 DNA 沉淀, 所以无法在表 1 中列出数据. 1.5× CTAB 法提取黑木相思不同组织器官的 DNA, 如表 2 所示. 表 2 中, 采用 1.5× CTAB 法, 以叶状柄为 DNA 提取材料所提取的 DNA 较以幼叶为提取材料所提取的 DNA 多糖

表 2 植物组织器官的 DNA 质量

Tab. 2 Quality of DNA in plant tissues and organs

植物组织器官	匀浆粘稠度	$D(260)/D(230)$	平均值
幼叶	十分粘稠	0.528~ 0.871	0.736
叶状柄	不粘稠	1.233~ 2.067	1.732

质量分数少, 以黑木相思叶状柄作为其基因组 DNA 的提取的材料, 更容易提得含杂质少的 DNA.

2.2 限制性内切酶酶解结果

不同方法提取的黑木相思总 DNA Hind III 酶切图, 如图 2 所示. 图 2 表明, SDS 高盐介质法与 3 种 CTAB 法提得的 DNA 无需 RNase 处理, 可直接用于 Hind III 酶切消化, 且酶切效果良好.

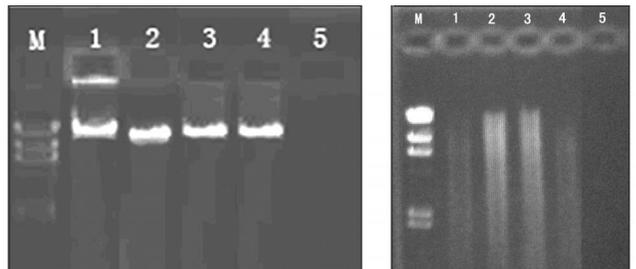


图 1 黑木相思总 DNA 电泳图

Fig. 1 The total DNA Electrophoretogram of *Acacia melanoxylon*

图 2 黑木相思总 DNA Hind III 酶切图

Fig. 2 The total DNA Cleavage map of *Acacia melanoxylon*

2.3 RAPD 和 ISSR 扩增结果

引物 S1206 对 1.5× CTAB 法提取的样品 DNA 进行 RAPD 的扩增, 结果如图 3 所示. 从图 3 中可以看出, 1.5× CTAB 法提取的鲜叶 DNA 适于 RAPD 扩增, 而且 1.5× CTAB 法所提取的不同保存方法保存的样品

DNA 亦可用于 RAPD 扩增. 引物 UBC-836 对 1.5× CTAB 法提取的 18 个黑木相思样本鲜叶 DNA 进行的简单重复间序列 (ISSR) 扩增, 结果如图 4 所示.

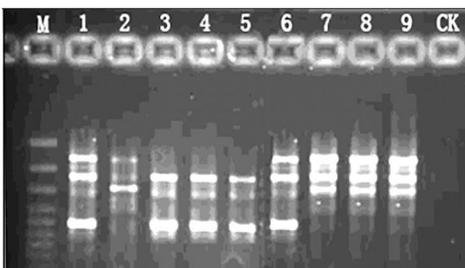


图 3 引物 S1206 的 RAPD 扩增结果
Fig. 3 RAPD result with primer S1206

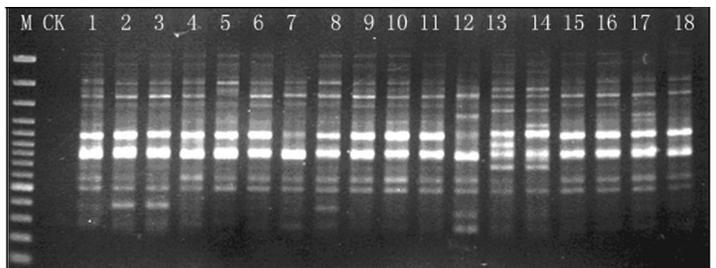


图 4 引物 UBC-836 的 ISSR 扩增结果
Fig. 4 ISSR result with primer UBC-836

3 讨论

分子生物学研究需要有效分离基因组 DNA, 而植物组织由于含有复杂次生代谢物质, 因此, 从植物组织中提取高纯度 DNA 相对比较困难, 其难度首先取决于植物自身. 黑木相思幼叶富含多糖、蛋白质、叶绿素及多酚类等物质, 这无疑给黑木相思 DNA 的提取带来一定难度; 多糖类物质易形成粘稠的胶状物, 给 DNA 的分离带来困难, 且会抑制许多酶的活性^[6]; 多酚类物质不仅极易氧化褐变, 而且还可抑制 TaqDNA 聚合酶的活性^[7], 从而影响 PCR 扩增. 所以本次实验, 在裂解液中加入质量分数为 3% 的 PVP 及质量分数为 2% 的 β -巯基乙醇, PVP 可与酚类物质结合, 从而降低酚类物质对 DNA 的影响^[8]; 而 β -巯基乙醇是还原剂, 可有效抑制多酚及其他物质的氧化.

实验发现, 黑木相思含多糖、多酚等次生代谢物质高, SDS 高盐介质法所提取 DNA 的多糖质量分数偏高, 而 $1.5 \times$ CTAB 法的去多糖效果好. 因此, $1.5 \times$ CTAB 法所提取的 DNA 质量纯度较 SDS 高盐介质法高, 所提取的 DNA 纯度能够满足 RAPD 和 ISSR 的要求; 另外, 黑木相思幼嫩的叶状柄所含次生代谢物质较幼叶低. 因此, 黑木相思基因组 DNA 的提取, 用幼嫩的叶状柄效果好.

综上所述, $1.5 \times$ CTAB 法是黑木相思总 DNA 简便快速提取的较为理想的方法. 黑木相思幼嫩叶状柄是黑木相思基因组 DNA 提取的理想材料.

参考文献:

- [1] 李纪元. 金合欢属植物资源在我国亚热带的引种潜力[J]. 福建林学院学报, 2002, 22(3): 283-288.
- [2] 詹夷生. 闽北耐寒相思树种源选择研究初报[J]. 福建林学院学报, 1999, 19(2): 153-156.
- [3] 王经源, 黄儒珠. 刺桫欏 DNA 的简便快速提取方法[J]. 福建林学院学报, 2001, 21(4): 376-379.
- [4] ZENG Jie, ZOU Yir ping, BAI Jir yu, et al. Preparation of total DNA from "recalcitrant plant taxa"[J]. Acta Bot Sin, 2002, 44(6): 694-697.
- [5] 潘晓华, 黄儒珠, 朱锦慧. 樟树总 DNA 提取技术的研究[J]. 福建林业科技, 2004, 31(1): 31-41.
- [6] FANG G, HAMMAR S, GRUNET R. A quick and inexpensive method for removing polysaccharides from plant genomic DNA[J]. Bio Techniques, 1992(13): 52-56.
- [7] PIERRE G, HAURENCE M D. Isolation of plant DNA: A fast inexpensive and reliable method [J]. Plant Mol Bio Rep, 1992(10): 61-65.
- [8] KIM C S, LEE C H, SHIN J S. Simple and rapid method for isolation of high quality genomic DNA from fruit trees and conifers using PVP[J]. Nucleic Acids Res, 1997(25): 1085-1086.

Fast Extraction of Genome DNA from *Acacia melanoxylon*

HU Wei, CHEN Yu, LIN Lai shui, LIN Si zu

(College of Forestry, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

Abstract: A fast and convenient method for extraction of DNA from normal young fresh leaves and phyllode of *Acacia melanoxylon* was introduced by comparing SDS high salt method and $1.5 \times$ CTAB method with $2 \times$ CTAB, $3 \times$ CTAB and ameliorated CTAB method, and tests were carried out with ultraviolet spectrophotometer analysis, agarose gel electrophoresis, restriction enzyme digestion, RAPD and ISSR reaction respectively. The results indicated that 180~697.5 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ of DNA was obtained from a phyllode, their molecular weights were about 48 kb, and the $D(260)/D(280)$ of DNA was 1.750~1.955, the DNA was suitable for digesting with restriction enzyme, RAPD and ISSR reaction without purifying by RNase, the amylose in phyllode is much less than that in normal young fresh leaves, and extraction of genome DNA from phyllode is easier than normal young fresh leaves, the quality of DNA obtained with $1.5 \times$ CTAB method is better than SDS high salt method, It is suggested that $1.5 \times$ CTAB method can be considered as one of fast and convenient method for extraction of DNA in young fresh leaves of *Acacia melanoxylon*.

Keywords: *Acacia melanoxylon*; genomic; DNA; extraction; CTAB method

(责任编辑: 钱 筠 英文审校: 陈国华)