

文章编号:1674-7054(2011)02-0153-04

芦笋 DNA 提取方法的比较研究

高建明¹, 代真真^{1,2}, 江程记^{1,2}, 张世清¹, 陈河龙¹, 郑金龙¹, 刘巧莲¹, 易克贤¹

(1. 中国热带农业科学院 热带生物技术研究所/农业部热带作物生物技术重点开放实验室 海南 海口 571101;

2. 海南大学 农学院 海南 海口 570228)

摘要:以芦笋植株叶片为材料,比较了改良 SDS 法、改良 CTAB 法和试剂盒法 3 种提取 DNA 的方法,并利用紫外分光光度计、琼脂糖凝胶电泳和 PCR 检测 DNA 质量,探索最佳的芦笋 DNA 提取方法。结果表明:上述 3 种方法都适合于芦笋 DNA 的提取,提取的 DNA 均能够满足 ISSR 分子标记等试验的需要。

关键词:芦笋; DNA 提取; SDS 法; CTAB 法; 试剂盒法

中图分类号: S 644.6

文献标志码: A

芦笋(*Asparagus officinalis* L.) ,又名石刁柏,系百合科天门冬属,多年生草本植物,是世界十大名菜之一,在国际市场上享有“蔬菜之王”的美称。芦笋富含多种氨基酸、蛋白质和维生素。芦笋不仅营养丰富,还具有防癌、抗癌、降低血脂、预防冠心病等特殊医疗保健功效,是一种高档绿色食品,在国际市场一直畅销不衰^[1-2],世界对芦笋的需求量也日趋激增。随着我国芦笋种植面积的不不断扩大,从国外引进的品种逐渐增多,目前,生产上出现了品种混乱、品种良莠不齐等问题,严重影响了我国芦笋产业的发展^[3]。在开展芦笋种质资源鉴定、遗传多样性分析等研究过程中,常常要用到各种分子标记,如 ISSR, AFLP, RAPD 等,而这些技术对 DNA 的质量要求都比较高,特别是基于 PCR 基础上的 AFLP 对 DNA 的要求更高。另外,高质量的 DNA 可以使酶切充分、Southern 杂交特异性高,实验结果稳定可靠^[4-5]。关于芦笋 DNA 提取的方法鲜有报道^[6-7],但无人进行过芦笋 DNA 不同提取方法的比较研究。为此,笔者以芦笋叶片为材料,对改良 SDS 法、改良 CTAB 法和试剂盒法 3 种 DNA 提取方法进行比较研究,旨在建立和完善一套高质量芦笋 DNA 提取方案,为芦笋分子生物学研究提供技术参考。

1 材料与方法

1.1 材料 试验材料取自中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所种质圃的芦笋植株(编号为 UC800) ,选取新鲜嫩叶,用蒸馏水清洗干净,晾干,分装于 0.5 g 的冷冻管中,置于 -80 ℃ 冰箱中保存备用。

1.2 方法

1.2.1 改良 CTAB 法 目前,提取植物 DNA 的方法很多,大部分提取出来的 DNA 并不能达到预期的效果^[8]。笔者在他人的方法^[9-11]上做些改进。在 50 mL 离心管中加入 10 mL 的 2 × CTAB 抽提液(100 mmol · L⁻¹ 的 Tris-HCl, pH 8.0; 1.4 mmol · L⁻¹ 的 NaCl; 20 mmol · L⁻¹ 的 EDTA; $w = 2\%$ 的 CTAB; $\varphi = 4\%$ 的 β -巯基乙醇),放入 65 ℃ 的水浴锅中。取 2 g 芦笋样品,加入液氮研磨 3 ~ 4 次,研磨成粉末状。将研磨的粉末迅速装入上述预热至 65 ℃ 的 50 mL 离心管中,于 65 ℃ 条件下水浴 30 min,其间摇晃 3 ~ 4 次。取出离心管至室温,加入 2/3 体积的氯仿与异戊醇的混合液($V_{\text{氯仿}}:V_{\text{异戊醇}} = 24:1$) ,摇匀,室温条件下放置 20 min,然后 8 000 r · min⁻¹ 离心 10 min。取出离心管,静置片刻,去上清液至新的 50 mL 离心管,再加入等体积的

收稿日期: 2011-04-08

基金项目: 公益性行业(农业) 科研专项经费项目(201003074)

作者简介: 高建明(1967-) ,男,湖北枣阳人,中国热带农业科学院热带生物技术研究所副研究员,博士。

通信作者: 易克贤(1964-) ,男,广西桂林人,博士生导师,研究员, E-mail: yikexian@21cn.com

1 × CTAB和 2/3 体积的氯仿与异戊醇的混合液($V_{\text{氯仿}}:V_{\text{异戊醇}}=24:1$) ,充分混匀 4 000 r · min⁻¹ 室温离心 20 min 将上清移至新的 50 mL 离心管 ,加入 2/3 体积的冷冻异丙醇(-20 ℃) ,上下轻晃 ,室温离心 20 min 弃上清 ,用 $\varphi=75\%$ 的酒精清洗 3 次后 ,沉淀为白色透明状。加入已灭菌的 1 mL 的 1 mol · L⁻¹ NaCl 溶液和 5 μ L 的 RNaseA ,56 ℃ 条件下水浴 1 ~2 h。取出离心管 ,冷却 ,加 2 mL 冷无水乙醇 ,沉淀 DNA 4 ℃ 4 000 r · min⁻¹ 离心 15 min。用枪头勾出 DNA 放入 1.5 mL 离心管中 ,用 $\varphi=75\%$ 的酒精清洗 30 min ,再用无水乙醇清洗 10 min ,在超净工作台上干燥 DNA ,加 500 μ L 的 TE 缓冲液溶解 4 ℃ 贮存备用。

1.2.2 改良 SDS 法 本实验采用的改良 SDS 法是在前人^[12-14] 的基础上做了较大改进。在 50 mL 离心管中 ,加入 10 mL 提取缓冲液(100 mmol · L⁻¹ 的 Tris-HCl , pH8. 0; 50 mmol · L⁻¹ 的 EDTA , pH8. 0; 500 mmol · L⁻¹ 的 NaCl; $\varphi=2\%$ 的 β - 巯基乙醇) 与 1 mL 0.2 g · L⁻¹ 的 SDS 混匀 ,65 ℃ 预热。取 2 g 芦笋样品置研钵中 ,加入液氮迅速研磨成粉状。将冻粉迅速转入离心管 ,混匀 ,65 ℃ 保温 30 min ,其间摇动 3 次。4 ℃ 10 000 r · min⁻¹ 离心 5 min ,将上部溶液倒入另一离心管 ,加入 5 mol · L⁻¹ 的乙酸钾 5 mL ,混匀 ,冰浴 20 min。4 ℃ 10 000 r · min⁻¹ 离心 5 min ,上清液转入另一离心管 ,加入 2/3 体积的氯仿与异戊醇的混合液($V_{\text{氯仿}}:V_{\text{异戊醇}}=24:1$) ,混匀 ,静置 10 min ,分层。取上清液 ,重复加入 2/3 体积的氯仿与异戊醇的混合液($V_{\text{氯仿}}:V_{\text{异戊醇}}=24:1$) ,混匀 ,静置 10 min ,分层。取上清液 ,加入 2/3 上清液体积的预冷异丙醇 ,轻轻颠倒离心管 ,混匀 ,静置 5 min 至出现絮状物。然后 ,迅速用干净枪头轻挑出沉淀 ,用 $\varphi=75\%$ 的酒精洗沉淀物 3 次 ,于超净工作台上风干 ,溶于 500 μ L 的 TE 缓冲液中 4 ℃ 贮存备用。

1.2.3 试剂盒法 柱式植物 DNAout 购自北京天恩泽基因科技有限公司 ,操作步骤见试剂盒说明书。为便于与上述 2 种方法比较 ,先将 DNA 溶于 500 μ L 的 TE 缓冲液中。

1.2.4 DNA 质量检测 (1) 紫外分光光度计法检测 DNA 纯度与质量浓度: 取 9 μ L 的 DNA 原液 ,用无菌水稀释 10 倍 ,用紫外分光光度计测其在 260 nm 和 280 nm 波长处的吸光度(OD_{260} , OD_{280}) 。计算 OD_{280}/OD_{260} 值及 DNA 质量浓度。(2) 琼脂糖凝胶电泳检测: 制备 $w=1\%$ 的琼脂糖凝胶 ,上样量为 1 μ g。(3) PCR 扩增检测: 从哥伦比亚大学 UBC 公司 2006 年公布的 ISSR 引物中 ,筛选出 UBC 815 和 UBC 823 ,分别对 3 种方法提取的 DNA 进行扩增。在 50 μ L 总反应体系中 ,含 ISSR 上下引物各 1 μ L ,模板 DNA 2 μ L , 2 × Taq PCR Master Mix 25 μ L ,灭菌双蒸水 21 μ L。PCR 扩增反应条件为: 94 ℃ 预变性 3 min ,94 ℃ 变性 30 s ,47 ℃ 复性 30 s ,72 ℃ 延伸 1.5 min ,共 35 个循环 ,最后 72 ℃ 补平 10 min ,取扩增产物在 $w=0.8\%$ 的琼脂糖凝胶上进行电泳。

2 结果与分析

2.1 3 种方法提取芦笋 DNA 的纯度和质量浓度检测结果 3 种方法提取的芦笋 DNA 质量浓度及 OD_{280}/OD_{260} 值见表 1。一般来说 ,纯 DNA 样品紫外消光值 $OD_{280}/OD_{260} \approx 1.8$,当 OD_{280}/OD_{260} 值大于 1.9 时 ,表明有 RNA 污染; 当 OD_{280}/OD_{260} 值小于 1.6 时 ,表明样品有蛋白质、酚类等污染。从表 1 可知 ,这 3 种方法提取的 DNA 的 OD_{280}/OD_{260} 值均在 1.6 ~1.9 之间 ,质量都较好。

表 1 3 种方法提取芦笋 DNA 的纯度和质量浓度

提取方法	芦笋样品编号	OD_{280}/OD_{260} 值	DNA 质量浓度/(g · L ⁻¹)
改良 CTAB 法	1	1.89	0.32
	2	1.89	0.32
	3	1.82	0.24
	4	1.90	0.34
改良 SDS 法	1	1.72	0.32
	2	1.78	0.45
	3	1.60	0.22
	4	1.76	0.46
试剂盒法	1	1.87	0.50
	2	1.97	0.75
	3	1.85	0.75
	4	1.66	1.15

2.2 3 种方法提取芦笋 DNA 的电泳检测结果 3 种方法提取芦笋 DNA 的电泳检测结果见图 1~3。从图 1~3 可知,改良 CTAB 法和改良 SDS 法得到的 DNA 的电泳条带整齐、清晰;而试剂盒法提取的 DNA 的电泳条带有些拖尾,显示 DNA 有少许降解。

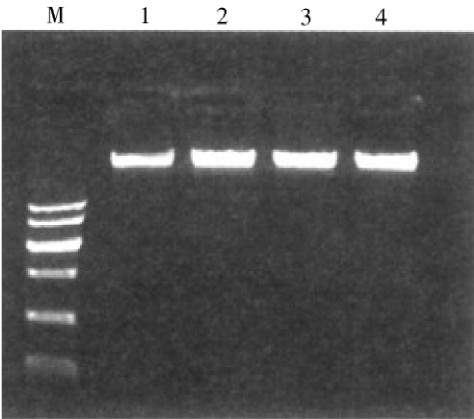


图 1 改良 CTAB 法提取的 DNA 电泳图谱
M 示 marker, 1 2 3 4 表示不同试管中 DNA

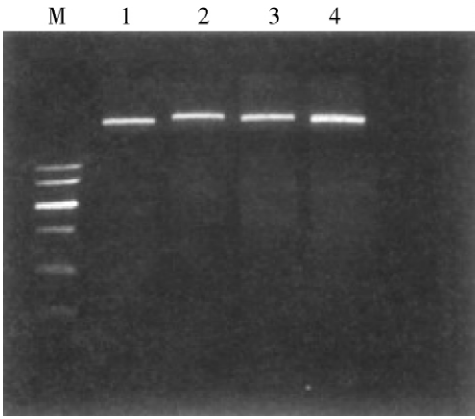


图 2 改良 SDS 法提取的 DNA 电泳图谱
M 示 marker, 1 2 3 4 表示不同试管中 DNA

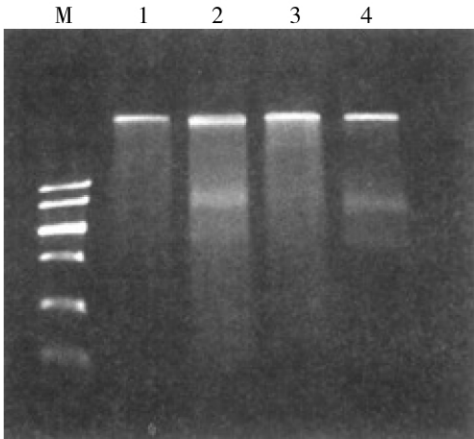


图 3 试剂盒法提取的 DNA 电泳图谱
M 示 marker, 1 2 3 4 表示不同试管中 DNA

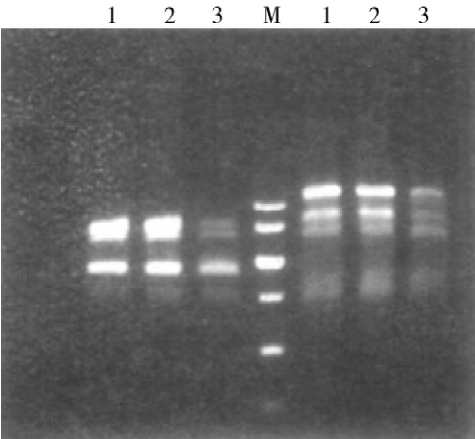


图 4 用引物 UBCS15(左)和 UBC823(右)作 PCR 扩增图
1 2 3 泳带分别为改良 CTAB 法、改良 SDS 法和试剂盒法提取 DNA 的 PCR 扩增电泳图谱

2.3 3 种方法提取芦笋 DNA 的 PCR 检测结果 PCR 检测电泳图谱见图 4。由图 4 可知,试剂盒法提取的 DNA 扩增条带相对模糊,改良 CTAB 法和改良 SDS 法都可扩增出清晰的 ISSR 谱带,这 3 种方法提取的芦笋 DNA 都能满足 ISSR 等分子标记分析的要求。

3 讨 论

SDS 法和 CTAB 法提取一般植物的 DNA 时,都会加入 PVP 以降低多糖及酚类等杂质对 DNA 提取质量的影响。但在本研究的方案中改良 SDS 法和改良 CTAB 法提取芦笋 DNA 时,没有加入 PVP,实验过程中多糖及酚类等杂质对 DNA 的提取基本上无影响,说明在提取芦笋新鲜植株 DNA 时无需加入 PVP。

3 种方法提取的芦笋 DNA 都能扩出清晰的条带,只是试剂盒法扩增的条带相对较暗,需要在今后的试验中摸索最佳试验条件予以校正。试剂盒提取时间最快,而改良 CTAB 法需过夜水浴。从时间上考虑,可以采用试剂盒方法,从经济上考虑,改良 SDS 法较为可取。

参考文献:

- [1] 于继庆, 张元国, 陈桂英, 等. 芦笋组织培养研究进展与技术关键(上) [J]. 长江蔬菜, 1996(1): 2-4.
- [2] STIRPE, GASPERI-CAMPANI A, BARBIERI et al. Ribosome-in-activating proteins from the seeds of *Saponaria officinalis* L. (soapwort) and of *Agrastemma githago* L. (com cockle) and of *Asparagus officinalis* L. (asparagus) and from the latex of *Hura crepitaria* L. (sandbox tree) [J]. Biochem J., 1983, 216(3): 617.
- [3] 李喜宏, 陈丽, 关文强, 等. 果蔬薄膜保鲜技术 [M]. 天津: 天津科学技术出版社, 2003.
- [4] 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.
- [5] CSAIK U M, BASTIAN H, BRETTSCHEIDER R. Comparative analysis of different DNA extraction protocols: A fast, universal maxi-preparation of high quality plant DNA for genetic valuation and phylogenetic studies [J]. Plant, 1998(16): 69-86.
- [6] 盛文涛, 周劲松, 汤泳萍, 等. 芦笋基因组 DNA 提取与 ISSR 反应体系的优化 [J]. 江西农业学报, 2010, 22(9): 38-41.
- [7] 侯进慧, 蔡侃, 郑宝刚, 等. 芦笋 18S rDNA 序列和分类分析 [J]. 食品科学, 2011, 32(5): 221-223.
- [8] 黄莹, 高丽美, 张永彦, 等. 一种优化的植物总 DNA 提取方法 [J]. 西北植物学报, 2004, 24(6): 1103-1106.
- [9] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程 [M]. 北京: 科学出版社, 2002.
- [10] DOLY J J, DOLY J L. Isolation of plant DNA from fresh tissue [J]. Focus, 1990, 2(1): 13-15.
- [11] 陈观水, 周以飞, 潘大仁. 大豆抗孢囊线虫 3 号生理小种相关基因 PCR 检测方法的建立与应用 [J]. 福建农林大学学报: 自然科学版, 2004, 33(3): 359-362.
- [12] 胡志昂. 蛋白质多样性和品种鉴定 [J]. 植物学报, 1991, 33(7): 556-564.
- [13] CONSTBAL J J, PAEKER C, COLLIS D A et al. Nuclear DNA from Primate dung [J]. Nature, 1995, 373: 393.
- [14] SVAILL M G, MURRAY S R, SCHOLES P et al. Application of polymerase chain Reaction(PCR) and *Taq* ManTM PCR techniques to the detection and identification of phodococcus coprophilus in faecal samples [J]. Journal of Microbiological methods, 2001, 47: 355-368.

Comparison of DNA Extraction Methods of *Asparagus*

GAO Jian-ming¹, DAI Zhen-zhen^{1, 2}, JIANG Cheng-ji^{1, 2}, ZHANG Shi-qing¹, CHENG He-long¹,
ZHENG Jin-long¹, LIU Qiao-lan¹, YI Ke-xian¹

(1. Key Laboratory of Tropical Crop Biotechnology, Ministry of Agriculture, Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology,
Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou 571101;
2. College of Agriculture, Hainan University, Haikou 570228, China)

Abstract: In order to find the best DNA extraction method of asparagus, improved SDS, CTAB and kit method were used to extract DNA from *Asparagus* young leaves and the DNA quality also was tested by UV spectrophotometer, agarose gel electrophoresis and PCR detection. The results showed that the quality of the DNA from the three DNA extraction methods fill the requirements for ISSR molecular markers and other assays.

Key words: *Asparagus*; DNA extraction; SDS method; CTAB method; kit method