

太行花DNA提取的优化和适用分子标记检测

方向民,王红卫,程月琴,叶永忠,杨程
(河南农业大学,郑州450002)

摘要:比较了常规CTAB法、改良CTAB法和SDS法对太行花叶片总DNA的提取效果,并对改良CTAB法提取的DNA在多种分子标记中的适用性进行了测试。结果表明:常规CTAB法提取的DNA难以完全溶解,且有褐化现象;SDS法提取的DNA产率及纯度都很低;改良CTAB法提取的DNA产率高且稳定,无明显降解,杂质少,OD260/OD280值在1.8左右。以改良CTAB法提取的DNA为模板,应用叶绿体和线粒体通用引物扩增出了特异性的高效产物,ISSR和RAPD引物对总DNA的扩增也获得理想结果。因此,改良CTAB法适用于太行花总DNA提取,其产物能满足核、叶绿体和线粒体基因组分子实验的要求。

关键词:太行花;DNA提取;CTAB法;SDS法;分子标记

中图分类号:S58;S682.1+9 文献标识码:A 论文编号:2009-0795

Optimization of Total DNA Extraction and Test of Suitable Molecular Markers in *Taihanggia rupestris*

Fang Xiangmin, Wang Hongwei, Cheng Yueqin, Ye Yongzhong, Yang Cheng
(Henan Agricultural University, Zhengzhou, Henan 450002)

Abstract: The total DNA was isolated from the leaf of *Taihanggia rupestris* YU et LI by the conventional CTAB method, improved CTAB method and SDS method. The extracts by improved CTAB method were tested as the template for several molecular marker types. The results showed the extracts by conventional CTAB method were brown and could not dissolve completely, and those by SDS method had a low quality and yield. As for the improved CTAB method, there was a high production rate of the extracts, that was pure with little degradation, and A260/A280 was 1.8 or so. With these leaf DNA serving as template, PCR at two loci of mitochondrial and chloroplast genomes was effective and special highly. Besides, these totals DNA were good templates for SSR and RAPD molecular markers. So improved CTAB method is a good protocol by which the total DNA was isolated from the leaf of *T. rupestris*, its product meet the requirement of PCR amplification for the nuclear, chloroplast and mitochondrial genomes.

Key words: *Taihanggia rupestris*, DNA extraction, CTAB method, SDS method, molecular marker

0 引言

太行花(*Taihanggia rupestris* YU et LI)是蔷薇科单种属植物,中国特有。它是蔷薇科草本仙女木族最原始的二倍体植物,属古老的残遗种,在仙女木族进化上占有特殊的位置,对于阐明蔷薇科一些类群的起源和演化问题具有重要意义^[1]。仅生长于海拔1 000 m左

右的悬崖绝壁。3—4月份开花,植株较矮呈莲座状,花冠直径3~4.5 cm左右,每株开花3到数十朵,素白色的花冠映衬嫩黄色花药,点缀以碧绿的叶片,娇艳可爱,被誉为岩壁奇花,是一重要野生草本花卉资源。由于其分布区狭窄,生境独特,分布范围日益缩减,濒临灭绝,被列为中国二级保护植物^[2]。

基金项目:河南农业大学博士科研启动基金“重要植物的谱系地理学研究”(30400246)。

第一作者简介:方向民,男,1986年出生,河南南阳人,在读硕士。

通讯作者:王红卫,男,1969年出生,河南驻马店人,博士,副教授,硕士生导师,从事植物学和植物保护的教学和科研。通信地址:450002 河南省郑州市文化路95号 河南农业大学植物保护学院, E-mail: whwcas@yahoo.cn。

收稿日期:2009-04-16, **修回日期:**2009-05-08。

以分子生物学为手段的保护遗传学研究在濒危植物保护中发挥着重要作用。从长远上看,濒危物种保护对策的制定必须同遗传因子和环境因子结合起来考虑。只有在弄清物种的遗传结构和遗传多样性现状的前提下,才能够制定出切实可行的保护策略,否则,任何物种保护措施的实施,都不会取得实质性的成效^[3]。此外,分子育种是当前品种改良的重要手段。

基因组DNA的提取是分子生物学研究的基础,能否得到高质量的DNA是分子群体遗传学研究和分子育种成败的关键。植物DNA提取的方法及优化很多^[4-6],但太行花DNA提取方法却未见有相关报道。笔者通过比较常规CTAB法、改良CTAB法、SDS法对太行花基因组DNA的提取效果,筛选太行花DNA提取的适宜方法,为进一步开展太行花分子生物学方面的研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验时间、地点

实验于2009年1—4月在河南农业大学植物保护学院中心实验室完成。

1.2 植物材料

供试材料太行花(*Taihangia rupestris* YU et LI)幼叶采集于河南辉县,硅胶干燥保存。

1.3 仪器与试剂

仪器:恒温水浴锅;低温冷冻离心机(SIGMA 3K30);紫外分光光度计(Nanodrop ND-1000);电泳仪(北京六一 DYY-8B型);UVP凝胶成像系统

试剂:2×Master Mix(TIANGEN KT201);线粒体引物(上海生工);叶绿体引物(上海生工);ISSR及RAPD引物(上海生工);十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)、十二烷基磺酸钠(SDS)、乙二胺四乙酸(EDTA)、聚乙烯吡咯烷酮k30(PVP k30)、氯仿、异戊醇等均为国产分析纯;三羟甲基氨基甲烷(Tris)(生化试剂);β-巯基乙醇(化学纯)。

1.4 方法

1.4.1 基因组DNA提取方法

(1)常规CTAB法参照邹喻莘等^[7]。

(2)改良CTAB法:①称取0.12 g经硅胶干燥的太行花幼叶于-20℃预冷的研钵中,适量PVP干粉,液氮研磨成粉后转移到2 ml离心管。②加入700 μl CTAB提取缓冲液((2% CTAB, 1.4 mol/L NaCl, 0.5 mol/L EDTA, 100 mmol/L Tris-HCl), 12 μl β-巯基乙醇,混匀。冰浴20 min。③加入700 μl CTAB提取缓冲液,65℃水浴50 min,期间不时摇动。④加入110 μl 5 mol/l的KAc,冰浴30 min。4℃,10 000 r/min离心10 min,取

上清。⑤加入等体积的氯仿-异戊醇,轻轻颠管10 min。4℃、10 000 r/min离心10 min。取上清,重复步骤5。⑥取上清,加入等体积预冷的异丙醇,室温放置30 min,4℃、8 000 r/min离心10 min,弃上清,75%乙醇清洗沉淀2~3次。⑦室温干燥,0.1×TE 100 μl溶解备用。

(3)SDS法:除硅胶干燥太行花幼叶称取量为0.12 g, DNA为100 μl 0.1×TE溶解外,其他试剂配方及试验步骤参见文献[6]的改良SDS法。

1.5 DNA质量检测

取6 μl DNA原液加1 μl上样缓冲液混匀,0.8%琼脂糖凝胶(含0.5 μg/ml EB)电泳,用1×TAE电泳缓冲液,5 V/cm电泳30 min,紫外灯下观察并照相;另取5 μl DNA原液,稀释10倍,Nanodrop ND-1000紫外分光光度计测定OD260和OD280,检测DNA纯度和浓度。

1.6 DNA适用性检测

选用叶绿体引物Trnnc-Trnld^[8]及线粒体引物NAD4exon1-NAD4exon2^[9]进行PCR扩增,反应体系(20 μl):模板1 μl,引物1 1 μl引物2 1 μl,2×Master Mix(TIANGEN KT201)10 μl, ddH₂O 7 μl;反应为35个循环,每个循环包括94℃变性40 s,55℃退火40 s,72℃延伸1 min。

选用ISSR引物UBC842进行总DNA PCR扩增,反应体系(20 μl):模板1 μl,引物1 μl,2×Master Mix(TIANGEN KT201)10 μl, ddH₂O 8 μl;反应为35个循环,每个循环包括94℃变性40 s,56℃退火45 s,72℃延伸1 min 30 s。

选用非选择性RAPD随机引物S344进行总DNAPCR扩增,退火温度为37℃,其他参数参照上面ISSR引物反应。

取叶绿体、线粒体扩增产物6 μl, RAPD及ISSR扩增产物10 μl在1.2%琼脂糖凝胶上电泳检测,根据电泳图谱的清晰度、多态性进一步评价DNA质量。

2 结果与分析

试验表明,常规CTAB法提取的DNA难以完全溶解,轻微褐化;SDS法提取的DNA溶解后较为粘稠,用枪头不易吸取,可能有多糖及酚类污染;改良CTAB法提取出的DNA溶液清亮,易溶解,无粘稠感。

从琼脂糖凝胶电泳(图1)可以看出,3种方法提取的DNA均无明显拖尾现象,说明所得DNA完整性均较好,无降解;点样孔内都无杂质残留且DNA条带清晰;在DNA产率方面,改良CTAB法最高,常规CTAB法次之,SDS法所得DNA最少,DNA条带较弱。

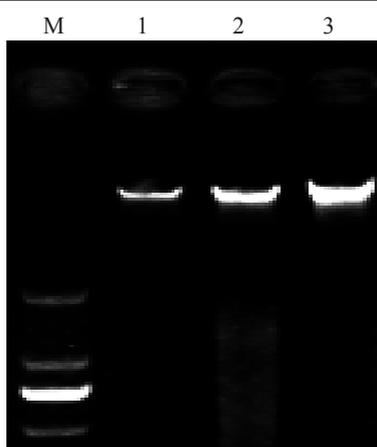


图1 3种提取方法提取的总DNA

M. Marker 1.SDS法 2.常规CTAB法 3.改良CTAB法

根据紫外分光光度计测得的OD₂₆₀/OD₂₈₀比值(表1): 常规CTAB法OD₂₆₀/OD₂₈₀比值偏小, 为1.67, 改良CTAB法为1.82, SDS法为1.43, 只有改良CTAB法测的比值最接近1.80, 表明DNA最纯, 污染小。从计算的DNA浓度比较, 与琼脂糖凝胶电泳的结果相一致, 改良CTAB法DNA浓度最高, 为373.7 ng/ul。经计算, 3种提取方法DNA的产率比较为: 改良CTAB>常

规CTAB>SDS法。

通过琼脂糖及紫外分光光度计检测, 发现改良CTAB法提取效果明显较其他两种方法好, 因此, 笔者进一步对此法提取DNA的适用性进行检测。随机选取5个改良CTAB法提取DNA的样本, 进行叶绿体和线粒体特异引物的PCR扩增和检测(图2, 图3), 结果表明样本的扩增效率高(条带亮度高)、特异性强(条带单一)。

表1 3种方法提取DNA的质量和产率

样品编号	提取方法	OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀	DNA浓度/(ng/ul)	DNA产率/(μg/g)
1	常规CTAB	1.67	254.3	211.9
2	改良CTAB	1.82	373.7	311.4
3	SDS	1.43	106.4	88.67

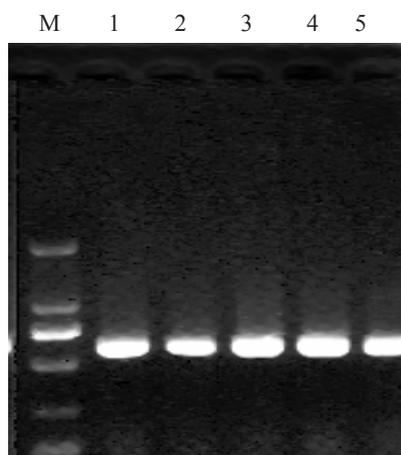


图2 叶绿体引物(Trnnc-Trnld)扩增结果

注: M: Marker; 1~5: 改良CTAB法提取的5个DNA样本(以下同)。

在总DNA中, ISSR引物共扩增出5条条带, 最长的条带约1200 bp, 最短的约300 bp(图4, 图5); RAPD引物扩增出了8条条带, 长度范围介于300~2000 bp之间。ISSR和RAPD扩增出的条带均清晰且重复性较好。ISSR和RAPD的扩增结果同时表明, 改良

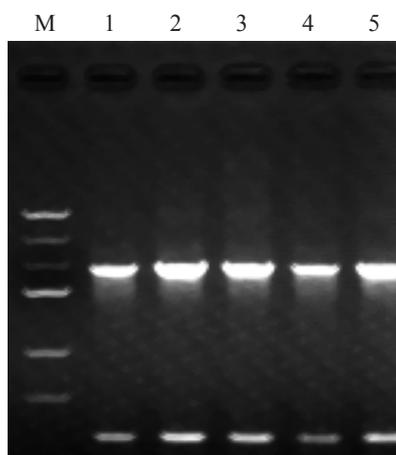


图3 线粒体引物(NAD4exon1-NAD4exon2)扩增结果

CTAB法提取的DNA适宜进行总DNA(主要是核基因组)ISSR及RAPD分子标记研究。

3 讨论与结论

DNA提取方法主要有十二烷基磺酸钠(SDS)法和十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)法等, 针对植物组织而

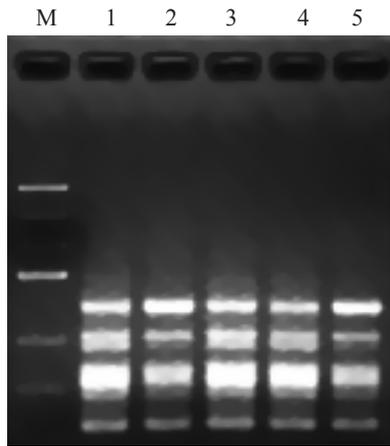


图4 ISSR引物UBC889扩增结果

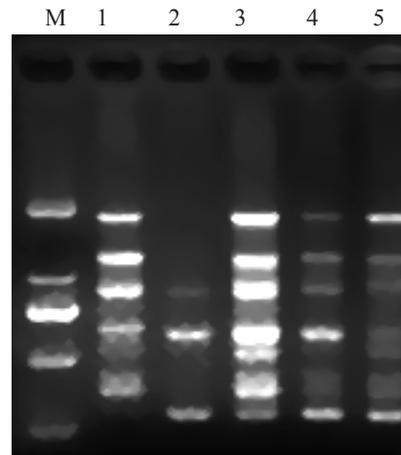


图5 RAPD引物S344扩增结果

言,CTAB法更为常用^[7]。在常规CTAB法的基础上,针对不同材料特点及实验方法进行改进的报道很多^[4-6]。借鉴前人的结果,太行花的改良CTAB法提取DNA主要有以下方面的改进:水浴裂解细胞前,加CTAB提取液冰浴30 min,使得部分细胞破裂,且细胞内多糖、蛋白、酚类等次生物质经冰浴后沉到离心管的底部,有利于提纯;加入5 mol/L KAc冰浴30 min的步骤,有效的去除了蛋白质^[9]和多糖^[10];提取过程适当加大 β -巯基乙醇、PVP等抗氧化剂用量,有效地防止组织褐化现象发生^[11],PVP同时能有效去除多糖^[12],且 β -巯基乙醇和PVP配合使用,能够有效地防止多酚污染^[13];在加入预冷异丙醇沉淀DNA过程中,由-20℃下30 min改为室温30 min,提高了沉淀温度,减少了部分杂质的沉淀;另外,在沉淀结束后离心过程中,离心力由12 000 r/min改为8 000 r/min,降低离心速度,也能防止酚类、多糖、单宁等次生代谢物质与DNA一起被沉淀。上述步骤在减少杂质沉淀的同时,虽然也降低了DNA的产量,但与另外两种方法相比,其可利用得率更高。因为常规CTAB法所提DNA不能完全溶解,一部分DNA会包裹在沉淀中,SDS法提取的DNA与多糖、单宁等结合成粘稠的胶状物,这些因素都降低了DNA利用率,相对提高了改良CTAB法DNA的得率。

PCR扩增检测显示,用ISSR及RAPD非特异性引物对样本扩增时,效率稳定且重复性好。用特异性引物(叶绿体及线粒体引物)进行扩增时,都扩增出了目的条带,且扩增产物亮度相差不大,说明所提DNA的纯度高且稳定性好。

通过综合比较,改良CTAB法提取DNA效果最佳,其产率高且稳定,杂质去除较干净,无褐化现象,能够获取高质量太行花DNA。可以为核、叶绿体和线粒

体基因组的后续研究提供模板,也适用于特异性(TrnLc-TrnLd、NAD4exon1-NAD4exon2)和非特异性(ISSR、RAPD)分子标记。

参考文献

- [1] 余德浚,李朝奎.蔷薇科太行花属系统位置的研究[J].植物分类学报,1983,21(3): 229-235.
- [2] 傅立国,金鉴明,冯国楣,等.中国植物红皮书:第一册[M].北京:科学出版社,1992.
- [3] 时明芝,肖宜安,李晓红.保护遗传学及其在濒危植物研究中的应用[J].世界林业研究,2003,16(4):13-16.
- [4] 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.
- [5] 汤文开,谭新,张辉,等.一种快速简单高效提取植物DNA的方法[J].华中师范大学学报,2007,41(3):447-449.
- [6] 蒋细旺,包满珠,李智崎,等.菊花DNA提纯方法的优化[J].江汉大学学报,2002,19(3):42-44.
- [7] 邹喻苹,葛颂,王晓东.系统与进化植物学中的分子标记[M].北京:科学技术出版社,2000:1-50.
- [8] Taberlet P, Gielly L, Pautou G. et al. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA[J]. Plant Molecular Biology, 1991, 17(5):1105-1109.
- [9] Demesure B, Sodzi N, Petit R J. A set of universal primers for amplification of polymorphic non-coding regions of mitochondrial and chloroplast DNA in plants[J]. Molecular Ecology, 1995, 4(1): 129-134.
- [10] Dellaporta S L, Wood J, Hicks J B. A plant DNA mini preparation: version II[J]. Plant Biol Rep, 1983,1(4):19-21.
- [11] 彭建营,束怀瑞,彭士琪.一种适合枣和酸枣基因组DNA的提取方法[J].河北农业大学学报,2000,23(4):46-48.
- [12] 王卓伟,余茂德,鲁成.PVP在桑叶总DNA提取中的应用[J].西南农业大学学报,2001,23(1):61-65.
- [13] 刘玉皎,李萍,张小田. β -巯基乙醇和PVP对蚕豆DNA质量的影响[J].湖北农业科学,2008,47(3):248-250.