

葡萄总 DNA 提取方法的比较研究

党 尉,尉亚辉,张华平,刘 科

(西北大学 生命科学学院,陕西 西安 710069)

摘要:以葡萄幼叶为材料,分别采用溴化十六烷基三甲基铵(CTAB)法、高盐低 pH 法、简易法、高盐沉淀法和改良十二烷基硫酸钠(SDS)法 5 种方法提取总 DNA,通过 A_{260}/A_{280} 值、琼脂糖凝胶电泳和 RAPD 对 5 种方法所得 DNA 溶液进行定量、定性分析和综合比较。结果显示高盐低 pH 法、高盐沉淀法综合效果较好,改良 SDS 法所得 DNA 纯度最佳。因此,在实际工作中还应根据实验目的选取最适合的方法。

关键词:葡萄;总 DNA(脱氧核糖核酸);提取方法;聚合酶链反应

中图分类号:Q503 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-274 X (2003)05-0572-03

高质量 DNA 的获得是进行分子杂交、基因库构建、核酸分析等分子生物学研究的首要步骤。虽然目前文献已报道了许多 DNA 提取的方法。但是,研究中我们仍需要根据植物材料的不同情况进行 DNA 提取方法的改进及筛选比较。对于葡萄而言,因其多糖、多酚、单宁、脂质等物质含量较高,这些次生物质常与核酸形成复合物, DNA 埋在这种粘稠的胶状物中难以溶解且产生程度不同的褐变^[1],这种 DNA 是不能用于分子生物学研究的。因此,建立一种制备高质量葡萄总 DNA 的有效方法是十分必要的。本研究对 5 种提取总 DNA 的方法做适当改进并进行比较分析,试图建立一种快速从葡萄中提取高纯度、高得率总 DNA 的方法,为葡萄分子生物学的深入研究奠定技术基础。

1 材料和方法

1.1 试验材料

试验材料为巨峰葡萄,取自西北大学果园。选取处于旺盛营养生长期的健康幼叶,去除叶柄分装于塑料袋中立即置于 -80°C 超低温冰箱保存备用。

1.2 总 DNA 的提取

取出超低温冰箱保存的幼叶,迅速研磨至粉末状,分别采取以下方法提取总 DNA。

1.2.1 CTAB 法^[2] 称取 2 g 干粉,加入 10 mL 65°C 预热的 CTAB 提取液,充分混匀于 65°C 中保温 30 min,加等体积的氯仿-异戊醇(24:1),10 000 g, 4°C 离心 5 min,取上清液加 1/10 体积 65°C 预热的 CTAB/NaCl 溶液,混匀加等体积的氯仿-异戊醇(24:1),10 000 g, 4°C 离心 5 min,取上清液加 1 倍体积 CTAB 沉淀液,10 000 g, 4°C 离心 5 min,用高盐 TE 缓冲液重悬沉淀(65°C 温育 30 min),加 0.6 倍体积的异丙醇,10 000 g, 4°C 离心 15 min,70% 的乙醇洗涤 DNA 沉淀 2 次,风干后溶于 1 mL TE, 4°C 保存备用。

1.2.2 高盐低 pH 法^[3,4] 称取 2 g 干粉,加入 10 mL 65°C 预热的提取液,充分混匀于 65°C 中保温 30 min,10 000 g, 4°C 离心 10 min,取上清液加 2/3 倍体积的 2.5 mol/L (pH=4.8) 的 KAc 溶液, 4°C 放置 15 min,10 000 g, 4°C 离心 10 min,取上清液加等体积的氯仿-异戊醇(24:1),12 000 g, 4°C 离心 20 min,取上清液加等体积的 -20°C 预冷的异丙醇, -20°C 静置 20 min,15 000 g, 4°C 离心 10 min,70% 的乙醇洗涤 DNA 沉淀 2 次,风干后溶于 1 mL TE, 4°C 保存备用。

1.2.3 简易法^[5] 称取 2 g 干粉,加入 10 mL CTAB 提取液,充分混匀于 65°C 中保温 30 min,冷却至室温加等体积的氯仿-异戊醇(24:1),12 000

收稿日期:2002-10-25

基金项目:陕西省自然科学基金资助项目(98SM02)

作者简介:党 尉(1979-),女,陕西大荔人,西北大学硕士生,从事植物生物技术方面研究。

g, 4℃离心 10 min, 重复抽提 2 次, 取上清液加 2.5 倍体积的 -20℃预冷的无水乙醇, -20℃静置 1 h, 12 000 g, 4℃离心 10 min, 70%的乙醇洗涤 DNA 沉淀 2 次, 风干后溶于 1 mL TE, 4℃保存备用。

1.2.4 高盐沉淀法^[5] 向简易法提取的 DNA 中加 3 mol/L NaCl 至 NaCl 终浓度为 2.5 mol/L, 并用等体积的 -20℃无水乙醇沉淀 DNA, -20℃静置 1 h, 12 000 g, 4℃离心 10 min, 70%的乙醇洗涤 DNA 沉淀 2 次, 风干后溶于 1 mL TE, 4℃保存备用。

1.2.5 改良 SDS 法^[6] 称取 2 g 干粉, 加入 10 mL 提取液, 室温数分钟解冻后加入 5 mL 10% SDS 溶液, 轻轻混匀于 65℃保温 30 min, 取出后立即置于冰上, 加 2.4 mL 5 mol/L KAc 溶液于冰上反应 30 min, 13 000 g, 4℃离心 20 min, 取上清液加 1 倍体积的异丙醇, -40℃放置 30 min, 13 000 g, 4℃离心 20 min, 用 5 mL TE 缓冲液溶解沉淀, 加等体积的氯仿-异戊醇(24:1), 混匀后 10 000 g, 4℃离心 10 min, 取上清液加 0.8 倍体积的 -20℃预冷的异丙醇和 1/10 体积的 3 mol/L NaCl, -40℃静置 30 min, 13 000 g, 4℃离心 20 min, 70%的乙醇洗涤 DNA 沉淀 2 次, 风干后溶于 1 mL TE, 4℃保存备用。

向以上 5 种方法所得的 DNA 溶液中加入无 DNA 酶的 RNase(终浓度为 40 μg/mL), 37℃保温 1 h, 氯仿-异戊醇(24:1)抽提后用 -20℃的无水乙醇沉淀 DNA, 将所得的 DNA 溶于等体积的 TE 中。

1.3 总 DNA 的定性、定量检测

将提取的 DNA 样品做适当稀释后, 分别测定 A_{260} , A_{280} 值并计算 A_{260}/A_{280} 以检验纯度, 并根据 A_{260} 计算 DNA 含量; 以 λDNA/Hind III 为参照, 用 0.7% 的琼脂糖凝胶电泳做定性分析。

1.4 PCR 扩增及电泳检测^[7,8]

反应在 Touchgene Gradient (TECHNE 公司) PCR 仪上进行。分别以 5 种方法提取的总 DNA 为模板, 反应体系为 25 μL, 其中含 10 mmol/L Tris-HCl (pH=8.3), 50 mmol/L KCl, 2.5 mmol/L MgCl₂, 0.2 mmol/L dNTPs, 2.5 U TaqDNA 聚合酶 (上海 Sangon), 10 pmol 引物 (10 bp 随机引物)。扩增程序: 95℃预变性 2 min, 94℃, 45 s, 37℃, 30 s, 72℃, 50 s, 进行 40 个循环, 72℃延伸 5 min。扩增产物在 1.5% 琼脂糖凝胶 (EB⁺) 中电泳后于紫外透射仪上观察照像。

2 结果与分析

2.1 DNA 样品的纯度和产量

如表 1 所示, 5 种方法提取所得的 DNA 溶液的 A_{260}/A_{280} 均在 1.6~1.8 之间, 这表明所得 DNA 样品中基本无蛋白质污染。但是, 各种方法在去除蛋白质方面的效果仍存在一定差异, 其中改良 SDS 法效果最好, 高盐低 pH 法、高盐沉淀法的较好, 而简易法和 CTAB 法的结果稍差。就 DNA 的产量而言, 简易法、高盐沉淀法均可得到大量的 DNA, 而改良 SDS 法的 DNA 产量最低。其次, 5 种方法的工作时间差异也较大, 改良 SDS 法和 CTAB 法比较繁琐、费时, 而其他 3 种方法则较为简单、耗时少。

表 1 5 种提取方法所得 DNA 样品的纯度和产量
Tab. 1 The purity and yields of extracted DNA by five methods

方法	A_{260}/A_{280}	DNA 产量/ $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$
CTAB 法	1.708	240.75
高盐低 pH 法	1.74	271.5
高盐沉淀法	1.745	316.88
简易法	1.686	358.13
改良 SDS 法	1.762	210.38

2.2 琼脂糖凝胶电泳分析

从电泳图谱 1 (图 1) 可以看出, 5 种方法所提取的 DNA 均无明显的拖尾现象, 说明所得的 DNA 完整性均较好。其次, 我们可以发现各种方法的点样孔

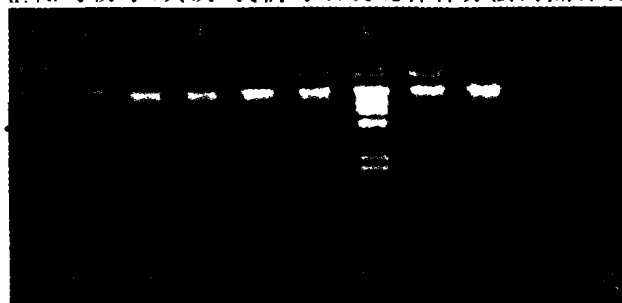


图 1 5 种方法提取葡萄基因组 DNA 电泳图

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of genomic DNA from grape by 5 methods

注: 1, 2 CTAB 法 3, 4 高盐低 pH 法 5, 6 高盐沉淀法 M Marker 7, 8 简易法 9, 10 改良 SDS 法

基本都残留一些杂质, 其中简易法的点样孔最亮, 这说明该 DNA 样品中含有较多的未被去除的蛋白质、多糖及一些其他次生代谢产物, 由于这些物质具有粘连特性, 常与 DNA 结合成复合物, 使得 DNA 分子无法离开点样孔或电泳速度较慢。相比较而言, 高盐低 pH 法的效果最好, 点样孔基本无异物, 说明

该方法对于葡萄中的多糖和次生代谢产物去除效果很好,其他 3 种方法的效果较好。

从电泳图谱 2(图 2)可以看出,5 种方法所得 DNA 均可用于 PCR 操作,所得 RAPD 条带清晰,重复性好。其中改良 SDS 法的 DNA 浓度虽低,但扩增后产物浓度却很高,说明所得 DNA 的质量较高,相反简易法的质量就较低,其他 3 种方法也有清晰的反应结果。总之,扩增后的分析结果与上述结果基本保持一致。

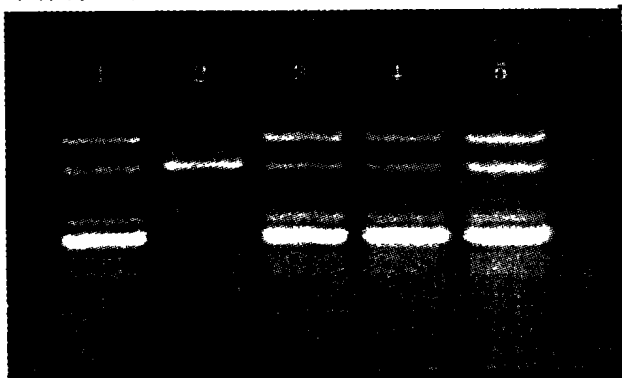


图 2 RAPD 产物电泳图

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of RAPD products

注:1 CTAB 法 2 高盐低 pH 法 3 高盐沉淀法
4 简易法 5 改良 SDS 法

3 讨 论

目前,关于植物总 DNA 的提取方法已报道了许多,本研究根据所选材料的特点选取 5 种方法,各种方法均有其优缺点。CTAB 是一种去污剂,它可以裂解细胞,又可与 DNA 形成复合物而溶于高盐溶液中,当盐浓度降低时此复合物将析出,同时 CTAB 可有效沉淀多糖。但是,对酚类化合物的去除效果不是很理想,实验步骤也比较繁琐;高盐低 pH 法中,低 pH 可有效地防止组织破碎及沉淀大量材料时的电离化作用和酚类化合物的褐变,高盐则是有效的蛋白质沉淀剂。其次,该方法简便、经济,虽然其 A_{260}/A_{280} 并非最高,但完全可用于 PCR 等分子生物学操作;SDS 也是去污剂,可直接裂解细胞,使其释放出核 DNA,经过一些步骤的改进,结果显示 DNA 的质量很好。但是,其产量很低。另外, DNA 样品的 RAPD 鉴定结果说明 5 种方法所得 DNA 均可用于 PCR 等分子生物学操作。总之,高盐低 pH 法、高盐沉淀法效果较好,当然实际应用中可根据具体的要求选择适当的提取方法。

为了更有效地去除杂质,提高 DNA 的质量,采

取了以下措施:① 在适当步骤中加大了离心力和离心时间;② 所有方法中均避免了酚的使用,采用氯仿-异戊醇抽提,克服了酚对人体的危害及酚的残留对下一步分子操作带来的困难;③ 选取处于旺盛营养生长期的健康幼叶,因为随着植物个体的发育,植物组织内的成分变得愈加复杂,且多酚、多糖以及一些次生代谢产物含量也将增高,因此严重影响了 DNA 的提取及质量,本试验观察到,当选取较成熟的叶子时,所得 DNA 溶液的颜色均比幼叶深,为浅褐色;④ 实验材料研磨充分,操作中当 DNA 释放出来后,一直给予温和处理,稍剪除移液器枪头的前端以避免 DNA 受到剪切或断裂;⑤ PVP, 2-巯基乙醇联合使用去除酚类, PVP 是一种高分子合成树脂,能络合多酚物质,防止酚类化合物氧化成醌类,避免溶液变褐而具有抗氧化作用,并且可直接通过离心或氯仿-异戊醇抽提去除^[9],针对葡萄中酚类化合物含量较高,5 种方法中均加入了一定量的 PVP,其中改良 SDS 法是在研磨过程中添加适量 PVP。其次酚类化合物的存在加强了褐化效应,2-巯基乙醇具有阻止酚类物质氧化的作用,可有效地防止褐变^[10],二者的联合使用在去除葡萄酚类化合物方面取得了良好效果,5 种方法得到的 DNA 溶液均无色或略带黄色。

注:尉亚辉为本文通讯作者

参考文献:

- [1] 王 军,贺普超. 山葡萄基因组 DNA 提取及 RAPD 鉴定[J]. 果树科学, 2000, 17(2): 79-82.
- [2] CLARK M S. 植物分子生物学-实验手册[M]. 顾红雅,翟礼嘉译. 北京:高等教育出版社,海德堡:施普林格出版社,1998. 4-7.
- [3] 王培训,黄 丰,周 联,等. 植物中药材总 DNA 提取方法的比较[J]. 中药新药与临床药理, 1999, 10(1): 18-20.
- [4] 邹喻辛,汪小全,雷乙丁,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] 李 丹,凌定厚. 五种提取马尾松基因组 DNA 方法的比较[J]. 植物学通报, 2000, 17(2): 168-173.
- [6] 王景雪,孙 毅,高武军. 一种简便实用的植物总 DNA 提取方法[J]. 西北大学学报(自然科学版), 2000, 23(3): 271-272.
- [7] 王跃进, LAMIKANRA O. 葡萄 RAPD 分析影响因子的研究[J]. 农业生物技术学报, 1997, 5(4): 387-391.
- [8] 董继新,林伯年,何祖华. 葡萄属植物基因组 DNA 的多态性分析[J]. 浙江农业大学学报, 1998, 24(2): 219-220.

(下转第 602 页)

The mathematical representation and their significance of geological timing with Milankovitch theory

CHEN Qing-hua^{1,2}, LIU Chi-yang¹, LI Qin²

(1. Department of Geology, Northwest University, Xi'an 710069, China; 2. Library of University of Petroleum, Dongying, 257061, China)

Abstract: The mathematical representations and their significance are discussed in geological dating with Milankovitch theory. The results show that the theoretical basis is practicable for geological dating using Milankovitch theory. The study of the depositional velocities is an important way to improve the effect of the geological dating. Another important way is to determine the time interval of the strata to be processed accurately. The time interval must be longer than the largest Milankovitch cycle, which can be taken as the lower limit that can be recognized in geological dating. When the thickness is quite big, it should be paid attention to the effectiveness of the energy degree for the frequencies related to Milankovitch cycles. The Milankovitch theory dating method is a new method. Its mathematical representations can be used in the computer. This provides an automatic method for geological dating.

Key words: Milankovitch theory; geological dating; mathematical representation

(上接第 574 页)

[9] 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): 61-62.

DNA 方法的比较[J]. 新疆农业大学学报, 1999, 22(4): 320-322.

[10] 曲延英, 张强, 孔祥祯, 等. 4 种快速提取棉花总

(编·辑 徐象平)

Comparison research of methods of DNA extraction from grape

DANG Wei, WEI Ya-hui, ZHANG Hua-ping, LIU Ke

(College of Life Science, Northwest University, Xi'an 710069, China)

Abstract: Five methods, i. e. CTAB, high salt-low pH, basic method, high salt precipitation, improved SDS method, were used to extract total DNA from the young leaves of grape. The resulted DNA samples of five methods were tested qualitatively and quantitatively using the value of A_{260}/A_{280} , agarose gel electrophoresis and RAPD. The results show that high salt precipitation and high salt-low pH methods are better as a whole. The purity of extracted DNA by improved SDS is the best. So we should select the proper method according to the objective in the study.

Key words: grape; total DNA; methods of extraction; RAPD