

# 高粱总 DNA 不同提取方法的比较

郑卓, 李健, 圣忠华, 彭智勇, 罗宝

(1. 井冈山大学生命科学学院, 江西吉安 343009; 2. 湖南农业大学生物科学技术学院, 湖南长沙 410128)

**摘要** [目的] 探索高粱总DNA的快速、高效提取方法, 为将其导入水稻提供大量、高质量的DNA。[方法] 以高粱幼叶为材料, 分别采用SDS法、CTAB法、尿素法和NaOH法提取高粱总DNA, 并对不同方法提取DNA的纯度、浓度和产量进行检测。[结果] 尿素法提取DNA纯度和质量最好, SDS法和CTAB法次之, NaOH法最差。采用尿素法、SDS法、CTAB法和NaOH法分别可从1g高粱样品中提取到约92.00、21.75、152.25和243.75 μg的DNA。4种方法提取的高粱总DNA的琼脂糖凝胶电泳结果表明NaOH法不能有效提取高粱总DNA, 其他3种方法在提取高粱总DNA时能较好地保证其完整性。高粱总DNA分子量约为50 KB。[结论] 尿素法提取DNA的纯度最好、产率最高, 是一种理想的高粱总DNA提取方法。

**关键词** 高粱; DNA; 尿素法; SDS法; CTAB法; NaOH法

中图分类号 S514 文献标识码 A 文章编号 05017-6611(2007)36-11758-02

## Comparison of Different Extraction Methods of Total DNA from Sorghum

ZHENG Zhuo et al (College of Life Science, Jinggangshan University, Jian, Jiangxi 343009)

**Abstract** [Objective] The research aimed to discuss rapid and highly-efficient extraction methods for extracting DNA from sorghum and provide a large amount of DNA with high quality for introducing it into rice. [Method] With the tender leaves of sorghum as materials, total DNA was extracted from sorghum by SDS method, CTAB method, urea method and NaOH method. And the purity, concentration and yield of DNA extracted by different methods were detected. [Result] The purity and quality of DNA extracted by urea method were best, followed by SDS method and CTAB method, that by NaOH method was worst. And 92.00, 21.75, 152.25 and 243.75 μg DNA were respectively extracted from 1 g sorghum sample by urea method, SDS method, CTAB method and NaOH method. The agarose gel electrophoresis results of DNA extracted from sorghum by 4 kinds of methods showed that NaOH method could not extract total DNA from sorghum effectively and the other 3 methods could keep the integrity of total DNA extracted from sorghum. The molecular weight of total DNA from sorghum was about 50 KB. [Conclusion] DNA extracted by urea method has the best purity and the highest yield. Urea method is a kind of ideal extraction method for extracting total DNA from sorghum.

**Key words** Sorghum; DNA; Urea method; SDS method; CTAB method; NaOH method

外源DNA导入植物的遗传转化技术(genetic transformation technique)是应用整体植物生长过程中控制世代遗传交替的种胚细胞或苗端分生组织细胞为靶细胞, 导入外源DNA进行品种改良<sup>[1]</sup>。不少研究证明, 外源DNA导入技术可以克服远缘杂交不亲和性, 实现基因在物种间的交流, 同时创造一些特异中间材料, 为大田育种提供丰富的基础材料<sup>[2-5]</sup>。高粱为C<sub>4</sub>作物, 光合效率高, 且茎秆坚韧、穗大粒多、抗性好。能否通过外源DNA导入技术将高粱DNA直接导入水稻, 从而实现高粱有益性状向水稻的转移, 一直受到育种家们的关注。外源DNA导入技术的第一步是外源DNA的提取。因此, 外源DNA质量的好坏直接关系到外源DNA导入的成败<sup>[6]</sup>。笔者旨在探索高粱DNA的快速、高效提取方法, 以期能为高粱DNA导入水稻提供大量、高质量的DNA。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

**1.1.1 高粱品种。**当地(吉安市)农家品种。将高粱种子用70%酒精灭菌后置于恒温箱中发芽, 然后将其移栽于经土壤灭菌的花盆内, 待其幼叶长出后备用。

**1.1.2 试剂。**SDS、尿素、CTAB、NaOH、氯仿、异戊醇、NaCl、HCl、95%酒精、EDTA、琼脂糖等, 均由井冈山大学生命科学学院分子生物学实验室提供。

**1.2.3 仪器。**FA1004型精密天平, TGL-16C型高速离心机, 水浴锅, UV754N型紫外可见分光光度计, DYY-101电泳仪, YLN2000型凝胶成像系统, 1.5 ml 无菌离心管, -20℃冰箱。

**基金项目** 江西省教育厅科技项目(赣教技字[2007]324号); 江西省吉安市科技局指导性重点项目(吉市科计字[2005]28号); 井冈山学院自然科研项目(科研字[2006]1号)。

**作者简介** 郑卓(1973-), 男, 湖北竹溪人, 博士, 副教授, 从事水稻遗传育种。

**收稿日期** 2007-08-22

## 1.2 方 法

### 1.2.1 高粱总DNA的提取。

**1.2.1.1 SDS法。**取高粱幼叶2g剪碎于研钵中, 加10 ml SDS提取液, 快速研磨, 将研磨液装于1.5 ml 无菌离心管中, 摇动离心管并使其充分混匀; 将离心管放于65℃的水浴锅中水浴30 min; 再将等体积的氯仿-异戊醇(24:1)溶液加入离心管中, 摇匀, 使之成乳状液, 12 000 r/min离心5 min; 用移液枪吸取上清液并转入另一离心管中, 加等体积的氯仿, 混匀, 12 000 r/min离心5 min; 将上清液转入另一无菌离心管中, 加2倍体积预冷的乙醇(95%), 温和倒转数次, 出现絮状DNA沉淀后用吸管将其吸出, 放入另一无菌离心管中; 用75%乙醇冲洗DNA 3次, 小心倒去液体相, 风干, 用500 μl TE溶液溶解, -20℃保存备用。

**1.2.1.2 尿素法。**取高粱幼叶2g剪碎于研钵中, 加10 ml 尿素提取液, 快速研磨, 以后步骤同上述SDS法。

**1.2.1.3 NaOH法。**取0.4g高粱嫩叶剪碎于研钵中, 加0.25 ml/L NaOH 5 ml, 研磨, 将研磨液转移至纯净的小烧杯内, 将小烧杯置于沸水中2 min之后加入3 ml 0.25 ml/L HCl中和, 再加5 ml 0.5 ml/L Tris-HCl(pH值8.0), 沸水浴5 min。以后步骤同上述SDS法。

**1.2.1.4 CTAB法。**将CTAB提取缓冲液及CTAB/NaCl溶液预热到65℃; 取高粱幼叶2g, 剪碎于研钵中, 加10 ml 预热的CTAB提取液, 快速研磨, 将研磨液分装转入1.5 ml 离心管中, 摇动离心管使充分混匀。以后步骤同SDS法。

### 1.2.2 高粱总DNA产量和质量的检测。

**1.2.2.1 DNA纯度、浓度和产量的检测。**将上述提取的DNA(2 μl)用蒸馏水稀释20倍, 在UV754N型紫外可见分光光度计上测定OD<sub>260</sub>、OD<sub>280</sub>, 计算DNA溶液的浓度。每个样品

取3次平均值。根据DNA的浓度计算样品中DNA的产量,根据 $OD_{260}/OD_{280}$ 比值估计DNA的纯度。

$$\text{DNA 浓度}(\mu\text{g/ml}) = OD_{260} \times 50 \times \text{稀释倍数}$$

$$\text{DNA 产量}(\mu\text{g/g}) = \text{DNA 浓度} / (2 \times \text{提取DNA所需的叶片克数})$$

**1.2.2.2 DNA 分子量大小的检测。**取3  $\mu$  上述DNA样品和3  $\mu$  标准分子量大小DNA/EcoRI + Hnd 为Marker,于1.4%琼脂糖上电泳,后经溴化乙锭染色,在YLN2000型凝胶成像系统上成像,以检测高粱DNA分子量大小。

## 2 结果与分析

**2.1 DNA 的质量和产量** 由表1可知,尿素法提取的高粱DNA  $OD_{260}/OD_{280}$  值接近1.8,表明尿素法提取的高粱DNA纯度高、质量好<sup>[6]</sup>; SDS法和CTAB法的  $OD_{260}/OD_{280}$  值在2.000左右,表明这两种方法提取DNA纯度和质量较好;而NaOH法的  $OD_{260}/OD_{280}$  值最大,为2.407,表明NaOH法提取的DNA纯度和质量最差。在这4种方法中,尿素法1g样品可提取总DNA 292.00  $\mu$ g, SDS法可提取21.75  $\mu$ g, CTAB法可提取152.25  $\mu$ g, NaOH法可提取243.75  $\mu$ g。综合分析,提取方法的优劣是:尿素法 > CTAB法 > SDS法 > NaOH法。

表1 高粱总DNA紫外分光光度计分析结果

方法	$OD_{260}$	$OD_{280}$	$OD_{260}/OD_{280}$	DNA 浓度 $\mu\text{g/ml}$	DNA 产量 $\mu\text{g/g}$
SDS法	0.087	0.045	1.993	87.00	21.75
尿素法	1.168	0.662	1.878	1168.00	292.00
CTAB法	0.609	0.294	2.071	609.00	152.25
NaOH法	0.130	0.054	2.407	195.00	243.75

注:表内为3次重复的平均值。

**2.2 高粱总DNA琼脂糖凝胶电泳检测结果** 由图1可见,碱法提取的高粱DNA泳道无任何反应,说明碱法不能有效提取高粱的总DNA。用CTAB法提取,DNA带亮度较弱,但点样孔较亮,说明CTAB法提取的高粱DNA中含有较多的多

糖,纯度较差。用尿素法提取的高粱DNA泳道内,DNA带最明亮,点样孔较暗,说明尿素法提取的高粱DNA中多糖含量少,纯度最好,浓度最高。用SDS法提取,DNA带亮度较弱,点样孔暗,说明SDS法提取的DNA所含多糖少,纯度高,但浓度较低。这些结果与紫外可见分光光度计测定结果相一致。尿素法、CTAB法和SDS法提取的DNA主要集中在50 kb左右的位置,说明高粱总DNA分子量大小约为50 kb,这3种方法在提取高粱总DNA时能较好地保证其完整性。

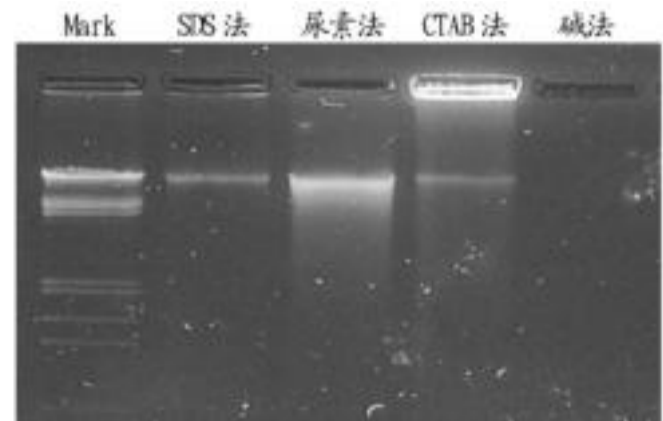


图1 高粱总DNA琼脂糖凝胶电泳结果

## 3 结论

在DNA提取过程中,首先要考虑DNA的质量和产量,其次是方法的简洁和经济。一般而言,上述4种方法均可用于植物总DNA的提取。经综合考虑,笔者认为尿素法是获取高质量、高产量的最佳高粱总DNA提取方法。

### 参考文献

- [1] 周光宇. 农业分子育种[M]. 北京: 中国农业科学, 1988: 1-6.
- [2] 陈立云, 严钦泉, 肖应辉, 等. 两系法杂交水稻的理论与技术[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2001: 186-195.
- [3] 万文举, 彭克勤, 邹冬生. 遗传工程水稻研究(一)[J]. 湖南农业科学, 1993(4): 11-14.
- [4] 宋令荣, 黄兴奇, 陈利, 等. 外源DNA导入水稻西南175引起的性状变异[J]. 西南农业学报, 1993(2): 15-20.
- [5] 段晓岚, 陈善葆. 外源DNA导入水稻引起性状变异[J]. 中国农业科学, 1985(3): 6-10.
- [6] 洪亚辉, 董延瑜, 易自力, 等. 植物外源DNA直接导入技术[M]. 长沙: 湖南科学技术出版社, 2000.
- [4] RUIZ GAARCIA L, CERVERA MT, MARIÑEZ ZAPATER J M. DNA methylation increases throughout Arabidopsis development[J]. Planta, 2005, 222: 301-306.
- [5] HINNEGAN E J, GINGER R K, PEACOCK W J, et al. DNA methylation in plants[J]. Ann Rev Hart Physiol Hart Ml Bd, 1998, 49: 223-247.
- [6] SHERMAN J D, TALBERT L E. Vernalization-induced changes of the DNA methylation pattern in winter wheat[J]. Genome, 2002, 45(2): 253-260.
- [7] VIELLE CALZADA J P, BASKAR R, GROSSNIKLAUS U. Delayed activation of the paternal genome during seed development[J]. Nature, 2000, 404: 91-94.
- [8] PENTERMAN J, ZILBERMAN D. De novo methylation in the Arabidopsis genome[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2007, 104(16): 6752-6757.
- [9] EDEN S, CEDAR H. Role of DNA methylation in the regulation of transcription[J]. Current Opinion in Genetics & Development, 1994, 4: 225-229.
- [10] SPRINGER N M, KAEPLER S M. Evolutionary divergence of non-covalent methyl-CpG binding domain proteins[J]. Hart Physiology, 2005, 138(1): 92-104.
- [11] BALLESTAR E, ESTELLER M. Methyl-CpG binding proteins in cancer: clarifying the DNA methylation messenger[J]. Biochemistry and Cell Biology, 2005, 83(3): 374-384.

(上接第11757页)

能与甲基化DNA结合的蛋白最先在哺乳动物中发现,目前,脊椎动物中共分离到5个MBD成员。近年来,关于植物甲基结合域蛋白基因的研究也取得了初步进展。拟南芥、水稻、玉米基因组分别编码13、16和16个包含MBD保守域的蛋白;对拟南芥、玉米、水稻的MBD蛋白聚类分析表明,双子叶植物拟南芥MBD分为8个亚类,单子叶植物玉米、水稻MBD蛋白只包含其中的6个亚类<sup>[10]</sup>。

### 参考文献

- [1] MAIZKE M A, PRIMIG M. Reversible methylation and inactivation of marker genes in sequentially transformed tobacco plants[J]. EMBO J, 1989, 8: 643-649.
- [2] GUIZARRIZ-MARCOS J F, COSTA L M. Epigenetic asymmetry of imprinted genes in plant gametes[J]. Nat Genet, 2006, 38(8): 876-878.
- [3] BENDER J. DNA methylation and Epigenetics[J]. Annual Review of Hart Biology, 2004, 55: 41-68.