

枸杞叶片 DNA 不同提取方法比较

思彬彬, 尚洁, 马艳辉 (北方民族大学生命科学与工程学院, 宁夏银川 750021)

摘要 [目的] 为研究枸杞的遗传多样性、种质鉴定和指纹图谱的构建提供基础保证。[方法] 以枸杞成熟叶片为试材, 分别采用常规 CTAB 法、高盐 CTAB 法等 11 种方法从枸杞中提取基因组 DNA, 比较不同方法的提取效果。[结果] 11 种方法中, 除 5 × CTAB 法试验结果不理想外, 其余 10 种均能有效地从枸杞叶片中获得 DNA, 所提 DNA 的质量和产量均无明显差异。[结论] 11 种方法提取的枸杞基因组 DNA, 能够满足 RAPD 分析的需要。

关键词 枸杞; 成熟叶片; DNA 提取

中图分类号 S567.1⁺9 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2009)15-06872-01

Comparison of Different Extraction Methods of Genomic DNA from the Leaves of *Lycium barbarum* L.

SI Bin-bin et al (College of Life Science and Engineering, Northern University for Nationalities, Yinchuan, Ningxia 750021)

Abstract [Objective] The research aimed to provide basic guarantee for studying the genetic diversity, the germplasm identification and construction of fingerprint of *Lycium barbarum* L. [Method] With mature leaves of *Lycium barbarum* L. as tested material, the genomic DNA was extracted from *Lycium barbarum* L. using eleven different methods, such as CTAB method, high-salt CTAB method and so on. The extraction effects of different methods were compared. [Result] High-quality DNA could be obtained with ten of all methods, except 5 × CTAB method. Quality and output of DNA had no significant differences. [Conclusion] The genomic DNA could be extracted from the mature leaves of *Lycium barbarum* L. by 11 kinds of methods. These methods all could be used in RAPD reaction.

Key words *Lycium barbarum* L.; Mature leaves; DNA extraction

宁夏枸杞 (*Lycium barbarum* L.) 为茄科多年生落叶灌木^[1], 主要分布在宁夏、内蒙古、新疆等省的干旱和半干旱地区, 具有很强的耐盐和耐旱性^[2]。宁夏枸杞由于其组织细胞中含有大量的多糖、多酚及其他次生代谢产物, 一般方法所提取的 DNA 质量较差。笔者主要采用常规 CTAB 法、常规 SDS 法、改良的 CTAB、改进的 SDS 法等 11 种方法, 对宁夏枸杞叶片 DNA 进行提取, 目的在于筛选出更适用于枸杞叶片基因组提取的方法, 为枸杞 DNA 分子标记研究提供基础保证。

1 材料与方 法

1.1 材料 供试材料宁夏枸杞叶片, 采自北方民族大学试验基地, 取其成熟叶片, 洗去叶面灰尘, 晾干。

1.2 提取方法 采用 11 种提取方法, 分别为: 常规 CTAB 法^[3]; 高盐 CTAB 法^[4]; 改良的 SDS 法^[4]; 5 × CTAB 法 (方法同常规 CTAB, 只是用 5% CTAB); CTAB 法^[5]; CTAB 法^[6]; 常规 SDS 法^[7]; 改进 CTAB 法^[8]; CTAB 法^[9]; 改进 SDS 法^[8]; 改进改良 CTAB 法^[4]。

1.3 DNA 检测方法

1.3.1 DNA 纯度和浓度检测。 吸取 10 μl DNA 溶液, 加入 3 ml 蒸馏水, DNA 母液被稀释 301 倍。混匀, 转入分光光度计的石英比色杯中, 用等体积的蒸馏水做空白对照。用紫外分光光度计测量 260 和 280 nm 处的 OD 值, 根据公式 DNA 浓度 = 50 × OD₂₆₀ × 301, 计算 DNA 浓度; 根据 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 判断 DNA 的大致纯度。

1.3.2 琼脂糖凝胶电泳检测。 取 5 μl 样品在浓度 0.8% 含有 EB (溴化乙锭) 的琼脂糖凝胶上电泳, 电泳电压 100 V, 30 min 后在紫外光下检测。

1.3.3 RAPD 检测。 按照枸杞基因组 DNA 指纹图谱分析^[6] 中 RAPD 反应体系进行检测。

2 结果与分析

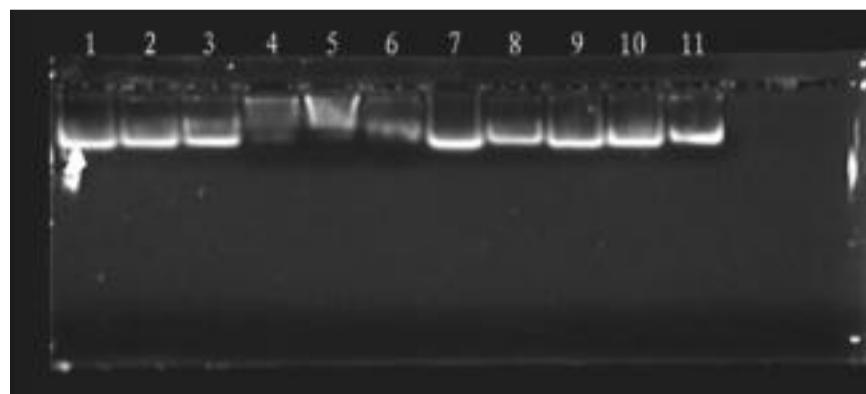
2.1 DNA 样品的纯度和浓度 由表 1 可知, 方法

、提取的基因组 DNA 纯度均较好, A₂₆₀/A₂₈₀ 在 1.80 左右, 说明 DNA 中不含蛋白质; 而方法 、 、 、 A₂₆₀/A₂₈₀ 小于 1.70, 表明有蛋白质、苯酚、多糖多酚类等杂质存在, 影响了 DNA 纯度; 方法 、 A₂₆₀/A₂₈₀ 大于 1.9, 表明 DNA 中 RNA 或 DNA 已降解。根据估算的 DNA 浓度, 基本表现与纯度相符。

表 1 11 种方法提取枸杞叶片 DNA 的纯度和浓度

Table 1 The purity and concentration of DNA extracted from *Lycium barbarum* by eleven kinds of methods

方法 Method	A ₂₆₀	A ₂₈₀	纯度 A ₂₆₀ /A ₂₈₀ Purity	DNA 浓度 μg/μl DNA concentration
	0.014	0.007	2.00	210.70
	0.015	0.008	1.875	225.75
	0.021	0.012	1.75	316.05
	0.020	0.019	1.05	301.00
	0.016	0.008	2.00	240.80
	0.017	0.009	1.89	255.85
	0.051	0.027	1.89	767.55
	0.013	0.007	1.86	195.65
	0.011	0.007	1.57	165.55
	0.018	0.012	1.50	270.90
瓏	0.023	0.014	1.64	346.15



注: 1. 常规 CTAB; 2. 高盐 CTAB 法; 3. 改良的 SDS 法; 4. 5 × CTAB 法; 5. CTAB 法; 6. CTAB 法; 7. 常规 SDS 法; 8. 改进 CTAB 法; 9. CTAB 法; 10. 改进 SDS 法; 11. 改良 CTAB 法, 下同。
Note: 1. Conventional CTAB; 2. High-salt CTAB method; 4. 5 × CTAB method; 5. CTAB method; 6. CTAB method; 7. Conventional SDS method; 8. Improved CTAB method; 9. CTAB method; 10. Improved SDS method; 11. Improved CTAB method. The same as below.

图 1 枸杞叶片 DNA 不同提取方法电泳图谱

Fig. 1 Electrophotogram of DNA extracted from wolfberry leaves by different methods (下转第 6875 页)

基金项目 北方民族大学资助项目(2007Y049)。
作者简介 思彬彬(1977-), 女, 宁夏银川人, 硕士, 讲师, 从事植物病理学方面的研究。
收稿日期 2009-02-27

生长点的茎尖为外植体,可使草木犀的基因转化效率得到较大提高。

4 结论

该试验采用草木犀试管苗的子叶、下胚轴、破坏生长点的茎尖为外植体,在含有0、1、3、5、10 mg/L 除草剂草丁膦的



图3 移栽入土的再生转化草木犀

Fig.3 The regenerated and transformed *M. suaveolens* after transplanting

参考文献

- [1] 王清连. 植物组织培养[M]. 北京: 中国农业出版社, 1998: 186 - 199.
- [2] 四川成都市园林局. 花卉植物组培进展[J]. 2001: 69 - 76.
- [3] JAMES DJ, DANDEKAR A M. Regeneration and transformation of apple [M] // LINSEY K. Plant tissue culture manual: Fundamentals and application. Dordrecht/ Boston: Kluwer Academic Publishers, 1991: 1 - 18.
- [4] 刘庆忠. 提高草木犀转化效率的研究[J]. 果树科学, 2000, 17(3): 159 - 163.
- [5] ROBINSON NJ, PROCTER C M, CONOLLY E L et al. A ferric-chelate reduc-

分化培养基 MS+ BA 3 mg/L+ IAA 0.2 mg/L 上诱导再生芽, 得出3 mg/L 除草剂为适宜的筛选压力。在此筛选压力下, 对不同外植体进行遗传转化, 其中破坏生长点的茎尖再生芽的效率最高, 对其部分再生苗进行PCR 及 Southern blot 杂交检测, 再生苗均为转化苗(图3~4)。



图4 转化的草木犀外植体

Fig.4 The transformed explants of *M. suaveolens*

tase for iron uptake from soils [J]. Nature, 1999, 397: 694 - 697.

- [6] 盖树鹏. 转基因植物的筛选与检测[J]. 山东农业大学学报: 自然科学版, 2000, 31(1): 95 - 100.
- [7] 段发平. Bar 基因和转 Bar 基因作物的研究进展[J]. 广西植物, 2001, 21(2): 166 - 172.
- [8] 师效欣. 根癌农杆菌介导丑豆胰蛋白酶抑制剂基因转入草木犀主栽品种中[J]. 园艺学报, 2000, 27(4): 282 - 284.
- [9] 孙爱君. 草木犀与八棱海棠的试管苗外植体植株再生[J]. 上海农业学报, 2000, 16(2): 23 - 30.

(上接第6872页)

2.2 琼脂糖电泳分析 不同方法提取DNA的凝胶电泳检测结果见图1。由图1可知, 提取方法 、 、 、 、 、 、 所提取DNA的电泳带很清晰, 基本无降解拖尾现象, 在加样孔附近滞留的物质很少; 而方法 、 、 电泳带不明显, 可能存在污染物。

2.3 RAPD 检测 基因组DNA是否可用, 可直接用PCR扩增效果验证。在PCR扩增反应中, 对模板DNA的要求以RAPD最低。由图2可知, 运用11种不同方法通过RAPD检测都能扩增出清晰的带型。

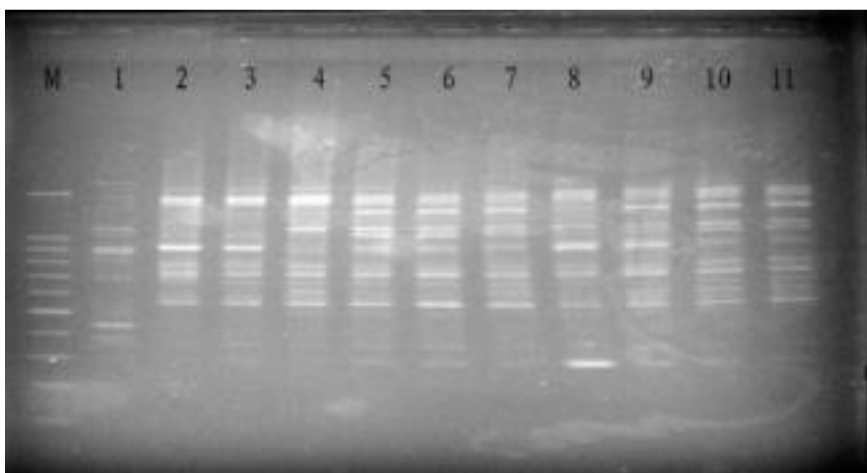


图2 RAPD 扩增电泳图谱

Fig.2 RAPD amplification electrophoretogram

3 讨论

(1) 对于方法 , 利用提高CTAB浓度的办法提取DNA, 未能获得满意效果。可能是因为CTAB具有一定的黏性, 浓

度过高, 保温时材料与CTAB缓冲液难以充分混匀, 造成材料发泡不均匀, 需延长保温时间, 增加DNA的降解。

(2) 分子生物学研究中, DNA的提取质量是影响试验分析结果的关键因素之一。目前, 植物基因组DNA的提取方法主要有CTAB法、SDS法以及试剂盒提取法等。人们常根据试验目的、要求和植物种类或营养体的不同选用不同的方法, 具体操作也会存在较大差异。该试验中, 由于枸杞叶片组织含有较高的糖和酚类物质, 利用适用于其他植物的提取方法从枸杞叶片中也能得到枸杞基因组DNA, 完全能满足RAPD分析的需要。

参考文献

- [1] 匡可任, 路安民. 中国植物志(茄科)[M]. 北京: 科学出版社, 1978: 47 - 48.
- [2] 黄震华, 徐菱华. 作物耐盐极限及土壤盐渍化分级标准研究[J]. 宁夏农林科技, 1989(4): 179 - 184.
- [3] 姜静. 分子生物学试验原理与技术[M]. 哈尔滨: 东北林业大学出版社, 2003: 18 - 32.
- [4] 詹亚光, 曾凡锁. 富含多糖的白桦成熟叶片DNA的提取方法[J]. 东北林业大学学报, 2005(3): 24 - 27.
- [5] 孙晓东. 枸杞基因组DNA的提取与分析[J]. 陕西中医, 2003, 24(12): 1129 - 1130.
- [6] 严奉坤, 许兴. 枸杞基因组DNA提取及指纹图谱分析[J]. 时珍国医国药, 2007, 18(1): 46 - 49.
- [7] 顾红雅, 瞿礼嘉. 植物基因与分子操作[M]. 北京: 北京大学出版社, 1995: 21 - 23.
- [8] 腊萍, 罗淑萍, 章建新, 等. 甜菜总DNA不同提取方法的研究[J]. 新疆农业大学学报, 2006(2): 77 - 79.
- [9] 陈路, 赵家荣. 古莲的研究现状及意义(一)[J]. 生物学通报, 1999, 34(11): 1 - 2.