

从苹果属腊叶标本中提取DNA的改良CTAB法研究

丁芳兵¹, 刘连芬², 汤庚国¹, 吴瑞姣², 钱关泽²

(¹南京林业大学森林资源与保护学院, 南京 210037; ²聊城大学生命科学学院, 山东聊城 252059)

摘要:为了探求从保存年代较长, 并富含多糖多酚的苹果属植物腊叶标本中提取基因组DNA的方法, 在传统CTAB法的基础上加以改良, 无液氮研磨材料后加入预冷CTAB free缓冲液和提高沉淀时盐浓度, 所得模板直接用于扩增nrITS区和cpDNA *matK*基因。经紫外分光光度和琼脂糖凝胶电泳检测, 结果表明用改良方法提取的DNA在质量和产量上优于常规方法并能满足后续扩增反应的要求。该方法不需要液氮研磨, 节省了人力和成本, 提前加入除杂缓冲液对去除多酚的效果良好, 增加沉淀时盐的浓度能有效去除多糖, 表明改良CTAB法适合苹果属腊叶标本叶片总DNA的提取。

关键词: DNA提取; 多酚; 多糖; 苹果属; 腊叶标本

中图分类号: Q946.2

文献标志码: A

论文编号: 2012-0279

DNA Extraction from *Malus* Leaves of Dried Specimens Based on the Modified Methods of CTAB

Ding Fangbing¹, Liu Lianfen², Tang Gengguo¹, Wu Ruijiao², Qian Guanze²

(¹College of Forest Resources and Environment, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037;

²Life Science College of Liaocheng University, Liaocheng Shandong 252059)

Abstract: In order to find methods for total DNA extraction from *Malus* herbarium specimens stored for many years and enriching polysaccharides and polyphenolics, modified CTAB methods were studied based on the conventional methods. The DNA templates were used directly in amplifying the whole nrITS region and cpDNA *matK* gene by adding precooling CTAB free buffer after treated without liquid nitrogen and improving the concentration of NaCl when precipitating. Ultraviolet spectrophotometer and agarose gel electrophoresis methods were used to test the DNA quality. The results showed that modified CTAB methods were optimal to produce high quality and yields DNA and amplifiable in the polymerase chain reaction (PCR). This methods don't need to grind with liquid nitrogen, saving manpower and reducing cost. In addition, adding CTAB freed buffer and improved NaCl when precipitating were effective for the removal of polyphenolics and polysaccharides. The researches indicated that the modified CTAB was suitable for extracting genomic DNA from *Malus* herbarium leaves.

Key words: DNA isolation; polyphenol; polysaccharide; *Malus*; herbarium specimens

0 引言

苹果属(*Malus* Mill.)隶属蔷薇科(Rosaceae)苹果亚科(Maloideae), 为北温带重要树种。全世界共有40种, 中国约25种, 为重要果树或观赏树^[1], 随着分子生

物学的发展国内外已对苹果属的系统发育进化、遗传育种等开展了大量的研究^[2-4]。提取基因组DNA是进行一切分子生物学实验的前提, 用来提取植物基因组DNA的试验材料多为新鲜幼嫩叶片或硅胶干燥标本,

基金项目: 国家自然科学基金项目“苹果属(蔷薇科)植物杂交起源研究”(31070619); 国家自然科学基金项目“苹果属(蔷薇科)植物分类修订”(31170178); 山东省自然科学基金项目“中国野生苹果砧木资源遗传多样性及嫁接亲和性差异的分子机理研究”(ZR2011CM045)。

第一作者简介: 丁芳兵, 女, 1983年出生, 山东威海人, 博士研究生, 主要从事森林资源及植物分类研究。通信地址: 210037 江苏省南京市龙蟠路159号 南京林业大学09级博士班, Tel: 025-85427650, E-mail: dfbi@yahoo.cn。

通讯作者: 钱关泽, 男, 1965年出生, 山东莒县人, 教授, 博士, 主要从事种子植物分类学研究。通信地址: 252059 山东省聊城市聊城大学生命科学学院109, Tel: 0635-8539619, E-mail: qianguanze@lcu.edu.cn。

收稿日期: 2012-02-07, **修回日期:** 2012-05-04。

但在实际工作中,有时因远距离采样或时间限制,只能从腊叶标本材料中提取DNA。苹果属是多年生木本植物,本身含有大量的多糖、多酚等次生代谢产物,这些物质在标本存放过程中不易被降解,仍然大量存在于叶组织中,提取时DNA易于和多糖共沉淀并与多酚类物质发生不可逆相互作用,降低提取的纯度;并且脱氧核糖核酸对空气中的水分子和氧气很敏感,在长时间的保存过程中会受到不同程度的降解和破坏^[5],不利于进行后续的PCR扩增。目前虽然可以采用基因组提取试剂盒,但由于成本过高,一般不被研究大量植物材料的科研工作人员普遍接受。

CTAB法现已广泛用于植物基因组DNA的提取,赵海山等^[6]研究了改良CTAB法对干燥方式不同的平邑甜茶叶片DNA的提取效果,结果表明从标本干燥叶片也能获得质量较好的DNA,但是含量不如新鲜叶片和硅胶干燥叶片多。钟扬等^[7]应用玻璃粉沉淀法对保存多年的特殊植物材料千屈菜等的标本提取DNA并用于PCR扩增,效果良好。目前针对苹果属腊叶干燥标本DNA的提取尚缺少报道,笔者在研究苹果属植物系统发育进化的过程中,通过大量试验,摸索出一种能够从长期保存并富含次生代谢产物的标本材料中提取DNA的方法,为后续生物学实验的开展奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 标本材料 选择了2007—2008年间采集的7个苹果属标本(表1),包括湖北海棠、沧江海棠、陇东海棠、山荆子等,取其枝条上的干燥叶片进行试验。

表1 样品来源

样品号	种名	样品来源
1	沧江海棠 <i>M. ombrophila</i>	腊叶标本.2008.云南维西
2	湖北海棠 <i>M. hupehensis</i>	蜡叶标本.2008.湖北神农架
3	滇池海棠 <i>M. yunnanensis</i>	腊叶标本.2008.云南中甸
4	滇池海棠 <i>M. yunnanensis</i>	腊叶标本.2008.云南中甸
5	湖北海棠 <i>M. hupehensis</i>	腊叶标本.2007.安徽大别山
6	湖北海棠 <i>M. hupehensis</i>	腊叶标本.2007.安徽大别山
7	山荆子 <i>M. baccata</i>	腊叶标本.2007.山西灵宝山

1.1.2 主要试剂 常规CTAB裂解液[2% CTAB, 100 mmol/L Tris.Cl (pH 8.0), 20 mmol/L EDTA (pH 8.0), 1.4 mmol/L NaCl, 2% β -巯基乙醇]; CTAB free 提取液[0.25 mol/L NaCl, 0.2 mol/L Tris.Cl (pH 8.0), 80 mmol/L EDTA (pH 8.0), 2%~4% PVP]; 改良CTAB裂解液[2% CTAB, 100 mmol/L Tris.Cl (pH 8.0), 80 mmol/L EDTA (pH 8.0), 1.4 mmol/L NaCl, 2% PVP,

2% β -巯基乙醇]; 氯仿:异戊醇(24:1); 无水异丙醇; 无水乙醇; 70%乙醇; 3 mol/L NaCl; TE溶液(10 mmol/L Tris.Cl, 1 mmol/L EDTA, pH 8.0)。

1.1.3 主要仪器 Eppendorf冷冻离心机; UV-2100 尤尼柯紫外分光光度计; Bio-Rad PCR扩增仪; DYY-8C型电泳仪(北京六一仪器厂); GIS-1000凝胶成像仪(上海天能科技公司); 水浴锅; 移液枪。

1.2 方 法

1.2.1 DNA提取

(1)常规CTAB法。取0.1 g干燥叶片加入适量石英砂研磨成细粉状,移至1.5 mL离心管加入800 μ L热CTAB常规裂解液(β -巯基乙醇临用之前加入),65 $^{\circ}$ C水浴60 min,期间每隔10 min上下颠倒浮板1次;5000 r/min离心10 min,取上清液;加入等体积氯仿异戊醇,上下混匀成乳浊状,室温放置10 min;10000 r/min离心10 min;移上层水相至一新Eppendorf管,重复抽提1次;取上层水相,加入2/3体积-20 $^{\circ}$ C预冷的异丙醇,颠倒混匀后4 $^{\circ}$ C静置30 min;12000 r/min离心10 min,弃上清液,70%乙醇漂洗2次,用真空干燥泵吸干管壁残余的乙醇,室温晾干,加入适量TE缓冲液以及适量Rnase,4 $^{\circ}$ C过夜。

(2)改良CTAB法。与常规方法不同的是裂解之前先加入800 μ L预冷的CTAB free提取液,激烈震荡后冰浴10 min,3000 r/min离心5 min,弃上清液,立即加入预热的CTAB改良裂解液(β -巯基乙醇临用之前加入),65 $^{\circ}$ C水浴;加异丙醇沉淀DNA时同时加入1/5体积5 mol/L NaCl,其余步骤相同。

1.2.2 DNA纯度检测 取15 μ L DNA稀释20倍,在紫外分光光度计下测定波长为260 nm和280 nm时的吸光值,计算 $OD_{260/280}$ 比值。

1.2.3 琼脂糖电泳检测 采用1.0%的琼脂糖凝胶进行电泳,每个点样孔上样5 μ L,溴化乙锭染色,紫外灯下观察并根据标样判断DNA的分子量大小,最后记录结果拍照。

1.2.4 PCR扩增 2段DNA序列PCR扩增的总反应体积都为50 μ L,其中包括dNTP(0.2 mmol/L)、 Mg^{2+} (2 mmol/L)、Taq DNA聚合酶2.5 U, DNA模板15~30 ng,引物各20 μ mol。ITS区的扩增使用引物P4(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')和P5(5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3'); *matK*基因的扩增使用引物matK1F(5'-ACTGTATCGCACTATGTATCA-3')和trnK2R(5'-AACTAGTCGGATGGAGTAG-3')。ITS扩增程序分别为96 $^{\circ}$ C预变性2 min,96 $^{\circ}$ C变性30 s,50 $^{\circ}$ C退火30 s,72 $^{\circ}$ C延伸30 s,30个循环,最后72 $^{\circ}$ C延伸

2 min。matK 扩增程序为 96℃ 预变性 2 min, 96℃ 变性 1 min, 52.5℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 2 min, 35 个循环, 最后 72℃ 延伸 10 min。PCR 扩增产物用 1.5% 的琼脂糖胶, 在 1×TAE 缓冲液中电泳分离。

2 结果与分析

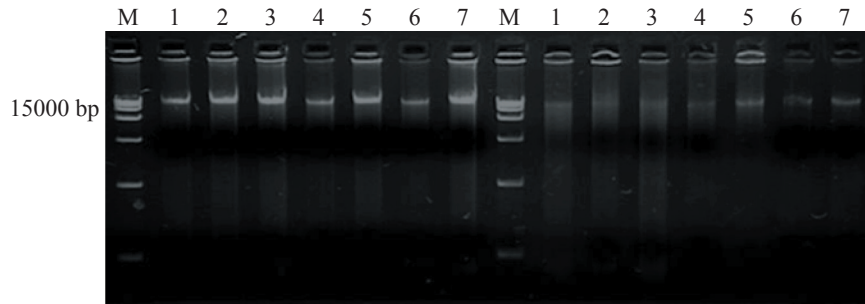
2.1 DNA 纯度和电泳检测结果

改良方法提取的 DNA $OD_{260/280}$ 比值介于 1.8~2.0 之间, 表示所提取的 DNA 纯度较高。从外观观察, 采用改良 CTAB 法在提取过程中未出现多酚类物质的褐化, 获得的沉淀物呈无色透明状, 能迅速溶解于低盐 TE, 溶液清亮。而常规 CTAB 法所获得的沉淀则呈现出褐色, 还混有大量胶状物。将 2 种方法提取的 DNA 进行琼脂糖电泳, 检测结果见图 1。改良 CTAB 法获得

的 DNA 片段大小较一致, 主带清晰, 点样孔无残留, 条带后面无明显拖尾, 且 RNA 消化较为彻底, 说明多糖等杂质去除较干净, DNA 质量好, 活性强, 无降解。而常规 CTAB 法所获得的基因组 DNA 在电泳中表现出主带弥散, 点样孔有荧光反应, 说明杂质去除的并不彻底且 DNA 有部分降解, 质量不高。

2.2 PCR 扩增的结果比较

图 2 和图 3 分别为采用常规方法和改良方法对 7 个样品的 nrDNA ITS 区和 cpDNA *matK* 的 PCR 扩增产物琼脂糖凝胶电泳结果, 用常规方法未获得所需的目标 DNA 片段或者仅能扩增出少量目的条带, 而采用改良方法扩增的 7 个样品均可获得清晰的目标 DNA 条带。



泳道 1~7 见表 1 中样品的编号。M 为 marker。下同

图 1 2 种方法提取的基因组 DNA 电泳图

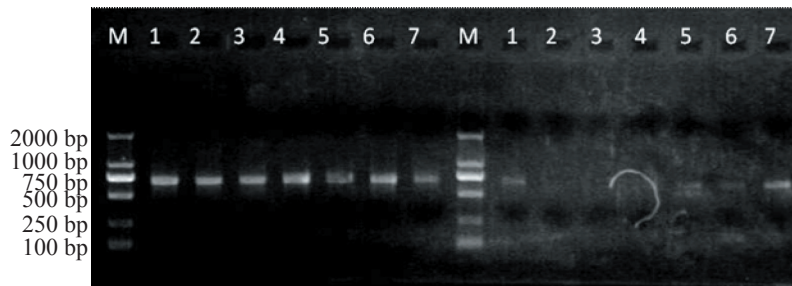


图 2 nrDNA ITS 扩增结果电泳图

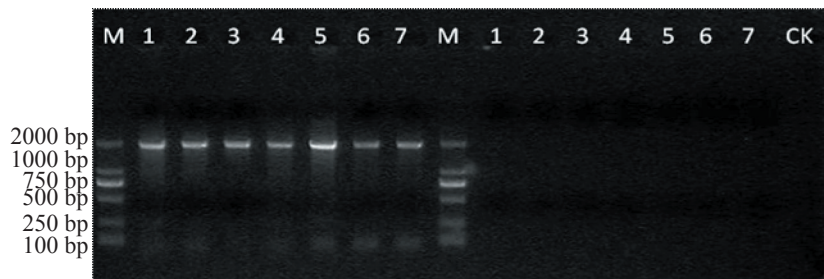


图 3 cpDNA *matK* 扩增结果电泳图

3 结论与讨论

本试验在提取 DNA 过程中没有使用液氮研磨, 而是直接加石英砂研磨腊叶干燥标本, 在此之前黄东亮等^[8]在对甘蔗进行基因组 DNA 的提取时已报道加液氮与否对 DNA 的产量和纯度没有影响, 对于叶龄长的成

熟叶片, 虽然加液氮更易磨碎叶片提高效率, 但直接研磨同样可以达到很好的提取效果。并且加液氮研磨过程中容易造成材料四处飞溅, 材料回温后若不迅速加入裂解液, DNA 容易与多酚物质发生糝化反应, 造成 DNA 降解^[9]。而无液氮研磨则可不受材料回温时间影

响,笔者在此基础上进一步加以改进,将研磨完的材料装入离心管,低温(-20℃)冰箱保存,之后试验步骤可集中进行,这样既可尽量避免交叉污染,又提高了工作效率。不过低温储藏对研磨成粉末的样品是否有影响,以及储存时间的长短还有待进一步研究。

对于酚类物质的去除以往学者往往采用向裂解液中加入高分子螯合剂PVP(基乙烯吡咯烷酮)或PVPP(聚乙烯吡咯酮)等能络合多酚和萜类物质,如杨云等^[10]、李娟玲等^[11]、於朝广等^[12]、赵丽华等^[13]、佟兆国等^[14]。但是由于腊叶标本在提取DNA之前已经成发生部分褐化,并且苹果属材料中还含有大量多糖等次生代谢产物,因此仅仅采用这些方法提到的DNA质量不理想,而且如果纯化次数太多,根本不能获得DNA,更无从谈及完整性。在裂解细胞核之前去除细胞质中的多酚是去除这类杂质的有效途径,在苹果属基因组DNA的提取上陈大明等^[15]仅在提取野生湖北海棠、苹果等果树的新梢幼叶时采用此方法,而对于蜡叶标本酚类的去除效果和可行性少见报道。经笔者验证此方法适用于苹果属腊叶干燥标本DNA的提取,不仅提前去除了多酚,有效抑制了氧化,还可去除一部分多糖,相对于常规方法提取的DNA外观呈褐色,加入除杂缓冲液后提取的DNA外观白色,干燥后透明。不足的是操作需在冰上进行,尤其对离心之后加入裂解缓冲液这一步骤要求尽量快速,并且因为除杂缓冲液会残留一部分在样品组织中,加入裂解液的体积有时不好定量掌握。本试验利用高盐高浓度异丙醇能沉淀DNA并溶解多糖的特性沉淀苹果属植物DNA,高洪晓等^[16]也认为高盐法对人体和环境危害较小且操作简单,优于其他除多糖的方法,适合丁香属植物DNA的提取。从电泳图中可以看出改良CTAB法提取DNA加样孔无明显荧光反应,表明多糖类物质去除的较彻底。此外,由于标本材料保存多年,DNA不可避免的会有部分降解,为了保证得到纯度较高、完整性较好的DNA,将EDTA浓度提高到80 mmol/L,以保护DNA不被内源核酸酶降解^[5]。从电泳图上看条带之后没有明显拖尾,片段长度均接近或等于15000 bp,无弥散现象,DNA完整性好。本试验对RNA酶的加入顺序也稍作调整,加RNA酶4℃过夜,不仅能够彻底消化RNA,还简化了操作步骤节省了时间,在对目的片段进行PCR扩增时也没有不良影响。值得注意的是在PCR问题上虽然改良方法提取的DNA均能得到有效的扩增,但部分常规方法提取的DNA也能够扩增出ITS片段,而在扩增matK片段上却无一例外地失败了,笔者认为可

能是matK片段长度较ITS长,常规方法提取的DNA可能已经严重降解,因此或许还能够扩增出小片段的DNA产物,但在大片段扩增上无能为力。

综上所述,提取苹果属植物腊叶标本采用无液氮研磨后加入预冷除酚缓冲液,同时提高裂解液中EDTA的浓度,异丙醇沉淀时提高盐浓度,最后加RNA酶4℃过夜,获得的DNA完全能够满足后续实验的要求,该改良CTAB法无需昂贵的试剂和复杂、高费用的操作步骤,具有简便、快速、经济的特点,单人单日便可提取DNA样品约100份,在一般实验室中均能应用,但是面对数量巨大的植物样品,如何进一步提高效率尚需探究。

参考文献

- [1] 傅立国.中国高等植物(第六卷)[M].青岛:青岛出版社,2003:562-576.
- [2] 赵天田,沈红香,姚允聪,等.苹果属观赏海棠实生单株亲本 AFLP 鉴定[J].园艺学报,2010,37(1):121-128.
- [3] Robinson J P, Harris S A, Juniper B E. Taxonomy of the genus *Malus* Mill (Rosaceae) with emphasis on the cultivated apple[J]. *Plant Systematics and Evolution*,2001,226:35-58.
- [4] 孙俊,房经贵,王飞,等.苹果 Ty1-copia 类逆转座子 LTR10 序列及其在苹果属植物中的遗传多样性分析[J].南京农业大学学报,2010,33(1):43-48.
- [5] 周延清.DNA 分子标记在植物研究中的应用[M].北京:化学工业出版社,2005:27-31.
- [6] 赵海山,刘连芬,李超,等.2种CTAB法对干燥方法不同的平邑甜茶叶片DNA的提取[J].安徽农业科学,2010,38(5):2244-2245,2273.
- [7] 黄椰林,施苏华,钟扬,等.一种从特殊植物材料中制备PCR模板的新方法[J].科学通报,2001,46(24):2055-2057.
- [8] 黄东亮,覃首良,廖青,等.高质量甘蔗基因组DNA的简便快速提取方法研究[J].生物技术通报,2010,5:101-106.
- [9] 魏胜华,孟娜.改良CTAB法提取大戟属药用植物叶片总DNA试验[J].湖北农业学报,2011,50(16):3418-3420.
- [10] 杨云,孟慧,魏建和,等.降香黄檀基因组DNA的提取方法研究[J].生物技术通讯,2009,20(3):383-386.
- [11] 李娟玲,刘国民,贾媛,等.一种高效提取鹧鸪茶基因组DNA的方法[J].中国农学通报,2010,26(8):69-73.
- [12] 於朝广,殷云龙.落羽杉属树木基因组总DNA的提取及SRAP反应体系的优化[J].基因组学与应用生物学,2009,28(1):109-114.
- [13] 赵丽华,王先磊.成熟石榴叶片DNA提取方法研究[J].安徽农业科学,2009,37(31):15141-15143,15156.
- [14] 佟兆国,王富荣,章镇,等.一种从果树成熟叶片提取DNA的方法[J].果树学报,2008,25(1):122-125.
- [15] 陈大明,张上隆,金勇丰.一种木本果树基因组DNA提取方法研究[J].浙江农业大学学报,1997,23(6):621-624.
- [16] 高洪晓,杨凯,刘建斌.3种植物DNA提取法中多糖类物质去除效果的研究[J].北京农学院学报,2011,26(1):70-72.