

# 植物组织DNA提取 的一种快速方法

陈永强

(中国科学院遗传研究所)

本文所介绍的方法最初是由 Bendick 提出的,我们原则上将此方法用于自己的实验室。在我们现有的实验条件下,对玉米、高粱、大豆、豌豆、大米草、水稻等多种植物幼苗 DNA 作了反复提取,都取得了较好的结果。其方法主要操作如下:

1. 称取室内萌发的植物幼苗一定量(在100克以内不限量),剪碎,放在研钵内,加入等量(W/V)的研磨缓冲液,此缓冲液内含 0.45 克分子氯化钠,0.045 克分子柠檬酸三钠盐(即  $3 \times \text{SSC}$ ),0.1 克分子的乙二胺四乙酸二钠盐(EDTA),1%的十二烷基硫酸钠(SDS),并调节 pH 到 7.0。然后剧烈研磨 3—5 分钟,成为浆状物。

2. 将这种浆状物倒入一个磨口三角瓶内,加入等体积的氯仿-异戊醇(24:1 V/V)混合液,加上瓶塞,剧烈摇晃 30 秒钟,以脱除组织蛋白质。

3. 在室温下离心(4000 转/分),此混合物 5 分钟后,形成三层,小心地吸取上层含有核酸的水溶液,弃去中间的细胞碎片、变性蛋白质层及下层的氯仿。

4. 将收集的水溶液倒入一个在 72°C 水浴中预热的试管中,并在 72°C 下继续保温 3—4 分钟(不要超过 4 分钟),以灭活组织内的 DNA 酶,然后迅速取出试管,放在冰水浴中冷却到室温。

5. 加入 5 克分子浓度的高氯酸钠溶液(4:1 V/V),使溶液中高氯酸钠的最终浓度为 1 克分子。

6. 再次加入等体积的氯仿-异戊醇(24:1 V/V)混合物,并在带塞的三角瓶内摇晃 30 秒钟。

7. 将此乳浊液在室温下离心(4000 转/分) 5 分钟后,并收集上层含核酸的水溶液。

8. 将收集的水溶液置于烧杯内,然后用滴管慢慢地加入此水溶液和二倍体积的95%的预冷过的乙醇于水溶液表面上,用玻璃棒轻轻搅动,此时核酸将迅速以纤维状沉淀<sup>1)</sup>缠绕在玻璃棒上。

9. 将核酸沉淀物在烧杯壁上轻轻挤压以除去乙醇,然后溶解在适量的  $0.1 \times \text{SSC}$  溶液(即,0.015 克分子的氯化钠加上 0.0015 克分子的柠檬酸三钠盐溶液 pH 7.0)中,待完全溶解后,加入此溶液十分之一体积量的  $10 \times \text{SSC}$ (即 1.5 克分子氯化钠加上 0.15 克分子柠檬酸三钠盐溶液, pH 7.0),使最终的溶液为  $1 \times \text{SSC}$ 。

10. 按照(8)的步骤,再次用乙醇沉淀核酸,并且按(9)的步骤将核酸溶解,即得到 DNA 的粗制品。

11. 加入预先处理过的 RNA 酶溶液<sup>2)</sup>使其最后的作用浓度为 50—75 微克/毫升,并在 37°C 下保温 30 分钟,以除去 RNA。

12. 加入等体积的氯仿-异戊醇溶液(24:1 V/V),在三角瓶中摇晃 30 秒钟,再次除去残留蛋白质及所加 RNA 酶。然后,以前述方法离心并收集上层水溶液。

13. 按照(8)的程序再次沉淀 DNA,并按照(9)的程序将其溶解,即可得到纯化的 DNA 溶液。

1) 当 DNA 不能形成或不完全形成纤维状沉淀时,采用离心法收集絮状沉淀物。

2) RNA 酶应当在 0.15 克分子氯化钠溶液(pH 5.0)中溶解,并在 80°C 水浴中保温 10 分钟,以灭活可能污染的 DNA 酶。然后冷却,在低温下保存备用。

本方法的特点是：(1)操作简便，只需一般室温实验条件；(2)需时很短，全部操作在3小时左右即可完成；(3)可以用于多种植物组织幼苗DNA提取，并基本上可以排除植物组织中多糖等类物质的干扰，而采用Marmur法等则往往有此种干扰；(4)分离效果好，一般情况下DNA的纯度都比较理想。我们先后进行了十多次实验，其DNA在紫外分光光度计波长为260m $\mu$ 、230m $\mu$ 及280m $\mu$ 的光吸收值的比值，即：A260m $\mu$ /A230m $\mu$ 平均为2.05，A260m $\mu$ /

A280m $\mu$ 平均为1.83，接近或超过了本实验室采用Sepharese 4B柱层析分离所得的结果。同时收率（即每克鲜重材料的DNA提取量）一般均在200微克/克鲜重左右，视材料不同而有所差异。

### 参 考 文 献

- [1] Bendick, A. J. and E. J. Bolton, 1976. Relatedness among plants as measured by the DNA-Agar technique. *Plant Physiol.*, 42: 959—965.
- [2] Marmur, J., 1961. *J. Mol. Biol.*, 3: 208—218.

## 山羊草叶片染色体的压片法

袁淑安 汪永祥

(中国科学院遗传研究所)

用植物根尖压片观察和鉴定植物染色体的方法在遗传和育种的研究中得到了广泛的应用，但是它仍有一定的局限性，如小麦花药培养诱导出的花粉植株的频率和小麦孤雌生殖的结实率还不很高，作物远缘杂交中，虽然采取各种措施来克服其杂交不亲和性和杂交后代不育性，但其杂交的结实率仍然很低。得到的少量宝贵种子用于根尖细胞学观察均有一定困难。一方面是材料宝贵，剪去根尖作细胞染色体检查影响植株的成活率；另外一方面每粒种子发芽后只能剪1—2个根尖制片，由于制片技术的限制，通过1—2次压片观察，往往不易得到清晰可数的分裂相。为了解决上述这些问题，我们用半凸山羊草(*Aegilops ventricosa*)的叶片进行了细胞染色体的观察研究。

**1. 取材** 为排除叶绿素可能造成的干扰，又能取得叶片的分生组织部分，取分蘖盛期的分蘖心叶，剪去有叶绿素的部分，留下一段5—7毫米幼嫩的基部。为区分材料的上下部位，要把两头断口剪成不同的形状，如：上为尖头，下为齐头，齐头部位即是叶片的分生组织部位（图1）。

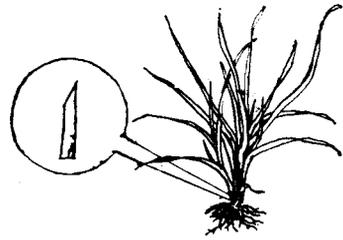


图1 取材料的部位

**2. 前处理的时间与方法** 我们于4月上中旬在室温(18—20℃)下剪取山羊草叶片，在上午11点30分进行前处理。处理的方法用了两种：(1)将材料放入0.002克分子浓度的8-羟基喹啉溶液内3小时，然后用水冲洗；(2)将材料放入蒸馏水中，置于1—5℃冰箱内20小时左右。两种方法中以冰冻处理效果为好。

**3. 固定** 用95%酒精与冰醋酸(3:1)的固定液处理20小时左右，后再用水冲洗。

**4. 解离(水解)** 放入95%酒精和浓盐酸(3:1)的解离液中10—15分钟，后用水冲洗。

**5. 媒染** 以4%的硫酸铁铵(铁明矾)媒染约20分钟，然后用水冲洗。

**6. 染色** 以0.5%的苏木精染液染色，染色