

基于改良 SDS 法的杏基因组 DNA 提取

杨 丽,张俊环,孙浩元,王玉柱

(北京市农林科学院林业果树研究所,北京,100093)

摘 要:为探讨改良 SDS 法是否适用于杏基因组 DNA 提取及提取液适宜浓度,以 6 个品种杏叶片为试材提取 DNA,提取液设 0.5%、1%、2% 三个浓度梯度。检测结果表明,改良 SDS 法完全适用于杏叶片基因组 DNA 的提取,3 种浓度的提取液均可得到质量较高的 DNA,且 0.5% 为改良 SDS 法提取杏叶片基因组 DNA 的适宜提取液浓度。

关键词:杏, DNA 提取, SDS 法

中图分类号: S662.2 文献标识码: A

Study on Apricot Genomic DNA Extraction by Modified SDS Method

Yang Li, Zhang Junhuan, Sun Haoyuan, Wang Yuzhu

(Institute of Forestry & Pomology, Beijing Academy of Agriculture & Forestry Sciences, Beijing 100093)

Abstract: To probe the adaptability of modified SDS method in apricot genomic DNA extraction and the optimal concentration, the genomic DNA samples of 6 apricot cultivars were isolated by 0.5%, 1%, 2% SDS extracted buffer. The results showed that good quality DNA would be obtained by modified SDS method and the 0.5% is better.

Key words: apricot, DNA extraction, SDS method

杏原产中国,在中国栽培历史悠久,近年来相关的分子生物学研究也呈现出迅猛发展的势头^[1]。制备高质量的 DNA 是进行分子标记、构建基因文库、分析亲缘关系等各项分子生物学研究的基础。植物 DNA 提取方法很多^[2],而 SDS 法经过各种改良,被广泛应用于各种植物的 DNA 提取^[3-6],但不同学者所用的 SDS 提取液浓度有很大差别。SDS 法是否适用于提取杏基因组 DNA? 提取液浓度是多少最为适宜? 寻找这些问题的答案是本研究的目的所在。

1 材料与方 法

1.1 材 料

试验材料为杏品种辽杏、红荷包、李光、龙王帽、信州大实和早甜核的叶片,于 2007 年 8 月下旬采自北京市农林科学院林业果树研究所杏资源圃,连同冰块一起放入冰壶带回实验室,蒸馏水冲洗干净、吸水纸充分

吸干表面水分,置 -80℃ 冰箱保存备用。试验于 2007 年 9 月中旬在本所分子生物学实验室进行。

1.2 方 法

1.2.1 DNA 提取

SDS 提取液设 0.5%、1%、2% (w/v) 三个浓度梯度,其余试剂相同。操作步骤如下:

(1) 称取 1g 叶片,放入预冷的研钵中加液氮研碎,转入 30ml 离心管中,分别加入 10ml 预热的 SDS 提取液 (0.5%、1%、2% SDS (W/V), 1.4mol/L NaCl, 100mmol/L Tris-HCl, 20mmol/L EDTA, 1% (w/v) PVP-40), 同时加入 1% (v/v) β - 巯基乙醇,充分震荡混匀,65℃ 水浴 40~45min,不时轻轻摇动;

(2) 取出离心管自然冷却至室温,加入等体积氯仿:异戊醇(24:1),10000r/min、4℃ 离心 10min,取上清至另一离心管中;

基金项目:北京市科技合同项目“干果良种资源的选育与开发”(955422200)。

第一作者简介:杨丽,女,1974 年生,农艺师,从事李、杏资源收集与新品种选育相关工作。通信地址:100093 北京海淀区香山瑞王坟甲 12 号。Tel: 010-82595857, E-mail: yangli186@yahoo.com.cn。

通讯作者:王玉柱,男,1960 年生,博士,研究员,从事李、杏资源收集与新品种选育相关工作。通信地址:100093 北京市海淀区香山瑞王坟甲 12 号。E-mail: chinabjwyz@sohu.com。

收稿日期:2008-02-29,修回日期:2008-03-11。

(3) 加入预冷 (-20℃) 的 1.5 倍体积无水乙醇, 置 -20℃ 30~60min, 可见絮状 DNA 沉淀;

(4) 挑出沉淀至 1.5ml 离心管中, 70%乙醇洗涤 2~3 次, 每次 5min; 再用无水乙醇洗涤 1~2 次;

(5) 自然干燥 DNA, 溶解于 500 μ l TE (10mmol/L Tris-HCl, 1mmol/L EDTA, pH8.0) 中;

(6) 加入浓度为 10mg/ml RNase A 2 μ l 降解 RNA, 37℃ 消化 1h;

(7) 重复步骤 (2) 1 次, 加入 1/10 体积 5mol/L CH₃COONH₄;

(8) 重复步骤 (3) 和 (4) 1 次;

(9) 待 DNA 自然干燥后, 溶解于 100~300 μ l TE 中, -20℃ 长期保存。

1.2.2 DNA 检测

(1) 紫外分光光度计检测: 取 5 μ l DNA 样品用 TE 稀释 10 倍, 于 effendorf 紫外分光光度计上检测产率和纯度。

(2) 琼脂糖凝胶电泳检测: 将所提 DNA 稀释 10 倍后于 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量, 电泳仪为北京六一仪器厂 DYY-33 型电泳仪, 0.5 \times TBE, 电压 5V/cm, 电泳时间 45min, 荧光染色, Alpha 凝胶成像系统观察、拍照。

2 结果与分析

2.1 分光光度计检测结果

分光光度计检测结果 (见表 1、2、3) 表明: 运用改良 SDS 法制备的杏 6 个品种、3 种提取液浓度的 DNA

表 1 0.5% SDS 提取液 DNA 产率与纯度检测

品种	OD260nm	OD280nm	OD260/OD280	产率 μ g/ml
辽杏	0.588	0.256	2.29	293.9
红荷包	0.623	0.313	1.99	311.7
李光	0.884	0.413	2.14	441.8
龙王帽	0.338	0.191	1.77	169
信州大实	0.848	0.433	1.96	424
早甜核	0.232	0.097	2.39	115.9
平均值	0.586	0.284	2.09	292.7

表 2 1% SDS 提取液 DNA 产率与纯度检测

品种	OD260nm	OD280nm	OD260/OD280	产率 μ g/ml
辽杏	0.335	0.185	1.81	167.6
红荷包	0.248	0.153	1.62	123.9
李光	0.351	0.184	1.91	175.6
龙王帽	0.418	0.257	1.62	208.8
信州大实	0.169	0.102	1.65	84.3
早甜核	0.164	0.080	2.06	82.1
平均值	0.281	0.160	1.78	140.4

表 3 2% SDS 提取液 DNA 产率与纯度检测

品种	OD260nm	OD280nm	OD260/OD280	产率 μ g/ml
辽杏	0.390	0.188	2.07	195
红荷包	0.231	0.134	1.73	115.4
李光	0.994	0.469	2.12	496.9
龙王帽	0.144	0.065	2.20	71.9
信州大实	0.528	0.247	2.14	264.2
早甜核	0.574	0.319	1.80	287.1
平均值	0.477	0.237	2.01	238.4

质量较好, 多糖、蛋白质、酚类等次生物质去除干净。

2.2 DNA 电泳结果

所有样品琼脂糖凝胶电泳条带清晰, 点样孔干净 (见图片 1、2、3), 证明所提 DNA 片段完整、无降解、次

生物质去除完全。

3 结论与讨论

本研究采用 0.5%、1% 和 2% 三种 SDS 浓度 DNA 提取液, 从 6 个杏品种中均提取到了较高质量的

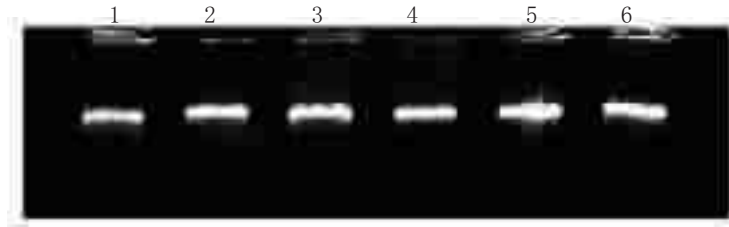


图1 0.5%SDS 提取液提取的 DNA 电泳结果

(1-6 分别为辽杏、红荷包、李光、龙王帽、信州大实、早甜核)

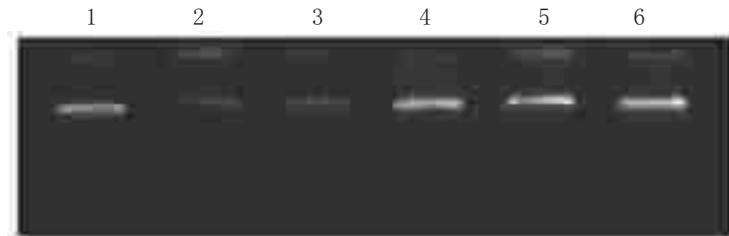


图2 1%SDS 提取液提取的 DNA 电泳结果

(1-6 分别为辽杏、红荷包、李光、龙王帽、信州大实、早甜核)

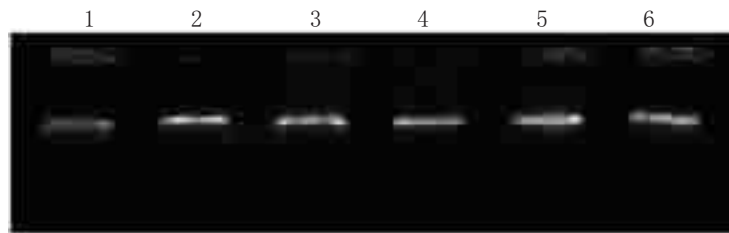


图3 2%SDS 提取液提取的 DNA 电泳结果

(1-6 分别为辽杏、红荷包、李光、龙王帽、信州大实、早甜核)

DNA,说明 SDS 法完全适用于杏基因组 DNA 的提取。

从纯度来看,SDS 提取液浓度为 1%时,6 个供试样品平均的 OD260/OD280 比值为 1.78, 最接近理想值,但比值低于 1.7 的样品达到 1/2,加之本组平均产率最低,故认为 1%的改良 SDS 提取液不适宜提取杏基因组 DNA。提取液浓度为 0.5%和 2%时,供试样品平均纯度和产率差别不大,但 OD260/OD280 比值稍大,说明存在一定的 RNA 污染^[2],可适当加大 RNaseA 用量,以提取到纯度更高的 DNA;比较而言,浓度为 0.5%时,DNA 产率更高、更稳定,因此确定为最优方案。

作为经典的植物 DNA 提取方法,SDS 法均被广泛应用于实践,并针对不同的植物材料进行了各种改良^[3-9]。据报道,当提取液中有 SDS 存在时,将提取液中的 NaCl 浓度提高至 1.4mol/L 可去除多糖^[10];PVP 能络合多酚物质,防止多酚物质氧化引起 DNA 褐变; β -巯基乙醇可降解蛋白质、并抑制氧化酶的活性^[3]。杏叶片中含有大量的多糖、蛋白质、酚类等次生物质,本研究综合借鉴了前人的研究成果:在提取液中加入了 1.4mol/LNaCl、1%PVP40 和 1% β -巯基乙醇,检测结果表明次生物质去除较完全;用氯仿:异戊醇(24:1)代替苯酚抽提,降低了苯酚残存对 DNA 质量的影响,避

免了苯酚对人体的危害;用 -20℃预冷的无水乙醇代替异丙醇沉淀 DNA,降低了成本,提高了方便性。整个实验过程所用试剂种类少,操作简便,效率高。

参考文献

- [1] 赵峰,刘威生,刘宁,等.我国杏种质资源及遗传育种研究新进展[J].果树学报,2005,22(6):687-690.
- [2] 彭学贤.植物分子生物技术应用手册[M].北京:化学工业出版社,2006,2:60-65.
- [3] 郝会海,李燕玲,杜志军,等.利用简化的 SDS 法提取杨树基因组 DNA[J].河北林果研究,2006,21(4):363-366.
- [4] 毛娟,赵长增,赵丽娟,等.扁桃基因组 DNA 提取及 RAPD 扩增体系的建立[J].甘肃农业大学学报,2005,40(1):17-21.
- [5] 徐宝利,毛娟,丁永胜,等.核果类果树基因组 DNA 提取方法的研究[J].甘肃农业大学学报,2006,41(6):43-48.
- [6] 姜玲,蔡礼鸿.一种提取银杏叶中 DNA 的方法[J].植物生理学通讯,2000,36(4):340-342.
- [7] 刘龙洲,曲延英,姚源松,等.三种玉米 DNA 提取方法探究[J].新疆农业大学学报,2003,26(1):31-33.
- [8] 乔玉山,章镇,沈志军.中国李基因组 DNA 提取方法的优化[J].上海交通大学学报(农业科学版),2004,22(2):138-142.
- [9] 王景雪,孙毅,高武军.一种简便实用的植物总 DNA 提取方法[J].山西大学学报(自然科学版),2000,23(3):271-272.
- [10] 刘卫国,易干军,张秋明,等.菠萝 DNA 的提取及 AFLP 反应体系的建立[J].果树学报,2006,23(1):51-54.