

# CTAB 法提取火龙果基因组 DNA 的试验研究

韦茜, 蔡永强, 金吉芬, 陶刚, 朱英

(1. 贵州省果树研究所, 贵州罗甸 550100; 2. 贵州省农业生物技术重点实验室, 贵州贵阳 550006)

**摘要** 以火龙果嫩茎为材料, 采用 CTAB 法对火龙果材料的基因组 DNA 的提取方法进行试验, 经采用调整试验顺序、适当延长有机溶剂的抽提时间和增加抽提次数、提高提取 DNA 的得率和纯度, 有效地克服了提取过程中粘液物质的干扰。结果表明, 该方法可普遍适用于仙人掌科量天尺属植物的 DNA 提取, 所得 DNA 纯度和得率能满足进一步研究的要求。

**关键词** 火龙果; 基因组; DNA; 提取

中图分类号 Q819 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)13-05325-02

## Experimental Study on the Extraction of Genomic DNA from *Hyllocereus undatus* by CTAB method

WEI Qian et al. (Gizhou Institute of Fruit Tree, Luodian, Gizhou 550100)

**Abstract** With tender stems of *Hyllocereus undatus* as materials, the experiment on the extraction method of genomic DNA from materials *H. undatus* was made by using CTAB extraction. Through adjusting the experiment order, prolonging the extraction time of organic solvent properly, increasing the extraction times, enhancing the yield and purity of the extracted DNA, the disturbance of mucous substance in the extraction process was effectively overcome. The results showed that this method was generally suitable for DNA extraction from *H. undatus* plants of Cactaceae and the purity and yield of the obtained DNA could meet the demands of further research.

**Key words** *Hyllocereus undatus*; Genome; DNA; Extraction

火龙果 (*Htaya*) 属仙人掌科量天尺属 (*Hyllocereus undatus*) 和蛇鞭柱属 (*Selenicereus*) 植物的果用栽培品种, 起源于中美洲, 自然分布在哥斯达尼加, 尼加拉瓜, 墨西哥, 古巴等国家和地区, 中美洲、澳洲和亚洲的越南、泰国有较多的人工栽培, 近年在中国大陆南方沿海省区和台湾省也有栽培。目前, 火龙果在贵州省已引种试种成功, 火龙果在低海拔热量充足的河谷地区表现生长良好、结果早、产量高, 产品营养价值丰富、风味独特、口感好。为进一步从分子遗传学角度了解火龙果品种间的亲缘关系, 选育适合贵州省种植的火龙果优良新品系, 笔者以火龙果嫩茎为试材, 探索火龙果植物的基因组 DNA 的提取方法。

## 1 材料与方 法

**1.1 材料** 火龙果嫩茎 贵州省果树研究所提供, 置于 -20℃ 冰柜中保存备用。

**1.2 仪器** 高速冷冻离心机 (Avanti J 25, Beckman)、紫外分光光度计 (DU800, Beckman)、水平电泳仪 (安发玛西亚)、紫外凝胶成像系统 (基因公司)、恒温水浴锅等。

**1.3 试剂** 2% CTAB 细胞裂解液 (CTAB 4 g、NaCl 16.364 g、1 ml/L Tris-HCl 20 ml)、饱和酚 (pH 值 8.5)、氯仿、KAc (3 ml/L, pH 值 5.2)、异丙醇、乙醇 (70%)、1×TAE 缓冲液, TE 缓冲液、琼脂糖 (0.8%)。

## 1.4 方 法

**1.4.1 基因组 DNA 提取、纯化方法。** 首先采用标准的 CTAB 法, 但由于火龙果嫩茎材料呈粘稠状, 离心分层效果差。通过试验观察发现, 火龙果材料对有些试剂反应不大, 但对 KAc 和异丙醇反应。采用调整试验顺序, 适当延长有机溶剂的抽提时间和增加抽提次数, 有效地克服了提取过程中粘液物质的干扰, 提高了 DNA 抽提的得率和纯度。具体方法:

取 5~8 g 火龙果幼嫩茎尖 (用清水冲洗干净, 凉干), 于液

氮中迅速研磨成粉末, 然后快速转移至 1.5 ml 离心管中。立即加入 600 μl 65℃ 预热的细胞裂解液 (CTAB), 置于 65℃ 水浴中保温 1 h, 其间每隔 5~10 min 轻摇 1 次。加 1 倍体积的 4-β 饱和酚和常温下的氯仿 (P:Cl 为 1:1), 轻摇 10 min, 以 12 000 r/min 离心 20 min。吸取上清液于 1.5 ml 离心管中, 加 0.1 倍体积的 4-β 预冷的 KAc, 加 1 倍的 -20℃ 预冷的异丙醇, 轻轻摇匀, 放置于 -20℃ 的冰柜中 20 min 使 DNA 充分析出。用切口枪头吸出团状 DNA 沉淀于 1.5 ml 离心管中, 用 70% 乙醇洗涤沉淀 2 次, 在超净工作台风干。加入适量的 4-β TE 缓冲液, 4-β 保存 2 h 使 DNA 充分溶解。重复 ~ 的操作 1 次, 加 4-β TE 缓冲液溶解保存于 4-β 的冰柜备用<sup>[1]</sup>。

**1.4.2 检测方法。** DNA 的质量检测: 取微量 DNA (100~200 ng) 点样于 0.8% 的琼脂糖凝胶中进行电泳, EB (溴化乙锭) 染色, 进行 DNA 质量检测, 电泳缓冲液为 1×TAE, 按凝胶的长度 5 V/cm 恒定电压进行电泳, 电泳约 1 h, 在紫外凝胶成像系统下观察记录所提取 DNA 的质量、纯度及 RNA 的消化去除情况<sup>[2]</sup>。DNA 纯度和浓度检测: 取少量上述提取纯化的 TE 溶解的 DNA 溶液, 在紫外分光光度计下测定波长 260、280 nm 的光吸收值。计算 OD<sub>260/280</sub> 比值, 根据 OD<sub>260/280</sub> 值判断 DNA 纯度, 当 1.8 < OD<sub>260/280</sub> < 2.0 时, 表明 DNA 纯度很好<sup>[3]</sup>; 根据 OD<sub>260</sub> 的值, 计算 DNA 浓度 (μg/ml) = OD<sub>260</sub> × 50 × 稀释倍数 1 000。

## 2 结果与分析

采用 CTAB 法提取 1~6 号火龙果材料的基因组 DNA, 结果表明, 所提 3、4、5 号 DNA 的 260、280 nm 的光吸收值在 1.8~2.0, 所得 DNA 纯度很好, 1、2、6 号材料的 DNA 的 260、280 nm 的光吸收值的比值略大于 2.0, 材料中的蛋白质或 RNA 去除不彻底; 1~6 号材料的 DNA 浓度超过 0.030 μg/ml (表 1), 说明 DNA 的得率高, 提取物中糖、酚、酶等干扰物质含量去除较为理想, 都能达到进一步研究的要求。用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳, EB (溴化乙锭) 染色, 进行 DNA 质量检测, 通过琼脂糖凝胶电泳图谱显示 (图 1), 所得的 DNA 除 6 号材

基金项目 贵州省 2004 年度科技攻关项目研究内容 (黔科合 2004 NG Y052)。

作者简介 韦茜 (1970-), 女, 贵州罗甸人, 助理研究员, 从事特色果蔬栽培及遗传育种研究。

收稿日期 2007-01-09

料跑出的带较弱外,各个提取物均呈现1条清晰整齐的主带,可用于进一步分析。

表1 火龙果材料提取的基因组DNA检测数据

Table 1 Detection data of genome DNA from Pitaya materials

	材料 Materials					
	1	2	3	4	5	6
OD <sub>260</sub>	0.621 7	0.956 8	1.388 7	1.866 6	2.979 9	1.021 2
OD <sub>280</sub>	0.305 2	0.466 1	0.706 9	0.957 7	1.502 0	0.487 0
OD <sub>260/280</sub>	2.036 9	2.052 5	1.964 5	1.949 1	1.983 9	2.097 0
Conc $\mu\text{g}/\text{ml}$	0.031	0.048	0.069	0.093	0.149	0.051

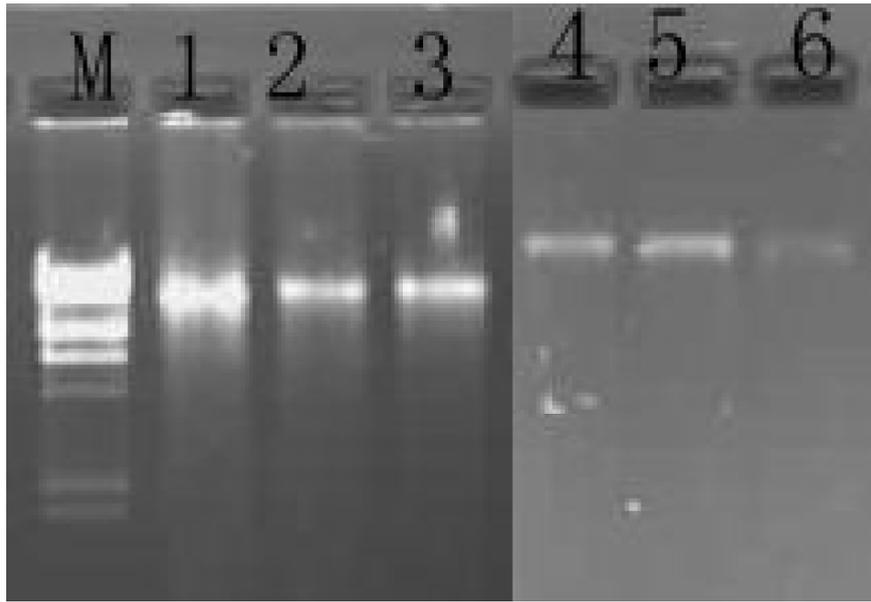


图1 提取基因组DNA的电泳结果

Fig.1 Electrophoresis result of genome DNA

### 3 讨论

(1) 火龙果基因组DNA的提取一般取新梢上3~5 cm

(上接第5271页)

(2) 就干旱胁迫对抗性不同的品种水解酶变化研究较少。对青海、甘肃两省主要旱地品种进行验证,结果表明:在非干旱胁迫环境下,全部参试品种的胚芽鞘生长迅速,但抗旱性强的品种芽鞘仍然较长;在干旱胁迫下,全部参试品种的胚芽鞘生长受到抑制,但干旱敏感的品种受到的抑制作用更加明显。试验进一步表明,芽鞘长度能很好地显示品种之间抗旱性的强弱,胚芽鞘的生长是萌发期抗旱能力的综合反映。随着萌发的进行, $\alpha$ -淀粉酶活性增加,在非干旱胁迫下虽有品种间差异,但在60 h或72 h时都能达到最大值;在干旱胁迫下,抗旱性强的品种 $\alpha$ -淀粉酶活性高于干旱敏感的品种。 $\alpha$ -淀粉酶活性的大小与它们萌发的快慢以及胚芽鞘生长量有很好的对应关系。这一结果与前人在小麦抗性研究中对胚乳活性及淀粉酶活性的研究结果一致。干旱胁迫下 $\alpha$ -淀粉酶活性与胚芽鞘生长呈显著相关,相关系数0.675。 $\alpha$ -淀粉酶活性影响小麦发芽率和幼苗成活率,是小麦能否摆脱干旱胁迫环境尽快进入自养阶段的重要因素。

(3) 在小麦抗旱育种过程中应选择胚芽鞘比较长的和干旱胁迫下 $\alpha$ -淀粉酶活性受抑制小的基因型,以培育抗旱性较强的新品种。干旱对萌发阶段抗旱性强的旱地春小麦品种胚乳活性抑制较小。可能在基因表达水平上,干旱对不同品种 $\alpha$ -淀粉酶同工酶的表达抑制程度的差异导致了 $\alpha$ -淀粉酶活性在不同抗旱性品种间差异显著。这有待于进

的嫩茎作材料,选用幼嫩的茎尖作提取材料可以大大提高DNA的得率。另外,不同品系火龙果的基因组DNA提取得率也有差别,比如,同样的方法和条件,提取火龙果1~4号材料的DNA要比提取5、6号材料的DNA容易,且得率高。

(2) 火龙果嫩茎材料破壁方法是液氮研磨法,所加液氮要充足,研磨要充分,使材料成绿白色粉末。由于火龙果材料中含有大量粘液状的粘稠性物质,在研磨时要迅速,研磨好后快速转移至离心管中,保持样品成绿白色粉末,样品装好后迅速放入-20℃的冰柜或立即加入65℃下预热的细胞裂解液CTAB,然后迅速放入65℃的水浴锅中,否则会影响细胞的裂解过程。细胞的裂解是细胞释放DNA的前提,同时要使裂解环境适合细胞释放的DNA保持活性,温度保持在65℃,水浴1 h,时间太长会使DNA降解,太短则DNA释放不完全,影响DNA的得率。因此,破壁和细胞的裂解是DNA提取过程中很重要的步骤。

(3) 由于火龙果嫩茎材料呈粘稠状,离心分层效果差。同时,材料对有机试剂反应不大,但对KAc和异丙醇反应。因此,主要是采用饱和酚和氯仿使蛋白质变性而从液相游离出来,用KAc和异丙醇使DNA析出,通过适当延长抽提时间到20 min和增加1次抽提,从而提高基因组DNA的得率和纯度。

#### 参考文献

- [1] 陶刚,刘作易,朱英,等.水稻玉米基因组DNA提取方法的改进[J].贵州农业科学,2004,32(6):21-22.
- [2] 朱英,陶刚,刘作易,等.琼脂糖凝胶电泳操作中值得注意的几个问题[J].贵州农业科学,2004,32(6):27-28.
- [3] 谭晓风,漆龙霖,黄晓光,等.山茶属植物叶片DNA抽提[J].中南林业学院学报,1999,19(4):75-77.

一步研究证实。

#### 参考文献

- [1] 王玮,邹琦.胚芽鞘长度作为冬小麦抗旱性鉴定指标的研究[J].作物学报,1997,23(4):458-467.
- [2] 王玮,邹琦.水分胁迫下冬小麦芽鞘长度与抗旱性的关系及其遗传特性的研究[J].西北植物学报,1997,17(4):493-498.
- [3] 艾志录,张晓宇,郭娟,等.不同品种小麦发芽过程中淀粉酶活力变化规律的研究[J].中国粮油学报,2006,21(3):32-35.
- [4] 陆定志,施天生,陈龙飞.杂交水稻干种子内存在 $\alpha$ -淀粉酶[J].植物生理学报,1987(13):418-421.
- [5] 陈爱国,陈进红.胚芽鞘的伸长机理和生理生态响应[J].山东农业大学学报:自然科学版,2002,33(4):438-441.
- [6] 赵玉锦,王台.水稻种子萌发过程中 $\alpha$ -淀粉酶与萌发速率关系的分析[J].植物学通报,2001,18(2):226-230.
- [7] 张怀刚,程大志.抗旱优质春小麦新品种——高原671[J].麦类作物学报,2003,23(4):143.
- [8] 井春喜,张怀刚,李毅,等.土壤水分胁迫对不同耐旱性春小麦品种叶片色素含量的影响[J].西北植物学报,2003,23(5):811-814.
- [9] 陈集贤,赵绪兰.丰产抗旱春小麦高原602研究与应用[M].兰州:兰州大学出版社,1995.
- [10] 李合生.植物生理生化实验原理和技术[M].北京:高等教育出版社,2000:169-172.
- [11] GEORG KRAEMER J E, MUNDSTOCK E C, CAVALLI-MOLINA S. Developmental expression of amylase during barley malting[J]. Journal of Cereal Science, 2001, 33(3):279-288.
- [12] 阎娥,乔有明.两燕麦品种种子萌发中淀粉酶活性变化的研究[J].草业科学,2006,23(9):96-98.
- [13] UMEHARA T, PERATA P, FUSUHARA Y, et al. Sugar sensing and alpha amylase gene repression in rice embryos[J]. Planta, 1998, 204:420-428.
- [14] LIU HUI PAN, ZHU XI XUE, LIU TIAN XUE, et al. Effect of osmotic stress on the kinds, forms and levels of polyamines in wheat cdequites[J]. Journal of Physiology and Molecular Biology, 2006, 32(3):293-299.
- [15] 王翠亭,黄占景,何聪芬.小麦耐盐突变体生化标记的研究[J].麦类作物学报,2002,22(1):10-13.
- [16] 赵可夫.植物抗盐生理[M].北京:中国科技出版社,1993.