

# 一种适用于动物与植物总 DNA 提取的方法——改良 CTAB 法

闫苗苗, 魏光成<sup>\*</sup>, 潘效红, 马怀雷, 李伟振 (滨州医学院烟台校区, 山东烟台 264003)

**摘要** [目的] 介绍一种简单、高效且能用于提取动物与植物的总 DNA 的方法。[方法] 采用改良 CTAB 法, 从 24 个花生品种嫩叶及小白鼠的肝、肺和肾中提取 DNA, 进行琼脂糖电泳和蛋白核酸分析仪检测及 PCR 扩增检验。[结果] 所提取 DNA 电泳条带清晰, 整齐均匀,  $OD_{260}/OD_{280}$  值介于 1.77~1.83, 用于 PCR 扩增获得理想效果。[结论] 该研究介绍的改良 CTAB 法提取动物和植物的总 DNA, 满足开展 PCR 扩增的要求。

**关键词** 动物; 植物; DNA; 改良 CTAB 法

**中图分类号** Q781 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2008)20-8488-01

## A Method Suitable for Extracting Genomic DNA from Animal and Plant—Modified CTAB Method

YAN Miao-miao et al (Yantai Campus of Binzhou Medical College, Yantai, Shandong 264003)

**Abstract** [Objective] The study aimed to introduce a rapid and effective method that is suitable for extracting genomic DNA from animal and plant. [Method] The genomic DNAs were extracted from tender leaves of 24 peanut cultivars and from the liver, lung and kidney of white mouse through the specifically modified CTAB method. The DNAs were run on agarose gel, next detected by DNA/Protein analyzer. Finally PCR amplification was conducted to detect the quality of DNAs extracted using the modified CTAB method. [Result] The clear and orderly bands were observed in gel detection, and the values of  $OD_{260}/OD_{280}$  for DNAs extracted via modified CTAB method were between 1.77-1.83. The DNAs performed well in PCR amplification. [Conclusion] The DNAs extracted by modified CTAB method could satisfy the requirement of PCR amplification.

**Key words** Animal; Plant; DNA; Modified CTAB method

随着现代分子生物学的飞速发展, DNA 多态性遗传标记, 个体基因差异等方法已广泛应用于分子育种及克隆研究等领域, 而简便实用的 DNA 提取方法是开展上述研究工作的重要前提。关于动物和植物基因组 DNA 的提取方法国内外有很多报道<sup>[1]</sup>, 但同一方法只能较好的从动物或植物提取总 DNA。在前人报道<sup>[2-5]</sup>的基础上, 该研究对常用的 CTAB 法进行了适当修改, 获得了一种从动物和植物中均能有效提取 DNA 的方法。

### 1 材料和方法

**1.1 试验材料** 植物材料是购自山东省花生研究所的 24 种花生品种, 对其进行种植培养待其生长 30 d 后, 取其嫩叶速冻备用。动物材料小白鼠由滨州医学院烟台校区实验动物中心提供, 取其肝、肺和肾速冻后备用。

**1.2 试验方法** 通过对 24 种花生叶片 DNA 的多次提取及 ISSR 等其他相关技术的研究, 及对小白鼠肝、肺和肾组织 DNA 的多次提取及荧光光谱分析结果, 笔者总结出一种适用于动植物 DNA 提取的方法——改良 CTAB 法。其提取步骤如下: ①取 0.5 g 植物材料, 快速放入冷冻的研钵中并加入适量 PVP 研成粉末, 然后加入 1 ml CTAB 继续研至匀浆; 动物组织在研磨前需要加入 1 ml CTAB 提取缓冲液且在 0 °C 预冷的情况下先剪碎, 然后在低温下研磨成匀浆; ②迅速转入 1.5 ml 离心管中, 65 °C 浸提 20 min; ③冷却至室温, 加入 100  $\mu$ l 3 mol/L 醋酸钾 (pH = 4.8) 及 150  $\mu$ l 无水乙醇, 混匀, 4 °C 12 000 g 离心 15 min; ④取上清于另一离心管, 再加入等量的氯仿: 异戊醇 (24:1), 混匀, 4 °C 12 000 g 离心 10 min; ⑤取上清于另一离心管, 加入 1/10 体积的 3 mol/L 醋酸钠 (pH = 5.2) 和 2 倍体积的无水乙醇 (-20 °C 预冷), -40 °C, 2 h。4 °C, 12 000 r/min, 离心 15 min; ⑥弃上清, 用 75% 乙醇洗涤沉淀 2~3 次, 干燥后溶解于适量 TE, 检测 DNA 浓度、纯度和

完整性。

**1.3 PCR 扩增鉴定模板 DNA** 以提取的花生叶片的总 DNA 为模板, 采用 ISSR 引物 UBC840 (GA)<sub>8</sub>YT 为引物进行 L<sub>16</sub>(4)<sup>5</sup> 正交试验, PCR 循环参数: 94 °C 2 min; (94 °C 30 s, 52 °C 45 s, 72 °C 2 min) 40 个循环; 72 °C 10 min; 4 °C 保存。

### 2 结果与分析

**2.1 所提取 DNA 电泳结果** 将提取的动物和植物 DNA 分别在 0.8% 的琼脂糖凝胶上电泳, 以检测其纯度和质量。缓冲体系为 TBE 电泳液, 在室温以 5 V/cm 恒压电泳。电泳完毕后用 EB 染色, 用凝胶图像分析系统照相分析, 所获 DNA 电泳条带清晰、整齐均匀, 背景清晰。见图 1, 图 2。

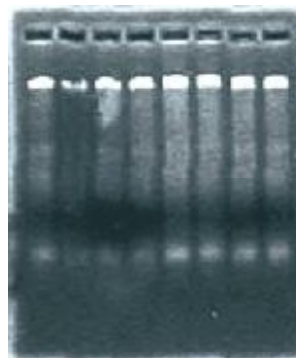


图 1 花生叶片总 DNA 提取结果



图 2 小白鼠肝的总 DNA 提取结果

Fig. 1 The electrophoresis results of genomic DNA extracted from tender leaves of peanut

Fig. 2 The electrophoresis results of genomic DNA extracted from liver of white mouse

**2.2 DNA 的吸光度检测** 取溶于 TE 的 DNA 样品, 用去离子水稀释至 1/200, 于蛋白核酸分析仪上检测其纯度, 其  $OD_{260}/OD_{280}$  值在 1.77~1.83, 表明提取 DNA 纯度较高。

**2.3 花生叶片 DNA PCR 扩增效果** PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳, 结果用紫外凝胶图像分析系统照相分析, 从图 3

**作者简介** 闫苗苗 (1981-), 女, 山东蓬莱人, 硕士, 助教, 从事遗传学方向研究。<sup>\*</sup> 通讯作者。

**收稿日期** 2008-05-12

(下转第 8558 页)

其进行修剪、施肥,做好病虫害的预测预报和防治工作。

### 参考文献

- [1] 赵玲. 几种挺水植物叶表皮细胞结构的观察[J]. 上海水产大学学报, 1995, 4(1): 35-38.
- [2] 李坊贞, 程景福, 何宗智. 莲叶片结构的光镜和扫描电镜的观察[J]. 南昌大学学报:理科版, 1993, 17(4): 91-963.
- [3] 田淑媛, 王景峰, 朗铁柱, 等. 水生维管束植物处理污水及其综合利用[J]. 城市环境与城市生态, 2000, 13(6): 54-56.
- [4] 张卫明, 陈维培. 水生植物的奇妙生态适应[J]. 植物杂志, 1989(3): 37-39.
- [5] 孙焕垌, 范玉贞, 香蒲对水体的净化效应[J]. 安徽农业科学, 2007, 35(21): 6576-6582.
- [6] DRIZO A, FROST C A, SMITH K A, et al. Phosphate and ammonium removal by constructed wetlands with horizontal subsurface flow, using shale as a substrate[J]. Water Science and Technology, 1997, 35(5): 95-102.
- [7] GERSBERG R M, ELKINS B V, LYON S R, et al. Role of aquatic plants in wastewater treatment by artificial wetlands[J]. Water Research, 1986, 20(3): 363-368.
- [8] 袁东海, 高士祥, 任全进, 等. 几种挺水植物净化生活污水总氮和总磷效果的研究[J]. 水土保持学报, 2004, 18(4): 77-92.
- [9] 贺锋, 吴振斌. 水生植物在污水处理及水质改善中的作用[J]. 植物学通报, 2003, 20(6): 641-647.
- [10] 马井泉, 周怀东, 董哲仁. 水生植物对氮和磷去除效果的实验研究[J]. 中国水利水电科学研究院学报, 2005, 3(2): 130-154.
- [11] 李琳琳, 刘娜娜, 达良俊. 鸢尾和菖蒲不同器官对富营养化水体中氮磷的积累效应[J]. 环境污染与防治, 2006, 28(12): 901-903.
- [12] 姜翠玲, 范晓秋, 章亦兵. 农田沟渠挺水植物对 N、P 的吸收及二次污染防治[J]. 中国环境科学, 2004, 4(6): 702-706.
- [13] 种云霄, 胡洪营, 钱易. 大型水生植物在水污染治理中的应用研究进展[J]. 环境污染治理技术与设备, 2003, 4(2): 36-40.
- [14] 蒋志学, 邓士谨. 环境生物学[M]. 北京: 中国环境科学出版社, 1989: 47.
- [15] 陈桂珠, 马曼杰, 蓝崇钰, 等. 香蒲植物净化塘生态系统调查研究[J]. 生态学杂志, 1990, 9(4): 11-15.
- [16] CHENG S, GROSSE W, KARRENBROCK F, et al. Efficiency of constructed wetlands in decontamination of water polluted by heavy metals[J]. Eco. Eng., 2001, 18(3): 317-325.
- [17] 唐述虞, 吴博成, 宋正达, 等. 金属矿酸性废水的湿地生态工程处理研究[J]. 中国环境科学, 1993, 13(5): 356-360.
- [18] 叶志鸿, 陈桂珠, 蓝崇钰, 等. 宽叶香蒲净化塘系统净化铅/锌矿废水效应的研究[J]. 应用生态学报, 1992, 3(2): 190-194.

(上接第 8488 页)

中可以看出,该法获得的植物基因组 DNA 完全能满足 PCR 扩增的要求。

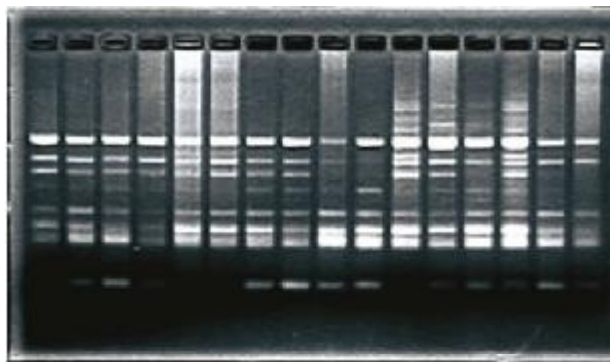


图3 引物 UBC840 (GA)<sub>8</sub>YT 正交试验的结果

Fig. 3 The results of orthogonal design for PCR amplification using primer UBC840 (GA)<sub>8</sub>YT

### 3 讨论

该方法提取的 DNA 质量较高,  $OD_{260}/OD_{280}$  值在 1.77~1.83, 适于 PCR 扩增等分子生物学研究。植物含有较多的酚类物质容易褐化, 解决褐化的方法是加入适量的聚维酮 (PVP), PVP 与多酚结合形成复合物, 从而可有效避免多酚类化合物

- [19] 李锋民, 胡洪营. 大型水生植物浸出液对藻类的化感抑制作用[J]. 中国给水排水, 2003, 12(11): 18-21.
- [20] 李锋民, 胡洪营. 芦苇抑藻化感物质的分离及其抑制蛋白核小球藻效果研究[J]. 环境科学, 2004, 25(5): 89-92.
- [21] 何地全, 叶居新. 石菖蒲克藻效应的研究[J]. 生态学报, 1999, 19(5): 754-758.
- [22] 成水平, 吴振斌, 夏宜璋. 水生植物的气体交换与输导代谢[J]. 水生生物学报, 2003, 27(4): 413-417.
- [23] FENNESSY M S, GONK J K, MITSCH V J. Macrophyte productivity and community development in created freshwater wetlands under experimental hydrological conditions[J]. Eco Eng, 1994, 3(4): 469-484.
- [24] BRIX H. Treatment of wastewater in the wetland condition[M]//HOOK DD, CRAWFORD R M, eds. Plant life in anaerobic environments. Ann Arbor: Ann Arbor Science, MT, 1978: 269-297.
- [25] 刘松岩, 何涛, 周本翔. 水生植物净化受污染水体研究进展[J]. 安徽农业科学, 2006, 34(19): 5019-5021.
- [26] GREENWAY M. Suitability of macrophyte for nutrient removal from surface flow constructed wetlands receiving secondary treated sewage effluent in Queensland, Australia[J]. Water Science and Technology, 2003, 48(2): 121-128.
- [27] 张鸿, 陈光荣. 两种人工湿地中氮、磷净化率与细菌分布关系的初步研究[J]. 华中师范大学学报, 1999, 33(4): 575-578.
- [28] 成水平, 夏宜璋. 香蒲、灯心草人工湿地的研究——II. 净化污水的空间[J]. 湖泊科学, 1997, 10(1): 62-66.
- [29] BEVEN K J, GERMANN P. Macropores and water flow in soils[J]. Wat Resour Res, 1982, 18(5): 1311-1325.
- [30] 成水平, 况琪军, 夏宜璋. 香蒲、灯心草人工湿地的研究——I. 净化污水的效果[J]. 湖泊科学, 1997, 9(4): 351-358.
- [31] 邹秀文. 国内外水生植物发展概况[J]. 中国花卉园艺, 2005(15): 10-12.
- [32] 万志刚, 顾福根, 孙丙耀. 6 种水生维管束植物对氮和磷的耐受性分析[J]. 淡水渔业, 2006, 36(4): 37-40.
- [33] 成水平, 吴振斌, 况琪军. 人工湿地植物研究[J]. 湖泊科学, 2002, 14(2): 179-184.
- [34] 叶志鸿, 蓝崇钰, 陈桂珠. 锌废水对宽叶香蒲 (Typhalatifolia) 生理生态的影响[J]. 生态科学, 1993(2): 93-100.
- [35] 高吉喜, 叶春, 杜娟. 水生植物对面源污水净化效率研究[J]. 中国环境科学, 1997, 17(3): 247-251.
- [36] SCZEPANSKA W. Alleopathy among the aquatic plants[J]. Pol Arch Hydrobiol, 1971, 18(1): 17-30.

介导的 DNA 降解<sup>[6]</sup>。从样品溶液中去蛋白质的经典方法是采用 24:1 抽提 1 次, 酚/氯仿 (1:1) 抽提 1 次, 氯仿抽提 1 次, 某些情况下还要重复几次, 这样就增加了工作量及实验成本。该法在步骤“3”中加入 3 mol/L 醋酸钾和无水乙醇, 之后加入酚/氯仿, 这既有效去除了色素、糖类及蛋白等杂质, 又缩短了提取时间。该研究提取缓冲液中的 CTAB 是一种阳离子去污剂, 能与核酸形成复合物, 这些复合物在低盐溶液中会因溶解度降低而沉淀, 而在高盐溶液中可解离, 从而使 DNA 和多糖分开, 再用乙醇沉淀 DNA 而除去 CTAB, 不妨碍所提取 DNA 的质量。该方法简便易行, 提取 DNA 的质量和数量均能满足分子生物学研究的要求。

### 参考文献

- [1] 张宁, 王凤山. DNA 提取方法研究进展[J]. 中国海洋药物杂志, 2004(2): 41-46.
- [2] 王芳. 大麦干种子 DNA 提取方法研究[J]. 安徽农业科学, 2007, 35(26): 8132-8133.
- [3] 马明, 杨克强, 郭起荣. 改良 CTAB 法提取林木树种基因组 DNA 的研究[J]. 生物技术, 2007, 17(6): 36-37.
- [4] CLARK M S, 顾红雅, 翟礼嘉. 植物分子生物学—手册实验[M]. 北京: 高等教育出版社, 1998: 5-6.
- [5] 胡维新. 分子生物学常用实验操作[M]. 长沙: 湖南科学技术出版社, 2003: 19-20.
- [6] KIM C S, LEE C H, SHIN J S, et al. Simple and rapid method for isolation of high quality genomic DNA from fruit trees and conifers using PVP[J]. Nucleic Acids Res, 1997, 25(5): 1085.