

## 2 种玉米胚乳 DNA 提取方法的比较

魏国燕<sup>1,2</sup>, 陈绪青, 张晓东<sup>2\*</sup> (1. 首都师范大学生命科学学院, 北京 100037; 2. 北京市农林科学院生物中心, 北京 100097)

**摘要** [目的] 筛选出玉米胚乳 DNA 提取的最佳方法。[方法] 采用改进的 CTAB 提取液, 以高温和常温 2 种方法提取玉米胚乳基因组 DNA, 用紫外分光光度计、0.8% 水平的琼脂糖凝胶电泳及 PCR 检测法比较了 2 种方法的提取效果。[结果] 高温法所提玉米胚乳 DNA 浓度和纯度均达到分子生物学要求, 而常温法所提 DNA 的纯度未达到分子生物学的要求。电泳检测表明, 高温法提取的 DNA 均未降解, DNA 条带整齐度较好, 而用常温法提取的 DNA 都出现了降解。PCR 检测结果表明, 用高温法提取的 DNA 作模板的 PCR 所得条带清晰, 明亮, 而用常温法提取的 DNA 作模板的 PCR 条带不清晰。最佳聚乙烯吡咯烷酮(PVPP) 的浓度确定为玉米籽粒重的 6%~10%。[结论] 高温法更适宜用作玉米胚乳 DNA 提取。

**关键词** 玉米胚乳; DNA 提取; 聚乙烯吡咯烷酮

中图分类号 S513 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)22-09408-02

### Comparison on Two methods of Extracting Maize Endosperm DNA

WEI Guo-yan et al (College of Life Science, Capital Normal University, Beijing 100037)

**Abstract** [Objective] The aim of the study was to screen out the optimum method of extracting maize endosperm DNA. [Method] The improved CTAB extract was used to extract the total genome DNA from maize endosperm with high temperature and normal temperature method. And their extracting effect were compared by the test methods of ultraviolet spectrophotometer, agarose gel electrophoresis at 0.8% level and PCR. [Result] The concn. and purity of the maize endosperm DNA extracted by high temperature method all accorded with the demand of the optimal molecular biology, while the purity of DNA extracted by normal temperature method didn't accorded with the demand of the optimal molecular. The electrophoresis test showed that there was no degradation in DNA extracted by high temperature method and DNA bands had better uniformity, while the degradation appeared in DNA extracted by normal temperature method. PCR test showed that taking DNA extracted by high temperature method as the template could get clear PCR bands and taking DNA extracted by normal temperature method as the template couldn't get clear PCR bands. The optimum concn. of PVPP was ascertained as 6%~10% of maize grain weight. [Conclusion] The high temperature method was more suitable for extracting maize endosperm DNA.

**Key words** Maize endosperm; DNA extraction method; PVPP

玉米是世界 3 大主要粮食作物之一, 目前玉米分子研究方面多采用叶片提取基因组 DNA 的方法, 对于玉米干种子要先发芽成苗后再提取叶片 DNA, 等待时间长, 而且因玉米已发芽对下一步的研究非常不利。玉米干种子中胚乳占整个籽粒总重量的 82% 左右, 是极有使用价值的部分。提取玉米胚乳基因组 DNA 进行玉米的分子杂交繁育研究, 不仅能节省时间, 而且因为没有损坏种子的胚, 不影响种子发芽及以后植株的生长繁育。因此提取玉米胚乳基因组 DNA 来进行研究, 在玉米的分子杂交繁育研究方面具有很大的优势。笔者采用高温法和常温法 2 种 DNA 胚乳提取方法, 筛选出一种适用于 PCR 技术的最佳的玉米胚乳 DNA 提取方法<sup>[1]</sup>, 并初步确定了聚乙烯吡咯烷酮(PVPP) 在玉米胚乳提取 DNA 过程的适宜浓度, 介绍如下。

### 1 材料与方 法

**1.1 材料** 玉米材料为“京科甜 115”, 由北京市农林科学院北京玉米研究中心卢柏山提供。

### 1.2 方 法

**1.2.1 2 种方法提取玉米胚乳 DNA。** 高温法和常温法中均采用改进的 CTAB 提取液。该提取液是指在常规的 CTAB 提取液中加入相当于玉米籽粒重的 6%~10% 的 PVPP。

(1) 高温法。取玉米胚乳的上部约 1/3, 装入 1.5 ml Eppendorf 管中; 离心管中加入 300  $\mu$ l 等体积(W/V) 65 预热的改进的 CTAB 提取液; 水浴 65 保温 30~60 min; 取出, 加入 100  $\mu$ l 醋酸钾, 混匀-20 下静置 10 min; 取出, 加入 100  $\mu$ l 氯仿混匀, 8 000 r/min 离心 10 min; 取上清液加入到盛有 500  $\mu$ l

冷无水乙醇的 1.5 ml 的 Eppendorf 管中; 待 DNA 絮状静止析出, 8 000 r/min 离心 10 min; 倒掉上清液, 用浓度 70% 的乙醇清洗 2~3 次; 室温干燥; 加入 100~300  $\mu$ l TE 溶解, 置于冰箱(4 ) 中备用, 储存应放入-20 的冰箱内。

(2) 常温法。取玉米胚乳上部 1/3, 放入 1.5 ml 的 Eppendorf 管中; 加入 300  $\mu$ l 常温的改进 CTAB 提取液, 混匀; 12 000 r/min 离心 2 min; 取上清液于放入 500  $\mu$ l 无水乙醇的 Eppendorf 管, 轻轻倒置 3 次, 12 000 r/min 离心 1 min; 倒掉上清液, 用浓度 70% 的乙醇洗涤 2~3 次; 加入 100~300  $\mu$ l TE 溶解, 置于冰箱(4 ) 中备用, 储存应放入-20 的冰箱内。

**1.2.2 DNA 浓度和相对纯度的测定。** 应用紫外分光光度计测定所提玉米胚乳基因组 DNA 在 OD<sub>260</sub> 和 OD<sub>280</sub> 的吸光值, 计算二者的比值<sup>[2]</sup>。同时根据公式: DNA 浓度( $\mu$ g/ml) = OD<sub>260</sub>  $\times$  50 / 1 000  $\times$  稀释倍数, 计算所提玉米胚乳基因组 DNA 的浓度。

**1.2.3 DNA 质量的检测。** 2 种提取方法所得 DNA 用 0.8% 水平的琼脂糖凝胶电泳检测, 电泳结果在紫外凝胶成像系统中观察并成像。

**1.2.4 DNA 用作 PCR 反应的模板。** 2 种提取方法所得 DNA 用于玉米 PDK 基因的 PCR 反应模板。

所用 PCR 仪: Whatman Co 的梯度 PCR 仪 Bionetra Tgradient system。

引物 1: CTG GTG ATG CCT GAT TGA CTG (位置在 4 011~4 031); 引物 2: GGG CGA TTC TGA ACT TGG TAG (位置在 4 456~4 476)。

反应体系: 总体积 25  $\mu$ l。10  $\times$  buffer 2.5  $\mu$ l, dNTP Mx (各 2.5 mmol/L each) 2  $\mu$ l, MgCl<sub>2</sub> (25 mmol/L) 2  $\mu$ l, 引物 1 (10  $\mu$ mol/l) 1  $\mu$ l, 引物 2 (10  $\mu$ mol/l) 1  $\mu$ l, Template < 1  $\mu$ g TaKaRa Taq 酶 (5 U/l) 0.2  $\mu$ l, 灭菌蒸馏水加至 25  $\mu$ l。反应条件: (35

基金项目 北京市科技新星资助项目(2007B033)。

作者简介 魏国燕(1980-), 女, 山东潍坊人, 硕士研究生, 研究方向: 植物遗传学。\* 通讯作者, E-mail: zhangxd@public3.bta.net.cn; zhangxiaodong@baaf.s.net.cn。

收稿日期 2008-05-21

个循环 94 30 s, 56 40 s, 72 40 s; 最后 72 10 min 的延伸。

## 2 结果与分析

**2.1 2 种提取方法所得 DNA 的纯度与浓度** 由表1 可知, 高温法和常温法提取玉米胚乳 DNA 浓度均高于分子生物学要求的不低于 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。高温法提取 DNA 的  $OD_{260}/OD_{280}$  比值在 1.8 ~ 2.0; 常温法提取 DNA 的  $OD_{260}/OD_{280}$  比值较大, 均大于 1.9。

表1 2 种方法提取玉米胚乳所得 DNA 测定结果

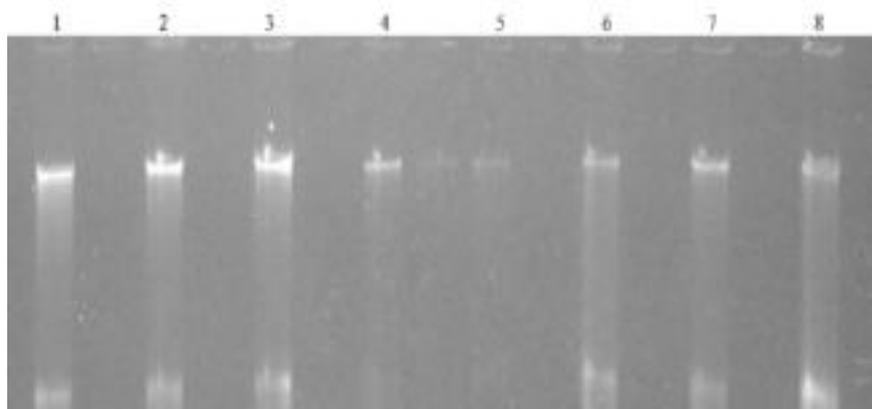
Table 1 The determination results of the extracted DNA from maize endosperm by 2 kinds of extraction methods

提取方法 Extraction method	组号 Group code	$OD_{260}$	$OD_{280}$	$OD_{260}/OD_{280}$	DNA 浓度 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DNA concentration
高温法 High temperature method	1	0.356	0.193	1.844	3 560
	2	0.388	0.212	1.832	3 880
	3	0.421	0.218	1.928	4 210
	4	0.446	0.239	1.869	4 460
	5	0.517	0.260	1.988	5 170
常温法 Normal temperature method	1	0.212	0.107	1.989	2 120
	2	0.243	0.115	2.121	2 430
	3	0.286	0.129	2.220	2 860
	4	0.299	0.137	2.180	2 990
	5	0.320	0.159	2.009	3 200

注: 稀释 2 000 倍。

Note: DNA was diluted 2 000 times.

**2.2 2 种提取方法所得 DNA 0.8% 水平琼脂糖电泳结果** 由图1 可知, 用高温法提取的 DNA 均没有降解, 且所提 DNA 条带整齐度较好; 而用常温法提取的 DNA 都出现了降解。



注: 泳道 1、2、3、7、8 对应高温法提取的 DNA 样 1 ~ 5 组, 泳道 4、5、6 对应常温法提取的 DNA 样 3 ~ 5 组。

Note: Lane 1, 2, 3, 7 and 8 stand for DNA sample 1 - 5 extracted by high temperature method respectively; Lane 4, 5 and 6 stand for DNA sample 3 - 5 extracted by normal temperature method respectively.

图1 不同方法提取玉米所得 DNA

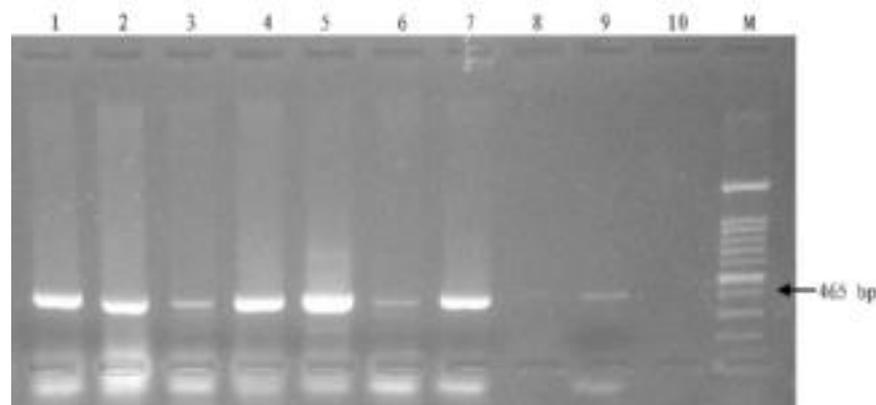
Fig.1 DNA extracted by different methods

**2.3 2 种提取方法所得 DNA 用作 PCR 反应模板的结果** 由图2 可知, 用高温法提取的 DNA 作模板的 PCR 所得条带清晰、明亮; 而用常温法提取的 DNA 作模板的 PCR 条带不甚清晰, 甚至模糊不清, 影响到 PCR 反应的准确性。

## 3 结论与讨论

**3.1 2 种提取方法的比较** 该试验分别用高温法和常温法 2 种提取方法来提取玉米胚乳基因组 DNA, 紫外分光光度计测定 DNA 的浓度和纯度, 结果表明, 高温法更适宜用作玉米胚乳 DNA 的提取。

(1) 高温法所提 DNA 浓度和纯度均达到分子生物学要求, 常温法所提 DNA 的纯度未达到分子生物学的要求。



注: M 为全式金公司 100 bp 的 ladder。泳道 1、2、4、5、7 对应高温法的 DNA 样 1 ~ 5 组, 泳道 3、6、8、9 对应常温法的 DNA 样 2 ~ 5 组; 泳道 10 为空白对照。

Note: M is the ladder with the length of 100 bp from Quanshijin Company. Lane 1, 2, 4, 5 and 7 stand for DNA sample 1 - 5 extracted by high temperature method; Lane 3, 6, 8 and 9 stand for DNA sample 2 - 5 extracted by normal temperature method. Lane 10 is blank control.

图2 不同方法提取玉米所得 DNA 用作 PCR 模板的检测结果

Fig.2 The detection results of taking maize DNA extracted by different methods as PCR template

(2) 高温法所提 DNA 均未降解, DNA 条带整齐度较好。而常温法所提 DNA 条带弱, 微呈现降解, 其原因可能是这种方法所提 DNA 样不能保存较长时间, 而试验所提 DNA 不是提取后立即进行电泳检测。常温法抽提时间较短, 步骤少, 可能是所提 DNA 出现降解的原因。

(3) PCR 检测结果表明, 高温法提取的 DNA 作模板时, PCR 条带清晰、明亮, 结果清楚明确, 适宜用作 PCR 反应; 而常温法提取的 DNA 作模板时, PCR 条带不够清晰, 对 PCR 结果造成干扰, 不适宜用作 PCR 反应。

**3.2 PVPP 在提取玉米胚乳 DNA 过程中的作用及用量** 玉米胚乳中的淀粉和粗蛋白的含量高达 82%<sup>[3]</sup>, 淀粉和粗蛋白强大的黏附性对 DNA 的提取很不利, 因此在提取玉米胚乳 DNA 的过程中, 有效地去除淀粉和粗蛋白的干扰至关重要。该试验中所用的是改进的 CTAB 提取液 (即在常规 CTAB 提取液中加入一定量的 PVPP 的方法)。PVPP 是无毒、无刺激性、安全稳定的聚合物, 具有很强的选择吸附能力, 通过羰基与花色苷、黄酮类多羟基衍生物等多酚类物质可形成氢键络合物, 从而具有较强的吸附能力。目前已广泛用于生物医药、日用化工和食品等工业领域。常用作饮料的澄清剂, 药物的崩解剂, 分散体系的增稠剂和絮凝剂、吸附剂等<sup>[4]</sup>。试验中确定最佳 PVPP 浓度为玉米籽粒重的 6% ~ 10%, 若浓度过低, PVPP 吸附力不够, 提取的 DNA 黏性大, 对 PCR 结果影响较大; 浓度过高, PVPP 过量, 提取的 DNA 中有大量残留的 PVPP, 提取的 DNA 不易溶解, PCR 反应几乎不能进行。

## 参考文献

- [1] 徐其放, 朱苏文, 常弘. 玉米种子基因组 DNA 提取及 RAPD 分析[J]. 中山大学学报: 自然科学版, 2003, 42(5): 79 - 81.
- [2] 李桂玲, 李欢庆. 两种玉米 DNA 提取方法的比较[J]. 河南科学, 2005, 23(5): 686 - 688.
- [3] 周显青. 玉米胚乳的特性及其应用[J]. 粮食与饲料工业, 1998(10): 40 - 41.
- [4] 陆健, 林小荣, 李未, 等. 聚乙烯吡咯烷酮吸附多酚物质性质研究及其在无甲醛酿造啤酒工艺中的应用[J]. 食品科学, 2007, 28(3): 125 - 130.