

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*, 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} 值为 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 法提取的动物和植物总 DNA 满足开展 PCR 扩增的要求。

关键词 动物; 植物; 总 DNA 提取; 改良 CTAB 法

中图分类号 S188 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)24-10362-01

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

YAN Mao-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 by 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 by 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; Extraction of genomic DNA; Modified CTAB method

随着现代分子生物学的飞速发展, DNA 多态性遗传标记及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 的提取方法在国内外有很多报道^[1], 但同一方法通常只能较好地从动物或植物提取总 DNA。在前人报道^[2-5]的基础上, 该研究对常用的 CTAB 法进行了适当修改, 获得了 1 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 1 种适用于动植物 DNA 提取的方法——改良 CTAB 法。其提取步骤如下: 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在加入 1 ml CTAB 提取缓冲液且 0℃ 预冷的情况下先剪碎, 然后在低温下研磨成匀浆; 迅速转入 1.5 ml 离心管中, 65℃ 浸提 20 min; 冷却至室温, 加入 100 μ l 3 mol/L 醋酸钾 (pH=4.8) 及 150 μ l 无水乙醇, 混匀, 4℃ 12 000 g 离心 15 min; 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℃ 12 000 g 离心 10 min; 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℃ 预冷), 置于 -40℃ 2 h。4℃ 12 000 r/min, 离心 15 min; 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)₈YT 为引物进行 $L_{16}(4)^5$ 正交试验, PCR 循环参数: 94℃ 2 min; (94℃ 30 s, 52℃ 45 s, 72℃ 2 min) 40 个循环; 72℃ 10 min; 4℃ 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 (图 1, 图 2)。

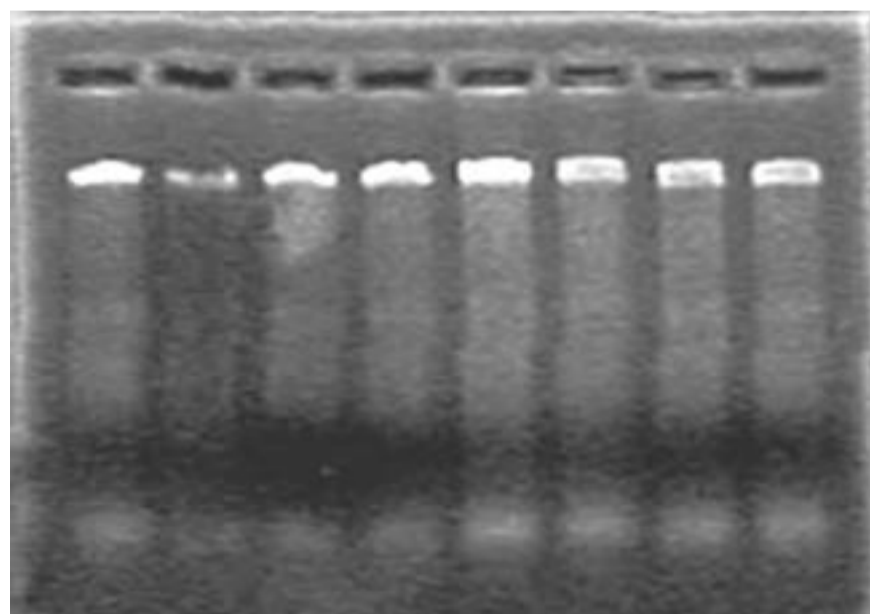


图 1 花生叶片总 DNA 提取结果

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

2.2 DNA 的吸光度检测 取溶于 TE 的 2 种总 DNA, 用去离子水稀释至 1/200, 使用蛋白核酸分析仪检测其纯度, 其 OD_{260}/OD_{280} 值为 1.77 ~ 1.83, 表明该法提取的 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, 用紫外凝胶图像分析系统照相分析, 从图 3 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。

理上特殊需求的结果^[5]。王启瑞等2006 年对巨缘蜻亚科的3 种昆虫不同组织酯酶同工酶进行了研究,认为同种昆虫不同组织酯酶酶谱存在差异,可能与适应特殊生理功能有关^[9]。

对于半翅目蜻科昆虫的酯酶同工酶,目前研究较少。笔者对不同地域斑须蜻的酯酶同工酶以及半翅目蜻亚科3 种蜻象的酯酶同工酶进行了比较研究,结果表明,同种斑须蜻在不同地域,EST 同工酶显示了一定的差异,分析认为,这种差异可能和它们要适应各自生存的地理环境有关,不同的地理环境使生物个体的一些相应的基因得以表达,以应对不同环境的特殊需求,但这种地域间的差异小于种间差异。另外,3 种蜻象的电泳结果显示,3 种蜻象电泳酶谱明显不同,都有各自的特征酶谱,证明种间差异明显存在,这和以往的试验结论相一致。该试验将3 种蜻象的电泳酶带 R_f 值进行了聚类分析,结果表明,绿蜻和斑须蜻的关系较红尾碧蜻更近,而如果在形态上划分的话,绿蜻和红尾碧蜻无论在形态大小还是体色上都十分相似,很难区分,这显示了传统形态分类的不足和局限性以及生物化学研究手段运用于昆虫分类的优越性。由此可见,酯酶同工酶电泳技术可以运用于蜻

科昆虫的鉴别和各物种亲缘关系以及分类地位的探索,可将酯酶同工酶技术、数值分类法与传统形态分类方法相结合,为半翅目蜻科以及其他各类群昆虫的系统学研究提供更科学丰富的分类依据。

参考文献

- [1] 郭晓霞,郑哲民,于广志. 酯酶同工酶多态性及其在昆虫分类学中的价值[J]. 昆虫知识,2000,37(6):371-374.
- [2] 李绍文,孟玉萍,张宗炳,等. 膜翅目昆虫酯酶同工酶的比较研究[J]. 昆虫学报,1987,30(3):266-270.
- [3] 郑哲民,黄原. 八种蝗虫酯酶同工酶的比较研究[J]. 陕西师范大学学报,1986(1):52-59.
- [4] 张迎春,郑哲民,杨建雄,等. 五种瓢虫酯酶同工酶的比较研究及其在分类上的应用(鞘翅目:瓢虫科)[J]. 昆虫分类学报,1999,21(2):123-127.
- [5] 郭晓霞,郑哲民. 菜粉蝶不同发育期酯酶同工酶的比较研究[J]. 昆虫学报,2002,45(3):401-403.
- [6] 马春燕,郑哲民. 四种蜻科昆虫酯酶同工酶的比较研究(半翅目:蜻科)[J]. 昆虫分类学报,2000,22(4):257-261.
- [7] 马春燕,郑哲民. 四种蜻科昆虫酯酶同工酶的比较研究(半翅目:蜻科)[J]. 陕西师范大学学报:自然科学版,2001,29(4):94-97.
- [8] 黄原. 几种蝗虫酯酶同工酶的组织性别和个体变异的研究[C]. 昆虫学研究 第一辑. 西安:陕西师范大学出版社,1995.
- [9] 王启瑞,朱刚利,郑哲民. 秦巴山区巨缘蜻亚科三种昆虫同工酶的初步研究(半翅目:缘蜻科)[J]. 四川动物,2006,25(3):463-467.

3 讨论

DNA 的提取是分子生物学研究的重要技术环节之一,高质量的 DNA 是分子实验重复性和可靠性的保证。该方法提取的 DNA 质量较高,OD₂₆₀/OD₂₈₀ 值为 1.7~1.83,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介导的 DNA 降解^[6]。从样品溶液中去掉蛋白质经典方法是采用 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。该法在提取步骤“ ”中加入 3 ml/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,也缩短了提取时间。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 MS, 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.

(上接第10362 页)

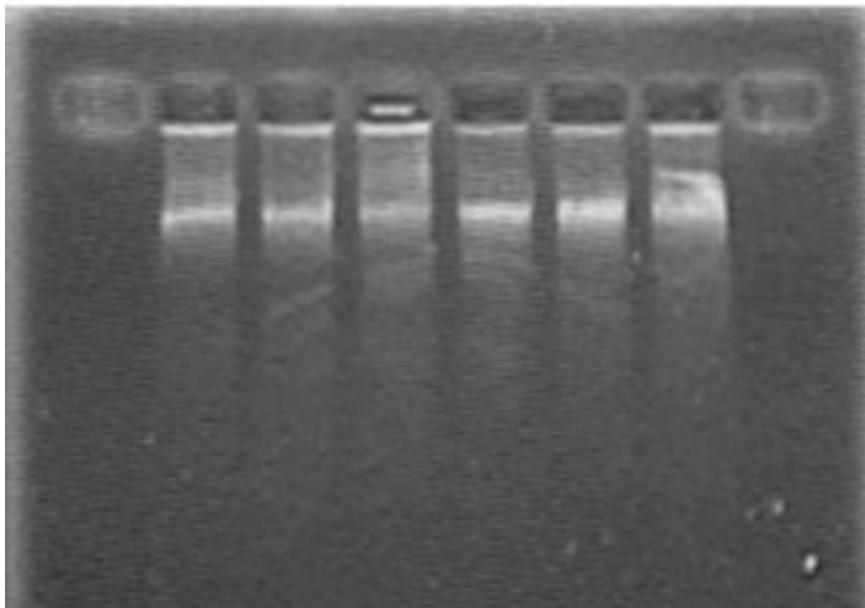


图2 小白鼠肝的总 DNA 提取结果

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

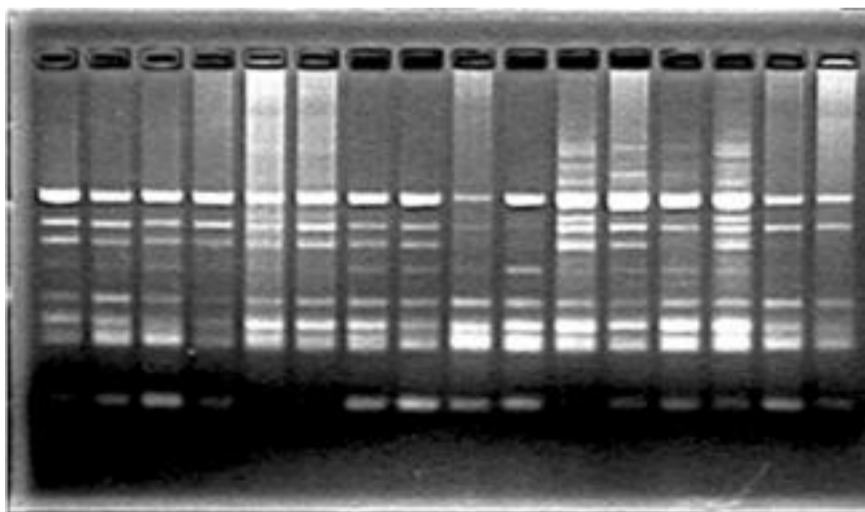


图3 引物 UBC810(GA)₈YT 正交试验结果

Fig.3 The results of orthogonal design for PCR amplification using primer UBC810(GA)₈YT