

基于改进 CTAB 法提取空间诱变柱花草总 DNA 研究

严琳玲^{1,2}, 赵琼玲^{1,2}, 白昌军^{2*}, 刘国道²

(1. 海南大学儋州校区农学院, 海南儋州 571737; 2. 中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所, 海南儋州 573717)

摘要 [目的]用改进 CTAB 法提取空间诱变柱花草的总 DNA。[方法]以柱花草幼苗叶片为材料, 采用改良 CTAB 法提取柱花草总 DNA。[结果]所提的 DNA 凝胶条带清晰, 无拖尾现象, 浓度在 406.6 ~ 857.3 ng/ μ l, OD_{260}/OD_{230} 检测值在 1.96 ~ 2.18, OD_{260}/OD_{280} 检测值在 1.76 ~ 1.98。所提 DNA 适用于 ISSR-PCR。[结论]该方法具有简便、快速、高效的特点。

关键词 柱花草; 空间诱变; CTAB; DNA; ISSR-PCR

中图分类号 S542⁺.9 **文献标识码** A **文章编号** 0517 - 6611 (2009)08 - 03465 - 03

Extraction of DNA from the Space Mutation in Stylo by Improved CTAB Method

YAN Lin-ling et al (College of Agronomy, Hainan University, Danzhou, Hainan 571737)

Abstract [Objective] The research aimed to extract the genomic DNA of *Stylosanthes* spp. by the improved method of CTAB-DNA isolation. [Method] The improved method of CTAB-DNA isolation was used to extract genomic DNA from the seedling leaves of the space mutation in *Stylosanthes* spp. [Result] High quality total DNA was isolated, and the concentration was 406.6 - 857.3 ng/ μ l. The values of OD_{260}/OD_{230} of each sample were between 1.96 and 2.18, the values of OD_{260}/OD_{280} were between 1.76 and 1.98. The DNA extracted by CTAB can be used for ISSR-PCR. [Conclusion] The improved method of CTAB-DNA isolation had characteristics of simple, rapid and effective.

Key words *Stylosanthes* spp.; Space mutation; CTAB; DNA; ISSR-PCR

柱花草 (*Stylosanthes* spp.) 是热带、亚热带地区重要的豆科牧草和饲料植物资源, 主要用于草地良种化改造和林、果、草生态工程建设, 还在水土流失治理和退耕还林(草)中发挥重要作用。但柱花草易感染炭疽病, 这对其产量造成了很大的影响。为此, 笔者通过空间诱变选育出综合性状优良的柱花草新品种(系), 旨在为南方农区种草养畜提供新的优良柱花草品种, 以确保柱花草产业的可持续发展。

目前, 空间诱变柱花草育种的研究工作主要是从田间观察、形态学、细胞学、生理生化等方面开展, 还没有从分子遗传水平进行研究的报道。为此, 笔者希望能从分子方面证明空间诱变可以产生炭疽病抗性基因的变异。

DNA 的分离提取是进行植物分子生物学研究工作的基础, DNA 样品质量是分子生物学试验成败的关键因素之一。近年来, 对小麦、玉米、水稻、大豆、棉花等细胞中 DNA 的提取已有许多成熟技术方案^[1-2], 通过这些方法均能从少量样品组织中提取高产量的 DNA。CTAB 法和 SDS 法是提取植物 DNA 的 2 种主要方法^[3]。改良的 CTAB 法可以简便又快速地提取到高质量的 DNA, 且 DNA 完全可以进行 PCR 及各种分子标记。为此, 笔者基于改进的 CTAB 法对空间诱变柱花草总 DNA 的提取进行了研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 研究对象。利用空间辐射育种技术于 1996 年 10 月 20 日 ~ 1996 年 11 月 4 日对热研 2 号柱花草种子进行空间诱变处理, 回收种植, 并在幼苗期接种柱花草炭疽病原菌。多代选择至 SP5 代 (85 个株系), 进行株系比较试验。该试验的材料即为此 85 个株系及亲本 (86 号)。

1.1.2 仪器。高压灭菌锅 (HIRAYMA), 微波炉 (格兰仕), 雪花制冰机 (GRANT), 高速冷冻离心机 (Eppendorf), 水平电

泳槽 (Biometra), 核酸蛋白含量测定仪 (Eppendorf), PCR 扩增仪 (Biometra), Uvidoc 凝胶成像系统 (EEC), 移液器 (Eppendorf)。

1.1.3 试剂。CTAB, Tris, 购自上海生工生物工程有限公司; β -巯基乙醇、PVP、EDTA、琼脂糖, 购自 BBI 公司; 100 bp DNA Marker、200 bp DNA Marker、DL2000 DNA Marker、6 \times Loading Buffer, 购自大连宝生物工程有限公司; 2 \times Taq PCR Master Mix、RNase A, 购自北京天根生化科技有限公司; Tris 平衡酚, 购自天津灏洋生物制品有限公司; Gold View, 购自赛百盛; ISSR 引物参照 British Columbia 大学公布的通用引物序列, 由英骏生物技术有限公司合成; 其他生化试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 试剂的配制。

(1) Tris-HCl (1 mol/L, pH 值 8.0): 称取 12.11 g Tris, 溶于约 80 ml ddH₂O 中, 用 HCl 调 pH 值至 8.0 (注意: 先用 pH 试纸将 pH 值调至 8.5 左右, 再用 pH 计调至 8.0), 最后用 ddH₂O 定容至 100 ml。

(2) EDTA (0.5 mol/L, pH 值 8.0): 称取 37.25 g EDTA-Na₂ · H₂O, 溶于约 180 ml ddH₂O 中 (可加热或磁力搅拌助溶), 用 NaOH 调 pH 值至 8.0 (注意: 先用 pH 试纸将 pH 值调至 7.5 左右, 再用 pH 计调至 8.0), 最后用 ddH₂O 定容至 200 ml。

(3) EDTA (0.2 mol/L, pH 值 8.0): 称取 14.90 g EDTA-Na₂ · H₂O, 溶于约 180 ml ddH₂O 中 (可加热或磁力搅拌助溶), 用 NaOH 调 pH 值至 8.0 (注意: 先用 pH 试纸将 pH 值调至 7.5 左右, 再用 pH 计调至 8.0), 最后用 ddH₂O 定容至 200 ml。

(4) CTAB-free 缓冲液: 将 1.50 g NaCl、10 ml EDTA (0.5 mol/L, pH 值 8.0)、20 ml Tris-HCl (1 mol/L, pH 值 8.0) 混匀, 灭菌, 再加入 1 ml β -巯基乙醇和 2.00 g PVP, 用 ddH₂O 定容至 100 ml。

(5) 2 \times CTAB 缓冲液: 将 2.00 g CTAB、8.20 g NaCl、25 ml EDTA (0.2 mol/L, pH 值 8.0)、1 ml Tris-HCl (1 mol/L, pH

基金项目 农业部“973”项目 (2007CB108903)。

作者简介 严琳玲 (1983 -), 女, 福建三明人, 硕士研究生, 研究方向: 牧草育种。* 通讯作者, E-mail: baichangjun@scuta.edu.cn。

收稿日期 2009-01-04

值 8.0) 混匀, 灭菌, 加入 2 ml β -巯基乙醇和 3.00 g PVP, 用 ddH₂O 定容至 100 ml, 灭菌。

(6) 苯酚/氯仿/异戊醇: 将 Tris 平衡酚与等体积的氯仿/异戊醇 (24:1) 混匀, 移入棕色玻璃瓶中, 4 °C 保存。

(7) 低盐 TE 溶液: 将 200 μ l Tris-HCl (1 mol/L, pH 值 8.0)、100 μ l EDTA (0.2 mol/L, pH 值 8.0) 混匀, 用 ddH₂O 定容至 20 ml, 灭菌。

(8) 5 × TBE 电泳缓冲液: 将 5.40 g Tris、2.76 g H₃BO₃、2 ml EDTA (0.5 mol/L, pH 值 8.0) 混匀, 用 ddH₂O 定容至 100 ml, 常温保存, 用时用 ddH₂O 稀释 10 倍。

1.2.2 DNA 提取方法。

(1) 取嫩叶约 0.5 g, 置于液氮中, 加入少量 PVP, 充分研磨, 成粉末状, 将粉末状材料迅速转入预冷的 2 ml 离心管, 加入 800 μ l 预冷的 CTAB-free 缓冲液, 并迅速混匀, 置于冰上 10 min。

(2) 4 °C、8 000 r/min 离心 5 min, 弃去上清液, 加入 600 μ l 65 °C 预热的 2 × CTAB 提取缓冲液, 充分混匀, 置于 65 °C 水浴中 30 min, 每隔 15 min 轻摇 1 次, 使样品充分悬浮在提取缓冲液中。

(3) 取出离心管, 待冷却后加入等体积的苯酚/氯仿/异戊醇 (25:24:1), 轻轻颠倒离心管, 混匀, 4 °C、12 000 r/min 离心 6 min。

(4) 将上清液转入另一洁净的 2 ml 离心管中, 加入等体积的氯仿/异戊醇 (24:1), 混匀, 4 °C、12 000 r/min 离心 6 min。

(5) 取上清液于另一清洁的 1.5 ml 离心管中, 加入等体积冰冷的异丙醇, 混匀, 置于 4 °C 沉淀 30 min。

(6) 轻轻挑出絮状沉淀, 用 70% 乙醇洗涤沉淀 2~3 次, 风干。

(7) 加入 100 μ l 低盐 TE 溶解, 再加入 1 μ l 10 mg/L 的 RNase A, 4 °C 暂时保存待测。

1.2.3 DNA 含量纯度测定。

1.2.3.1 琼脂糖电泳检测。取 5 μ l DNA 样品和 1 μ l 6 ×

Loading Buffer 混匀, 于 0.8% 的琼脂糖 (Gold View 染色) 上, 90 V 恒压电泳 30 min, 凝胶成像系统观察结果, 拍照。

1.2.3.2 紫外吸收检测。取 2 μ l DNA 样品, 稀释 50 倍, 以低盐 TE 为对照, 由核酸蛋白分析仪测定出 230、260、280 nm 处的光吸收值, 以 OD_{260}/OD_{230} 、 OD_{260}/OD_{280} 比值判断样品的大致纯度。样品的浓度 (μ g/ μ l) = 在 260 nm 的光吸收值 × 核酸稀释倍数 × 50/1000^[4]。每个样品测定 3 次, 取平均值。

1.2.3.3 PCR 扩增检测。在 15 μ l 总反应体系中, 含 1 μ l 50 ng/ μ l DNA, 1 μ l 10 nmol/ μ l 引物 (ISSR 809 引物), 10 μ l 2 × Taq PCR Master Mix, 3 μ l H₂O。PCR 扩增条件: 94 °C 2 min; 94 °C 30 s, 退火 1 min, 72 °C 2 min, 38 个循环; 72 °C 7 min, 4 °C 保存。

2 结果与分析

2.1 改进 CTAB 法提取的空间诱变柱花草总 DNA 浓度的测定结果 从理论上说, 纯样品 OD_{260}/OD_{280} 紫外消光值应为 1.8, 大于 1.9 时表明有 RNA 污染, 小于 1.6 时表明样品中存在蛋白质或酚污染; OD_{260}/OD_{230} 值应大于 2.0, 小于 2.0 时表明溶液中有残存盐和小分子杂质, 如核苷酸、氨基酸、酚等^[5]。核酸蛋白含量测定仪检测的结果显示: OD_{260}/OD_{230} 值的平均值在 1.96~2.18, OD_{260}/OD_{280} 值在 1.76~1.98。由此可说明, 所提取的 DNA 样品较纯。

大量文献证明, DNA 浓度在 50 ng/ μ l 左右时, 电泳效果都比较理想。该试验提取的 DNA 样品浓度在 406.6~857.3 ng/ μ l。这表明所提取的 DNA 浓度大大超过该理想浓度, 应该在用时适当稀释。

2.2 改进 CTAB 法提取的空间诱变柱花草总 DNA 的电泳检测结果 从图 1 可以看出, 所提取的 DNA 质量较好, 带型清晰, 在凝胶电泳图的底部基本没有 DNA 或 RNA, DNA 降解少。

2.3 改进 CTAB 法提取的空间诱变柱花草总 DNA 的 ISSR 分析结果 从图 2 可以看出, 提取的 DNA 都能扩增出清晰的谱带, 并且带纹一致, 扩增片段大小范围在 100~1 600 bp 之间, 能满足 ISSR 分析的要求。

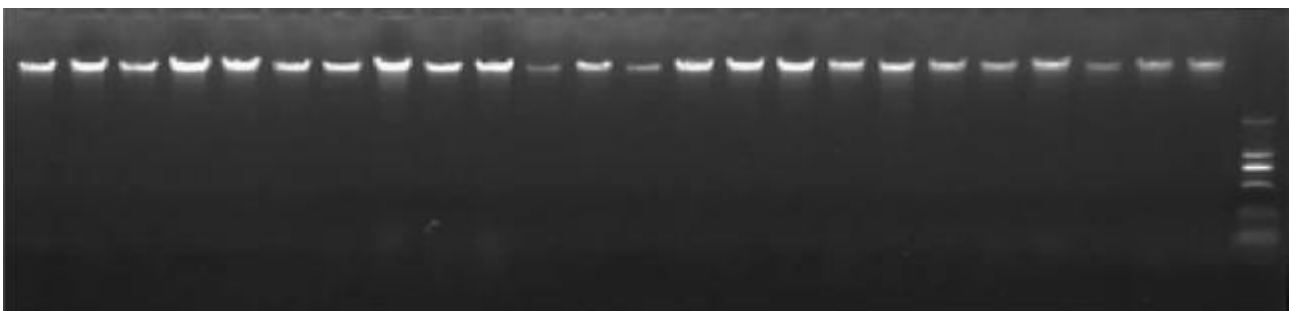


图 1 部分空间诱变柱花草基因组 DNA 的电泳分析结果

Fig.1 The electrophoresis results of part of space mutation in *Stylosanthes* spp. genomic DNA agarose

3 结论与讨论

(1) 叶片研磨后组织破损, 各种成分极易氧化变质, 在各种酶的作用下, 这种变化更加迅速。液氮一旦挥发完毕, 叶片干磨, 样品就会氧化变成褐色, 这是与酚类物质结合的结果。样品一旦变褐, 即使采用去污剂也很难将其除掉。为了防止样品在处理过程中变褐, 研磨过程一定要快并且保持有液态氮。

(2) 试验中发现, DNA 在抽提过程中极易发生褐化, 褐化的原因可能与柱花草含有多糖和酚类物质, 酚类物质被氧化成醌类物质, 并溶解在溶液中或与蛋白质结合所致。为了解决褐化的问题, 在提取缓冲液中加入一定的稳定剂和抗氧化剂, 抑制多酚氧化酶和细胞色素酶的活性, 阻碍酚氧化成醌, 起到除酚的作用^[6-8], 这样才能很好地防止褐化。该试验发现, 在提取缓冲液中单独加入 PVP 或 β -巯基乙醇都不

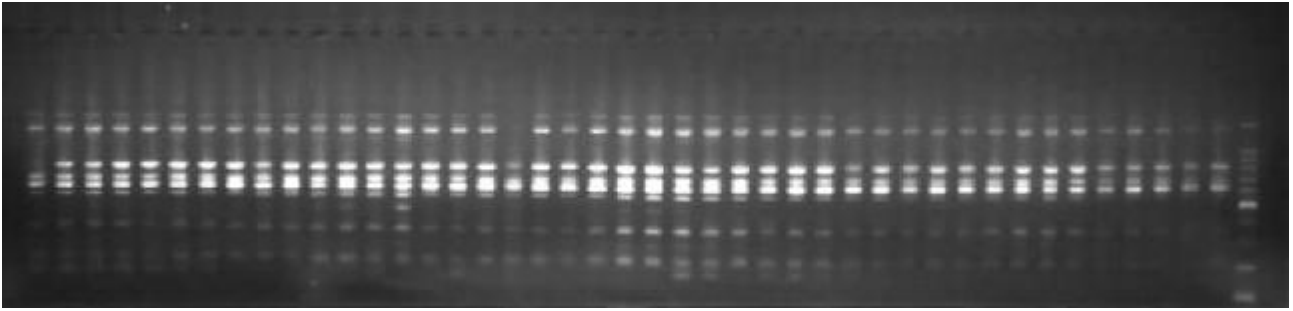


图 2 ISSR 引物对部分柱花草种质 DNA 的 PCR 扩增结果

Fig. 2 PCR amplification results by ISSR primers using DNAs from partial *Stylosanthes* germplasm

能很好地防止褐化, 但将二者同时加入提取缓冲液中, 防止褐化的效果较好。

(3) CTAB 和 SDS 都可以破坏细胞膜释放细胞内的物质。此外, CTAB 可与核酸形成复合物, 有利于将 DNA 与变性蛋白质及多糖分开, SDS 可与蛋白质和多糖形成复合物, 与 DNA 分开^[9-10]。因此, CTAB 法比较适用于多酚类植物基因组 DNA 的提取, 而 SDS 法比较适用于高蛋白和多糖类植物基因组的提取^[11]。

(4) 一般认为, 在裂解过程中, 65℃ 水浴时间可以超过 1 h, 甚至过夜。王家保等认为温育时间过长对 DNA 质量影响较大, 很多色素和酚类物质会严重影响 DNA 质量^[4]。该试验结果表明, 30 min 的裂解时间足够让 DNA 释放出来。

(5) 在提取经异丙醇沉淀的 DNA 时, 没有使用离心方法, 而是用玻璃棒挑出, 这样可以减少杂质和 DNA 一起沉淀形成污染而影响 DNA 质量。

(6) 在 DNA 提取过程中, 要尽可能地简化操作步骤, 因为中间步骤越多, DNA 损失越大, 得率就越小^[12]。该试验只用了 7 个步骤就提取到了纯度较高的 DNA, 且耗时较短, 提

取 1 个 DNA 样品仅需要 2 h 左右, 这大大节省了工作时间。

参考文献

- [1] 楼巧军, 陈亮, 罗利军. 三种水稻基因组 DNA 快速提取方法的比较[J]. 分子植物育种, 2005, 3 (5): 749-752.
- [2] 孙鑫, 崔洪志, 胡宝忠, 等. SDS-CTAB 结合法提取棉花总 DNA [J]. 生物技术通报, 2004 (5): 45-47.
- [3] 沙红, 王燕飞, 曲延英, 等. 一种适于甜菜 RAPD 分析的 DNA 快速提取方法[J]. 新疆农业科学, 2005, 42 (3): 162-164.
- [4] 王家保, 吴跃进, 余增亮. 用于 PCR 的大豆 DNA 快速提取改良方法[J]. 河南农业科学, 2006 (5): 35-38.
- [5] 黄绍辉, 方炎明. 改进的 SDS-CTAB 法提取濒危植物连香树总 DNA [J]. 武汉植物学研究, 2007, 25 (1): 98-101.
- [6] 秦国夫. 杨树同工酶样品提取液的研究[J]. 林业科技通讯, 1989 (9): 23-25.
- [7] 刘小勇, 田素忠, 秦国夫, 等. 提取植物和微生物 DNA 的 SDS-CTAB 改进法[J]. 北京林业大学学报, 1997, 19 (3): 100-103.
- [8] 吴臻, 余小平, 王喆之. 几种提取枣和酸枣 DNA 用于 RAPD 分析的方法比较[J]. 西北植物学报, 2003, 23 (4): 645-647.
- [9] 赵姝华, 王富德, 张世幸. 提取、纯化植物 DNA 方法的比较[J]. 国外农学-杂粮作物, 1998, 18 (2): 35-38.
- [10] 邹利波, 黄升谋. 月季总 DNA 的提取方法的比较研究[J]. 安徽农学通报, 2007, 13 (1): 57-58.
- [11] 孙志栋, 陈惠云. 多酚类植物基因组 DNA 提取方法的研究[C]. 北京: 全国蔬菜分子育种研讨会, 2004: 285-291.
- [12] 陈延惠, 张四普, 胡青霞, 等. 不同方法对石榴叶片 DNA 提取效果的影响[J]. 河南农业大学学报, 2005, 39 (2): 182-186.

(上接第 3464 页)

1 790 位点为 G 时 *ApaI* 酶有酶切点)、同时出现 149 bp 和 123 bp 的 2 条带表示 1 790 位点为 G/C 的杂合体 (三河马和锡尼河马) 是 AB 型。

2.3 2 种限制性内切酶的酶切结果比较 试验结果表明, *HhaI* 酶和 *ApaI* 酶电泳图中所用的个体顺序为相互对应, 采用 2 种引物和 2 种内切酶所得结果完全一致。

3 讨论

采用 mismatch PCR-RFLP 检测对马 *MxA* 基因的第 12 外显子的多态性研究发现, 该区域存在 AA、AB 和 BB 型 3 个基因型; 位于 cDNA 序列第 1790 位点的碱基发生变异 (由 G→C), 引起了 *MxA* 蛋白编码区第 562 氨基酸由色氨酸 (Trp) 改变成半胱氨酸 (Cys) 的变异。采用错配引物 (创造酶切位点) 扩增限制性片断长度多态性 (mismatch PCR-RFLP) 方法, 从基因组 DNA 中检测出其多态性, 说明采用错配引物 PCR-RFLP 方法检测马 *MxA* 基因第 12 外显子 3' 端的多态性, 其

结果准确、方法可靠。以上结果是在认为马 *MxA* 基因第 12 外显子 3' 端处该位点碱基突变没有品种特异性基础上得出的。该研究结果显示了不同品种马 *MxA* 蛋白基因核苷酸序列在该位点的多态性特征, 为进一步研究马 *MxA* 基因奠定了基础。

参考文献

- [1] 盛伟华, 贡海蓉, 杨吉成, 等. IFN α 2bIF 诱导 *MxA* 蛋白的表达及其抗病毒活性研究[J]. 苏州医学院学报, 2000, 20 (6): 55-57.
- [2] 尹彦涛, 夏平安, 崔保安, 等. *MxA* 抗病毒蛋白的研究概况[J]. 中国畜牧兽医, 2008, 35 (1): 87-89.
- [3] PELTEKIAN C, GORDIEN E, GARREAU F, et al. Human *MxA* protein participates to the interferon-related inhibition of hepatitis B virus replication in female transgenic mice[J]. J Hepatol, 2005, 43 (6): 965-972.
- [4] KO J H, JIN H K, ATSUSHI A, et al. Polymorphisms and the differential antiviral activity of the chicken *Mx* gene[J]. Genome Res, 2002, 12 (4): 595-601.
- [5] 菊林花, 赖双英, 张文广, 等. 马 *MxA* 基因多态性的研究[J]. 内蒙古畜牧与饲料, 2005 (1): 34-36.
- [6] 赵春江, 李宁, 邓学梅. 应用创造酶切位点法检测单碱基突变[J]. 遗传, 2003, 25 (3): 327-329.