

# 利用改良 CTAB 法提取淮山叶片高质量 DNA

李月仙, 黄东益\*, 黄小龙, 周鑫, 程文杰, 罗欣 (海南大学农学院, 海南儋州 571737)

**摘要** [目的]为淮山的分子生物学研究奠定基础。[方法]以淮山嫩叶为试材,用改良 CTAB 法提取其中的 DNA,并通过琼脂糖凝胶电泳和 ISSR-PCR 扩增对所得 DNA 的质量和浓度进行检测,考察该方法对 DNA 的提取效果。[结果]所提取 DNA 的分子量与  $\lambda$ DNA 相近,各泳道均出现 1 条清晰的 DNA 条带,且条带的完整性较好,无蛋白质和 RNA 污染,无 DNA 降解现象;以所提 DNA 为模板进行 ISSR-PCR 扩增,可获得稳定的扩增条带。[结论]改良 CTAB 法简单高效,所得 DNA 质量较高,RNA 消化彻底,DNA 无明显降解,进行 ISSR 分析时,条带清晰,多态性较好。

**关键词** 淮山;基因组 DNA;改良 CTAB 法

**中图分类号** S561.9 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2009)22-10413-02

## Extraction of High Quality DNA from Leaves of *Dioscorea opposita* Thunb. with Modified CTAB Method

LI Yue-xian et al (Agricultural College of Hainan University, Danzhou, Hainan 571737)

**Abstract** [Objective] The study was to provide the basis for molecular biology research on *Dioscorea opposita* Thunb. [Method] With young leaves of *D. opposita* as the materials, their DNA was extracted with modified CTAB method. The quality and concn. of the extracted DNA were detected by agarose gel electrophoresis and ISSR-PCR amplification. The extracting effect of modified CTAB method on DNA was studied. [Result] The molecular weight of the extracted DNA was similar with that of  $\lambda$ DNA. There was 1 clear DNA strip in each lane, and the integrity of the strip was better without protein and RNA pollution and DNA degradation phenomenon. The stable amplified strips could be obtained through ISSR-PCR amplification with template of the extracted DNA. [Conclusion] The modified CTAB method was simple with high efficient, and the quality of DNA extracted by this method was higher, the digestion of RNA was complete, and there were no obvious degradation phenomenon of DNA, and the strip was clear with better polymorphism in ISSR analysis.

**Key words** *Dioscorea opposita* Thunb.; Genome DNA; Modified CTAB method

淮山(*Dioscorea opposita* Thunb.)又名薯蓣,俗称山药,是薯蓣科薯蓣属一种缠绕性藤本植物,也是我国著名的“四大怀药”之一。淮山在我国分布广泛,种类繁多,历代本草及地方志中均有记载。淮山可分药用与食用 2 类,药用淮山多指家园种植的薯蓣及与其相近的野淮山,食用淮山称为薯。药用淮山以河南、山西交界处分布较多,食用淮山主要分布在南方诸省。

淮山含纤维和色素较多,且蛋白质、酚类物质及多糖等次生物质含量较高<sup>[1-2]</sup>,如何除去淮山药材中的多酚和多糖杂质<sup>[3]</sup>,目前还没有方便实用的有效方法。为此,笔者以改良 CTAB 法<sup>[4]</sup>提取淮山基因组 DNA,以期开展淮山的分子生物学研究奠定基础。

## 1 材料与方 法

**1.1 材料与试剂** 淮山取自海南大学儋州校区农学院薯蓣种植圃。CTAB、Tris、EDTA 和 RNase A 购于上海英骏公司,ISSR 引物由上海生工合成。其他试剂均为国产分析纯。

## 1.2 方 法

### 1.2.1 基因组 DNA 提取。

(1)取 200 mg 嫩叶于液氮中研磨,并加入 0.1 g PVP 干粉。

(2)将糊状物转入 2 ml 离心管中,加入约 480  $\mu$ l 预热至 65  $^{\circ}$ C 的 2  $\times$  CTAB 提取液,上下颠倒使之充分混匀,65  $^{\circ}$ C 温浴 0.5~1.0 h,期间不断混匀。

(3)加入等体积的苯酚/氯仿/异戊醇(25:24:1),缓慢翻转离心管使内含物充分混匀,4  $^{\circ}$ C,10 000 r/min 离心 15 min。

(4)取上清转入另一离心管中,加入等体积的苯酚/氯

仿/异戊醇(25:24:1),缓慢翻转离心管使内含物充分混匀,4  $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 15 min。

(5)加入等体积的氯仿/异戊醇(24:1),缓慢翻转离心管使内含物充分混匀,4  $^{\circ}$ C、10 000 r/min 离心 15 min,取上清转入另一离心管。

(6)加入 5 mol/L NaAc 使其终浓度为 1~2 mol/L,然后加入 2 倍体积的无水乙醇轻摇后置于一 20  $^{\circ}$ C 过夜。

(7)挑出 DNA 转入 1.5 ml 离心管中,用 70%乙醇洗涤 2 次。

(8)DNA 风干后加入适量 TE 缓冲液,于 4  $^{\circ}$ C 冰箱中溶解。

### 1.2.2 DNA 的纯化。

(1)加入终浓度为 1  $\mu$ g/ml 的 RNaseA 酶,于 37  $^{\circ}$ C 水浴 1 h。

(2)100  $\mu$ l DNA 中加入 400  $\mu$ l CTAB 提取液,并加入 5 mol/L NaCl,使样品中 NaCl 的终浓度为 2 mol/L,充分混匀。

(3)加入等体积的苯酚/氯仿/异戊醇(25:24:1),缓慢翻转离心管使内含物充分混匀,4  $^{\circ}$ C、10 000 r/min 离心 15 min,取出上清转入另一离心管。

(4)加入等体积的氯仿/异戊醇(24:1),缓慢翻转离心管使内含物充分混匀,4  $^{\circ}$ C、10 000 r/min 离心 15 min,取出上清转入另一离心管。

(5)重复步骤(3),直至分层无白色物质为止,加入无水乙醇沉淀 DNA,用 70%乙醇洗涤沉淀 2 次,DNA 风干后加入适量 TE 缓冲液。

### 1.2.3 DNA 质量检测。

**1.2.3.1 琼脂糖凝胶电泳检测。**取 2  $\mu$ l 基因组 DNA,与溴酚蓝上样缓冲液混匀后上样于 1.0% 的琼脂糖凝胶中,电泳缓冲液为 0.5  $\times$  TBE,在 95 V 电压下电泳 40 min。电泳结束后用凝胶成像分析系统(Tanon 4100)观察 DNA 条带,并拍照。

**1.2.3.2 PCR 扩增及电泳检测。**将得到的基因组 DNA 稀释至 20 ng/ $\mu$ l 进行 PCR 扩增。25  $\mu$ l PCR 反应体系为 50 ng/ $\mu$ l DNA 模板 2  $\mu$ l,100  $\mu$ g/ml 引物 0.5  $\mu$ l,2  $\times$  Taq PCR

**基金项目** 高等学校博士学科点专项科研基金(00805650004)。

**作者简介** 李月仙(1981-),女,云南腾冲人,硕士研究生,研究方向:淮山种质资源的评价及组织培养。\*通讯作者。

**收稿日期** 2009-04-10

MasterMix 12.5  $\mu\text{l}$ , 用水补足 25  $\mu\text{l}$ ; ISSR-PCR 扩增程序: 94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min, 94  $^{\circ}\text{C}$  变性 45 s, 50~55  $^{\circ}\text{C}$  退火 45 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 90 s, 循环 45 次, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min, 4  $^{\circ}\text{C}$  保存备用。

将 PCR 扩增产物与 6  $\times$  Loading buffer 混匀, 取 10  $\mu\text{l}$  上样于 2% 的琼脂糖凝胶中, 电泳缓冲液为 0.5  $\times$  TBE, 在 90 V 电压下电泳 90 min。电泳结束后用凝胶成像系统观察 PCR

产物的扩增条带, 并拍照。

## 2 结果与分析

**2.1 琼脂糖凝胶电泳检测结果** 由图 1 可知, 所提取的 DNA 分子量与  $\lambda$ DNA 相近, 每泳道均出现 1 条清晰的 DNA 条带, 且条带的完整性较好, 无蛋白质、无 RNA 污染、无降解现象。

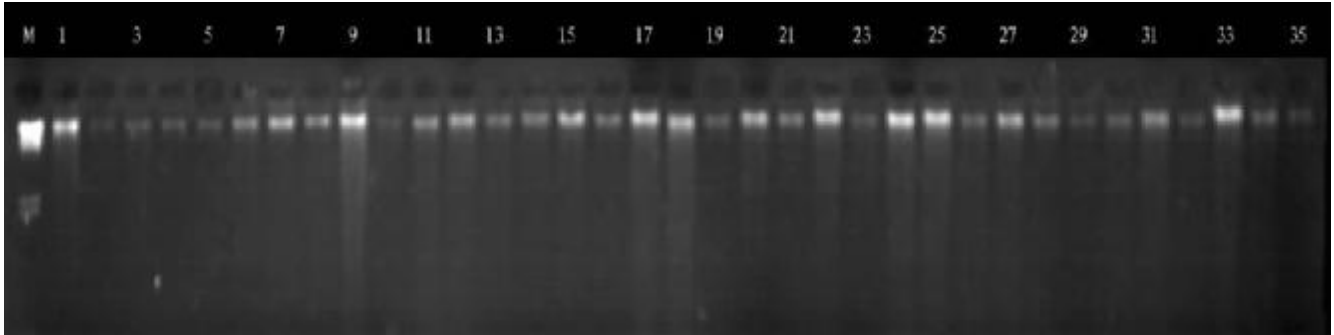


图 1 淮山总 DNA 琼脂糖凝胶电泳图谱 (M: 50 ng/ $\mu\text{l}$ )

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis map of *Dioscorea oppositifolia* Thunb. total DNA

**2.2 ISSR-PCR 检测结果** 由图 2 可知, 以改良 CTAB 法提取的淮山基因组 DNA 为模板进行 ISSR-PCR 扩增可获得

稳定的扩增谱带, 说明此方法获得的淮山基因组 DNA 适于进行 DNA 的多态性研究。

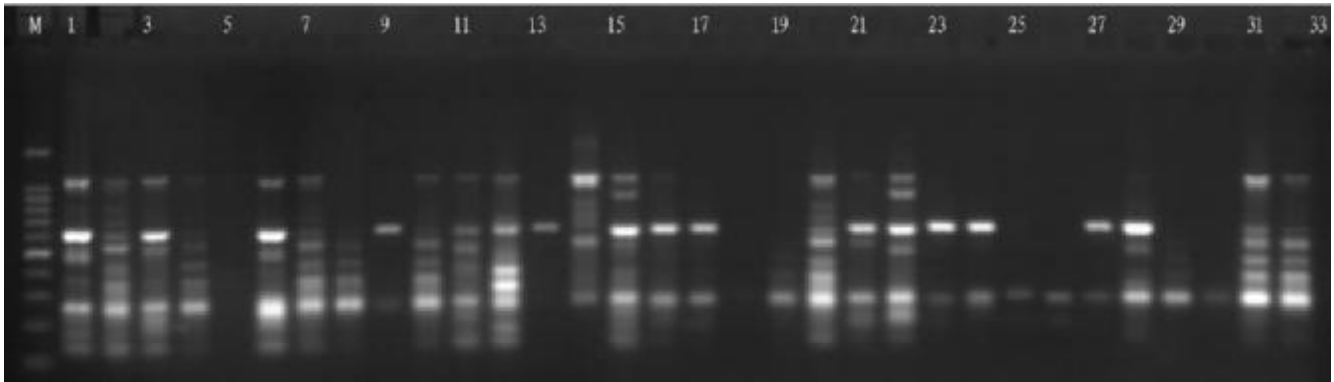


图 2 33 份淮山种质的 ISSR-PCR 扩增图谱 (UBC-807)

Fig. 2 ISSR-PCR amplification map of 33 *Dioscorea oppositifolia* Thunb. germplasm

## 3 讨论

高质量基因组 DNA 是植物分子生物学研究的前提和基础, 不同研究目的对 DNA 产量和浓度的要求不同。多酚类化合物和多糖对 DNA 质量的影响是植物分子生物学研究中最常遇到而又必须解决的问题, 多糖可抑制多种酶的活性, 被多糖污染的总 DNA 样品无法用于分子生物学研究<sup>[5]</sup>, 许多学者对不同植物基因组 DNA 的提取方法进行了相应的研究<sup>[6-8]</sup>。由于淮山组织中含有大量的次生物质, 因此从淮山组织中获得高质量 DNA 的关键在于去除其中的多酚、多糖、蛋白质等次生物质。该试验采用 CTAB 法的具体操作过程与 Doyle 等<sup>[4]</sup>的方法基本一致, 但在细节上还存在一些差异, 具体如下:

(1) DNA 提取过程中多酚类物质的去除多采用 2 种手段, 一是加入酚类结合剂, 如 PVP (聚乙烯吡咯烷酮)、PVPP (聚乙烯聚吡咯烷酮)、PEG (聚乙二醇); 另一种是加入抗氧化剂, 亚硫酸钠、二硫苏糖醇、巯基乙醇、半胱氨酸等。该试验结果表明, 增加抽提次数可有效去除 DNA 中的蛋白质和酚类物质, 且试验过程中未出现酚类物质的褐化现象。该试验用无水乙醇沉淀 DNA 时, 沉淀时间较短。因为 DNA 在异丙醇、乙醇盐溶液中的沉淀速度大于色素、多糖和酚类等物

质, 所以用有机溶剂沉淀 DNA 的时间宜短, 以尽可能减少共沉淀<sup>[9]</sup>。用 RNase A 在 37  $^{\circ}\text{C}$  条件下水浴 1.5 h 可有效去除 DNA 中的 RNA。沉淀 DNA 时, 不经过离心, 直接用剪过的枪头轻轻缠绕钩出 DNA, 可有效减少 DNA 中蛋白质和其他杂质。改良 CTAB 法简化了 DNA 的提取过程, 减少了个别试剂对操作者的伤害。经检验, 所提取的淮山基因组 DNA 质量较好, 适用于 PCR 扩增及分子生物学的后续研究。

该试验在样品中加少量 PVP 的目的是去除淮山植物叶片组织中的多酚类物质, 因为 PVP 为高分子量物质, 可与多酚结合形成一种不溶性络合物, 有效去除 DNA 中的酚类物质。

(2) 为有效去除 DNA 中的蛋白质和多糖物质, 第 1 次抽提时用 65  $^{\circ}\text{C}$  预热的 2  $\times$  CTAB 进行抽提, 同时纯化前先加入 RNA 酶消化 RNA, 再用饱和酚/氯仿/异戊醇 (25: 24: 1) 抽提 1 次, 然后用氯仿/异戊醇抽提。

另外, 该试验发现以下因素也会影响 DNA 的质量: ①取材。对于多糖含量高、氧化快的植物, 以刚抽出嫩叶为材料提取 DNA 效果最好, 材料容易研磨, 且提取的 DNA 质量较高。②磨样和裂解时间。首先, 样品应尽量磨细, 以便抽提

(下转第 10419 页)

状况。

研究表明,平板上的菌落随着 AHV 浓度的升高,数目逐渐减少,AHV 浓度为 4.5、6.0、7.5 g/L 的平板,菌落多且大;AHV 浓度为 9.0 g/L 的平板,菌落数骤然减少且小;AHV 浓度为 10.5 g/L 的平板,只有几个小菌落。菌落在 AHV 浓度 9.0 g/L 的平板上不能正常生长,诱变时 AHV 平板浓度比 9.0 g/L 稍高点,所以确定 UV 诱变中 AHV 的浓度为 10.5 g/L。

**2.3.2 DES 最佳处理剂量的选择。**UV-6 菌株再经 DES 分别处理 0、15、30、40、60 min 后致死率结果见表 4。

表 4 DES 处理的致死率

Table 4 Lethality rate of DES treatment

处理时间//min Treatment time	稀释度 Dilution rate	平均菌落个数//个/ml Average bacterial colony number	致死率//% Lethality rate
0	10 <sup>4</sup>	36	0
10	10 <sup>4</sup>	22	38.6
20	10 <sup>4</sup>	13	63.1
30	10 <sup>4</sup>	8	78.3
40	10 <sup>4</sup>	5	84.9
50	10 <sup>4</sup>	3	92.5
60	10 <sup>4</sup>	2	95.2

由表 4 可看出,当用 DES 处理 30 min 时致死率达到 78.3%,因此 30 min 为最佳处理时间。

**2.3.3 UV + DES 复合处理后突变株的选择。**将用 DES 处理 30 min 后的菌液,直接涂布于 AHV 抗性培养基上,30 ℃ 培养 24 h 后,从中选出生长良好的菌落 61 株,接入斜面,然后摇瓶发酵培养测定 L-苏氨酸含量,从中选取 4 株产 L-苏氨酸量高于 UV-3 的突变株,命名为 UV-3-DES;对提高产量的菌株进行传代试验,传至第 10 代时,做摇瓶发酵试验,测定 L-苏氨酸产量结果见表 5。

表 5 复筛结果

Table 5 The result of secondary screening

菌株 Strain	第 1 代 L-苏氨酸量//g/L First generation threonine quantity	传至 10 代 L-苏氨酸量//g/L Tenth generation threonine quantity
	UV-3-DES-1	0.29
UV-3-DES-2	0.32	0.31
UV-3-DES-3	0.41	0.21
UV-3-DES-4	0.36	0.25

(上接第 10414 页)

时样品和抽提液充分混匀、充分裂解。用液氮研磨样品时,应不断添加液氮并迅速研磨,使淮山叶片细胞的细胞壁完全破碎,同时使蛋白质和酶变性,使 DNA 酶变性失活,阻止 DNA 降解。其次,加入 65 ℃ 预热的 CTAB 裂解液后,也应相应增加水浴时间,该试验将水浴时间增加至 1 h,可使样品充分裂解。

#### 参考文献

- [1] 唐世蓉,庞自洁. 山药的营养成分分析[J]. 中药通报,1987,12(4):36.
- [2] 杭悦宇. 国产日本薯蓣主要化学成分含量和药理实验测定[J]. 植物资源与环境,1996,5(2):5-8.
- [3] 郭宝林,李家实,阎玉凝. 中药材 DNA 分子标记研究的技术问题 I. 植物药基因组 DNA 的提取[J]. 中草药,2000,31(12):951-954.
- [4] DOYLE J J, DICKSON E E. Preservation of plant samples for DNA restriction endonuclease analysis[J]. Taxon,1987,36:715-722.

由表 5 可看出,4 株突变株的 L-苏氨酸产量较 UV-3(稳定遗传化)的稍有提高,但幅度不大,进行传代试验至第 10 代时,摇瓶发酵测定 L-苏氨酸产量,结果上述 4 株菌株均能稳定产酸,其中 UV-3-DES-2 的 L-苏氨酸产量为 0.31 g/L,比 UV-3 的 L-苏氨酸产量提高 4.0%。

#### 3 讨论

微生物菌种质量的优劣对发酵工业有极其重要的影响。笔者最初筛选到的菌株由于是野生菌株,故产 L-苏氨酸量较低,仅为 0.18 g/L,经过 UV 诱变和 UV + DES 复合诱变选育出 AHV 抗性菌株后其 L-苏氨酸产量达 0.31 g/L,比出发菌株高出 72.2%。该试验通过诱变和筛选的交替,连续反复选育提高了菌株的 L-苏氨酸产量。但随着反复诱变的发生,会发生饱和现象,若要进一步提高产量,困难会增多,笔者的试验也出现了这种状况。现阶段在 AHV 抗性的基础上选育赖氨酸结构类似物 AEC 抗性的菌株,以期可以解除苏氨酸和赖氨酸对天冬氨酸激酶的反馈抑制;接着在 AHV 和 AEC 抗性的基础上选育蛋氨酸和异亮氨酸缺陷型,以切断目的产物合成途径的分支代谢途径,进一步提高 L-苏氨酸的产量<sup>[6]</sup>。同时可以为构建 L-苏氨酸基因工程菌提供具有 AHV 抗性的天冬氨酸激酶和高丝氨酸脱氢酶的基因片段。

UV 诱变处理,方法简便,效果好,危险性又小,因而被人们广泛采用。DES 是一种较强的诱变剂,致死率很高,笔者采用 UV + DES 复合诱变,诱变效果并不十分理想,其 L-苏氨酸产量仅比单纯用紫外线诱变的菌株高出 4.0%,这可能是由于野生菌株对任何诱变剂都很敏感,易诱发突变,而经多次诱变处理所选得的高产菌株对诱变剂反应显得迟钝,导致复合诱变效果不十分理想<sup>[7]</sup>。

#### 参考文献

- [1] 贾冬舒. 苏氨酸市场现状及发展前景[J]. 饲料广角,2006(1):28-29.
- [2] 吴蓉,张建国. L-Thr 产生菌株的选育[J]. 氨基酸杂志,1991(4):16-19.
- [3] 诸葛健,王正祥. 工业微生物实验技术手册[M]. 北京:中国轻工业出版社,1994:335-364.
- [4] 杜连祥,路福平. 微生物学实验技术[M]. 北京:中国轻工业出版社,2005:174-184.
- [5] 伯杰氏细菌分类手册[M]. 8 版. 北京:科学出版社,1985:830-855.
- [6] 蔡慧农. L-苏氨酸产生菌的改良[J]. 厦门水产学院学报,1991,13(1):63-69.
- [7] 章名春. 工业微生物诱变育种[M]. 北京:科学出版社,1984:163-173.
- [8] 彭锐,宋洪元,李泉森,等. 石斛总 DNA 的提取及鉴定[J]. 中国中药杂志,2003,28(12):11-29.
- [9] GREEN M J, THOMPSON D A, MACKENZIE D J. Easy and efficient DNA extraction from woody plants for the detection of phyto2plasmas by polymerase chain reaction[J]. Plant Disease,1999,83:482-485.
- [10] KIM C S, LEE C H, SHIN J S, et al. A simple and rapid method for isolation of high quality genomic DNA from fruit tree and conifers using PVP[J]. Nucleic Acids Res,1997,25:1085-1086.
- [11] 黄晓丹,张云贵,应铁进. 高质量植物基因组 DNA 的提取[J]. 植物生理学通讯,2006,42(2):311-314.
- [12] 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术与原理[M]. 2 版. 北京:高等教育出版社,1993.
- [13] YAN M M, WEI G C, PAN X H, et al. A method suitable for extracting genomic DNA from animal and plant -- Modified CTAB method[J]. Agricultural Science & Technology,2008,9(2):39-41.
- [14] 程华,周蓬蓬,余龙江,等. 濒危植物岩黄莲叶片中基因组 DNA 的提取及分析[J]. 时珍国医国药,2006,17(9):1699-1700.