

# 一种适于提取复烤烟叶 DNA 的方法

任如意<sup>1</sup>, 魏继承<sup>1</sup>, 刘瑞林<sup>2</sup>

(1. 牡丹江师范学院生物系 157012 2. 黑龙江省林副特产研究所)

**摘要:**以改良 CTAB 法提取复烤烟叶 DNA, 经 U-3000 紫外分光光度计测定, 所获 DNA 呈典型的吸收曲线, 且 OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 在 1.7~1.9 之间, 对烟草叶绿体不编码序列进行 PCR 扩增, 获得理想条带。

**关键词:**提取; 复烤烟叶; DNA

**Abstract:** The DNA is extracted from curl tobacco leaf with modified CTAB method and make a typical absorption curve, which datum of OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> is between 1.7-1.9 tested by U-3000 UV-spectrophotometer. The ideal band is obtained in subsequent polymerase chain reaction(PCR) aimed at the sequence of chloroplast non-coding protein

**Key words:** extraction; curl tobacco leaf; DNA

## 0 前言

近年来, 转基因产品日益增多, 不断地进行推广和引入市场, 由此引发的公众对转基因产品的接受程度的问题成为当今的热门话题之一。烟草作为一种特殊的消费品, 也是转基因的模式植物, 在我国有广泛的种植。为杜绝出口烟叶中的转基因成分, 对复烤烟叶进行出口前检测是必不可少的工作环节。目前国际上认同的烟草转基因检测方法是建立在聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 基础上的分子生物学检测, 复烤烟叶 DNA 的提取是该工作的重要组成部分。

由于复烤烟叶属干制品, 且经过不同程度的高温处理, DNA 降解严重。为此, 采用适合的 DNA 提取方法, 确保复烤烟叶 DNA 的产量和纯度, 满足 PCR 工作需要, 乃是检测工作的

前提。本文介绍的改良 CTAB 法, 是实践中摸索出的一种成熟的复烤烟叶 DNA 提取方法, 现报告如下。

## 1 材料与试剂

### 1.1 试验材料

NC89、龙江 851、K326 三个品种的复烤烟叶, 由黑龙江省烟草科研所提供。

### 1.2 试剂

0.8 × CTAB D. 8% CTAB(w/v), 100mmol · L<sup>-1</sup> Tris(pH8.0), 20mmol · L<sup>-1</sup> EDTA(pH8.0), 1.4mol · L<sup>-1</sup> NaCl, 1% PVP; 10% CTAB; 10% CTAB(w/v), 0.7mol · L<sup>-1</sup> NaCl; CTAB 沉淀 Buffer: 1% CTAB, 50mmol · L<sup>-1</sup> Tris(pH8.0), 10mmol · L<sup>-1</sup> EDTA(pH8.0);

表2 供试品种(系)花期调查

供试品种	花粉授粉 (月. 日)		初花期 (月. 日)		盛花期 (月. 日)		终花期 (月. 日)		花粉量	红金秋盛花时 各品种开花状况
	1998	1999	1998	1999	1998	1999	1998	1999		
红金秋	4.28	5.14	4.27	5.17	4.30	5.19	5.2	5.22	多	
友谊 91	4.28	5.14	4.27	5.16	4.28	5.18	5.3	5.22	多	盛花期
苹果梨	4.28	5.14	4.27	5.17	4.30	5.20	5.3	5.22	多	盛花期
牡育 11-11	4.26	5.13	4.23	5.14	4.25	5.18	4.28	5.20	多	盛花末期
牡育 1-7	4.25	5.12	4.22	5.12	4.23	5.18	4.27	5.17	多	终花期
牡育 15-2	4.27		4.25		4.28		5.2		中	盛花期
金香水	4.25	5.12	4.23	5.12	4.25	5.14	4.28	5.18	多	盛花末期
脆香	4.23	5.13	4.23	5.13	4.25	5.14	4.28	5.18	中	终花期
晚香	4.25	5.13	4.22	5.13	4.23	5.14	4.26	5.18	多	终花期

## 2.3 人工授粉试验

从上述调查看, 一些品种(系)金香水、晚香、牡育 1-7 等亲和力好, 花粉量大, 但与红金秋花期不一致, 能否通过液体授粉达到更理想的效果, 我们进行了试验, 结果见表 3。金香水和晚香的花粉液为红金秋授粉, 坐果率比自然坐果率分别提高 8.4% 和 14.1%, 说明取花粉进行人工授粉可弥补自然配

表3 红金秋液体授粉坐果率调查

	花朵数	坐果数	坐果率(%)
金香水花粉	254	75	29.5
晚香花粉	270	95	35.2
对照(清水)	128	27	21.1

置授粉树花期相遇时间不足的现象, 保证红金秋正常结果。

## 3 结果与讨论

红金秋自花不实, 必须配置授粉树, 从试验结果看出, 红金秋接受不同品种(系)的花粉能力强, 授粉组合坐果率高于自然授粉坐果率的有友谊 91、苹果梨、脆香、牡育 15-2、金香水等。从花期相遇上看, 苹果梨、牡育 15-2、友谊 91 最为理想, 与红金秋盛花期相遇; 金香水、牡育 11-11 为盛花末期; 脆香、晚香为终花期。但苹果梨、友谊 91 抗寒力弱, 因此, 在黑龙江省第一积温区以苹果香和友谊 91 为较好授粉组, 第二、三积温区以牡育 15-2、金香水为较好授粉组合, 脆香、晚香次之。为了使红金秋得到最佳的授粉效果, 应进行人工授粉。

高盐 TE Buffer:  $10\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  Tris (pH8.0),  $1\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  EDTA (pH8.0),  $1\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  NaCl ;  
 Taq 酶 (附  $10 \times$  PCR Buffer), Biostar 产品 ;  
 dNTPs 天象人生物工程公司 ;  
 引物 1  $5' - \text{CgA AAT Cgg Tag ACG CTA Cg} - 3'$  ,  
 引物 2  $5' - \text{ggg gAT AgA ggg ACT TgA AC} - 3'$  ,  
 DL2000 DNA Marker 由大连宝生物工程公司合成。

## 2 实验方法

### 2.1 复烤烟叶 DNA 的提取 (改良 CTAB 法)

干烟叶称重,液氮研磨,转入 Eppendorf 管中,按  $1.5\mu\text{l}/\text{mg}$  的量加入适量的  $0.8 \times$  CTAB Buffer,  $65^\circ\text{C}$  水浴  $10 \sim 20\text{min}$ , 加入等体积的氯仿:异戊醇 (24:1) 混匀后,  $11000\text{rpm}$  离心  $5\text{min}$ , 取上清加入  $1/10$  体积的  $65^\circ\text{C}$  (预热的)  $10\%$  CTAB, 再加入等体积的氯仿:异戊醇 (24:1) 混匀,  $15000\text{rpm}$  离心  $5\text{min}$ , 取上清加入等体积的 CTAB 沉淀 Buffer, 轻轻摇匀,  $15000\text{rpm}$  离心  $5\text{min}$ , 弃上清。加入高盐 TE Buffer,  $65^\circ\text{C}$  水浴  $10 \sim 15\text{min}$ , 加入二倍体积的冷无水乙醇或  $2/3$  体积的异丙醇,  $-20^\circ\text{C}$   $20 \sim 30\text{min}$  沉淀 DNA,  $15000\text{rpm}$  离心  $10\text{min}$ , 去上清, 用乙醇清洗, 抽干, 溶于纯水中待用。

### 2.2 DNA 质量鉴定

#### 2.2.1 OD 值检测

#### 2.2.2 叶绿体不编码序列的 PCR 检测

反应体系:

$10 \times$ PCR Buffer	$5\mu\text{l}$	$10\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ dNTPs	$0.5\mu\text{l}$
引物 1 (4OD/ml)	$0.5\mu\text{l}$	引物 2 (4OD/ml)	$0.5\mu\text{l}$
模板 DNA	$100\text{ng}$	Taq 酶	$1\text{U}$

加去离子水补至总体积为  $50\mu\text{l}$

反应程序:

预变性	$95^\circ\text{C}$	$5\text{min}$	变性	$95^\circ\text{C}$	$30\text{s}$
复性	$62^\circ\text{C}$	$1\text{min}$	延伸	$72^\circ\text{C}$	$1\text{min}30\text{s}$
35 次循环			后保温	$72^\circ\text{C}$	

反应结束后, 取  $10\mu\text{l}$  扩增产物, 于  $1\%$  琼脂糖凝胶电泳 (内加 EB) 结果于紫外下观察, 记录。

## 3 实验结果

### 3.1 DNA 紫外吸收曲线及 OD 值测定

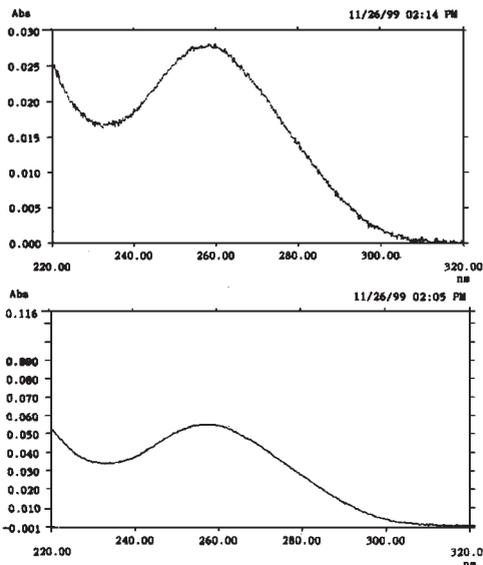


图 1

所提取的样品 DNA 经 U-3000 紫外分光光度计测定,  $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$  均在  $1.7 \sim 1.9$  之间, 纯度较高, 浓度均在  $100\text{ng}/\mu\text{l}$  以上, 产量相对 PCR 而言应属充分。图 1 示所提取三个样品 DNA 在  $220 \sim 320\text{nm}$  波长之间的扫描图, 均呈现为典型的 DNA 吸收曲线。

### 3.2 PCR 扩增结果

选择 NC89 样品 DNA 为代表, 针对叶绿体不编码序列 ( $550\text{bp}$ ) 进行 PCR 扩增, 取  $10\mu\text{l}$  扩增产物经  $1\%$  琼脂糖凝胶 (内加 EB) 电泳, 结果如下:

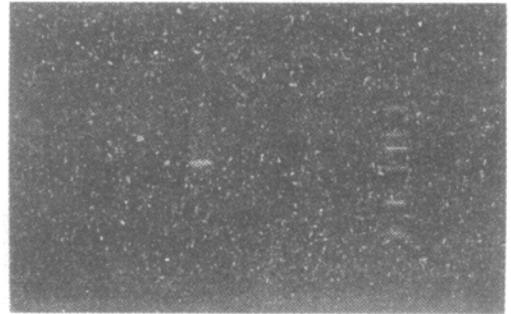


图 2

末泳道为 DL2000 DNA Marker, 片段长度由上向下依次为  $2\text{kb}$ ,  $1\text{kb}$ ,  $750\text{bp}$ ,  $500\text{bp}$ ,  $300\text{bp}$ ,  $150\text{bp}$ 。

由上图结果可见, 目标序列扩增比较充分, 对所提取 DNA 质量的可靠性给予了肯定。

## 4 讨论——样品类型对提取 DNA 质量的影响

出于对 DNA 产量及基因组完整性的考虑, 鲜组织是 DNA 提取的首选材料, 所获 DNA 纯度主要受以下因素影响: RNA、蛋白和多糖的去除程度, 酚试剂残余, 叶绿素干扰。

由于客观因素的制约, 本实验中只能以干制品为材料。因经受不同程度的高温处理, DNA 产量不高, 降解严重, 基因组完整性不好。然而, 经这样处理的材料, 蛋白和多糖也受到极度破坏, 并且所提取 DNA 基本上无叶绿素干扰, 这是实验中所获 DNA 纯度较高的一个重要原因。

为尽可能提高 DNA 产量, 对材料进行充分研磨是极其重要的操作。实验中在此基础上所获 DNA 均在  $100\text{ng}/\mu\text{l}$  以上。  $100\text{ng}$  DNA 对于烟草基因组而言, 可以保证单一序列拷贝数在  $10^4$  数量级, 完全能够满足理想扩增的需要, 实验中 PCR 结果证实了这一点。

## 5 结论

通过对样品 DNA 进行波长扫描分析和叶绿体不编码序列扩增结果两项指标鉴定, 认为所采用的方法——改良 CTAB 法对于复烤烟叶 DNA 的提取充分可靠。