

一种改良的 CTAB 法提取马尾松基因组 DNA^{*}

陈碧华

(福建省林业科学研究院 福州 350012)

摘要 以马尾松针叶为试验材料,利用改良的 CTAB 法抽提基因组 DNA,其浓度和纯度符合 PCR 实验的要求,经凝胶电泳检测,DNA 纯化效果好。

关键词 改良 CTAB 法 马尾松 针叶 基因组 DNA

中图分类号: Q527⁺.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-4427(2009)02-0026-04

The Genomic DNA Extraction of *Pinus massoniana* Using an Improved CTAB Method

Chen Bihua

(Fujian Academy of Forestry Sciences, Fuzhou Fujian, 350012)

Abstract The needles of *Pinus massoniana* were collected to extract the genomic DNA of *P. massoniana* using an improved CTAB method. Its concentration and purity satisfied the request of PCR experiments. The gel electrophoresis demonstrated the good effect of DNA purification.

Key words improved CTAB method, *Pinus massoniana*, needle, genomic DNA

马尾松(*Pinus massoniana* Lamb)是我国南方地区低山丘陵荒山造林的先锋树种,具有生长快,适应性广,造林更新容易,营林成本低,耐干旱、瘠薄等优良特性。其松脂产量高,木材纤维长,是造纸和人造纤维的重要工业用材树种,在我国林业生产中占有十分重要的地位。

马尾松分子水平上的研究目前主要集中在分子标记和 cDNA 文库方面,对基因的研究较少。本研究主要目的是开展马尾松桂酸辅酶 A 还原酶基因(cinnamyl-CoA reductase, 简称 CCR)基因的克隆,基因组 DNA 的提取是最基本的也是首要的一步,其成功与否关系到对今后马尾松 CCR 研究能否顺利进行,因此马尾松基因组 DNA 提取方法对马尾松分子生物学特性的研究起着十分重要的作用。马尾松基因组 DNA 的提取方法已见发表,但提取方法和效果不尽相同^[1,2],本文利用改良的 CTAB 法提取基因组 DNA。

1 实验材料与仪器

1.1 试验材料

试验以马尾松针叶为原材料提取基因组 DNA。2008 年 1 月 16 日于福建省林业科学研究院采集马尾松幼树枝条上部针叶。样品采集后挑取无病虫害嫩叶,立即置于 -20℃ 的冰箱中保存备用。

1.2 仪器及试剂

1.2.1 抽提仪器 陶瓷研钵,50,1.5 mL 离心管,量筒,烧杯,玻璃棒,镊子,1 000,200,10,2.5 μL 的 Eppendorf 移液器,手术剪刀,电热恒温水浴锅 HWS24 型(上海一恒),温度勾配恒温器(日本产),电子天平,Ep-

* 基金/项目:福建省科技厅青年人才项目(2007F3017)。

作者简介:陈碧华(1967-),男,福建龙海人,博士,高级工程师,从事林业生物技术研究。

pendorf centrifuge 5804 R 离心机(德国 Eppendorf 公司), Eppendorf centrifuge 5415 D 离心机, 旋涡混合器, 哈纳酸度离子计 pH211, 高压蒸汽灭菌器 KT-30L(日本)。

1.2.2 检测仪器 凝胶成像仪 UVP (White/ultraviolet Transilluminator), 紫外分光光度计 U-3210(日本 Hitachi 公司), 电泳仪 DYY-6C 型和电泳槽 DYCP-33A 型(北京市六一仪器厂)。

1.2.3 试剂 液氮, β -巯基乙醇, 氯仿, 异戊醇, 异丙醇, 无水乙醇, 95% 乙醇, Tris(三羟甲基氨基甲烷), 硼酸, EDTA(乙二胺四乙酸二钠), NaOH, CTAB(十六烷基三乙基溴化铵), NaCl, 溴酚蓝, 二甲苯青, RNase A, 三氯甲烷, 电泳级琼脂糖, 溴化乙锭, PVP(聚乙烯吡咯烷酮), 双蒸水。

2 提取方法

2.1 方法一

采用唐效蓉等报道的改良 CTAB 法^[1]。经凝胶电泳检测, 未提取到 DNA。

2.2 方法二

总 DNA 的提取方法如下^[3]:

(1) 于 50 mL 离心管中加入 10 mL $2 \times$ CTAB 提取缓冲液, 65°C 预热。

(2) 快速称取约 2.0 g 低温贮存的嫩叶, 剪碎后, 立即投入研钵中。研钵预先加入 0.1 g PVP 和液氮, 倒液氮 3~4 次, 将样本研磨成细粉末状。

(3) 将粉状样本迅速转入提取缓冲液中, 尽快用玻璃棒混匀, 于 65°C 温育 30 min。其间轻摇 2~3 次。

(4) 取出离心管, 冷却至室温, 加入等体积的氯仿/异戊醇(24: 1 = V/V), 轻缓上下颠倒混匀, 静置 10 min。

(5) 室温下, 在 Eppendorf 5804 R 离心机上以 $10\,000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min。

(6) 转移上清液于另一离心管中, 加入 2/3 体积冷冻的异丙醇(-20°C), 轻缓颠倒混匀, 至絮状物出现, 室温放置 15 min。

(7) $10\,000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 弃上清。

(8) 用 2 mL 75% 的乙醇洗涤沉淀 2 次, 转入 1.5 mL 离心管, 室温下微干, 溶于 500 μL 灭菌的双蒸水。

(9) 加入 2.5 μL 浓度 $10\text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 RNase 溶液, 37°C 保温 1 h。

(10) 用等体积的氯仿/异戊醇抽提 2 次。

(11) 上清液中加入终浓度为 $0.3\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NaCl 和 2 倍体积的冷冻无水乙醇(-20°C), 放置 1 h, $12\,000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 除去上清液。

(12) 用 75% 的乙醇洗涤沉淀 3 次, 自然干燥后溶于 100 μL 灭菌的双蒸水, 放置冰箱中 -20°C 保存备用。

2.3 总 DNA 的纯化方法

(1) 加入等体积的氯仿/异戊醇(24: 1), 轻缓颠倒混匀, 室温静置 10~15 min。

(2) $10\,000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 离心 10 min。

(3) 重复步骤(1)和(2)。

(4) 取上清液, 加入终浓度 $0.2 \sim 0.4\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NaCl, 2 倍体积的无水乙醇, 放置 1 h。

(5) $12\,000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 离心 10 min, 弃上清液。

(6) 用 70% 乙醇洗涤沉淀 2~3 次。

(7) 自然干燥后溶于 50~100 μL dd H_2O 中, -20°C 保存备用。

3 提取效果分析

3.1 凝胶电泳检测马尾松基因组 DNA 的提取效果

(1) 将电泳级琼脂糖加入 $1 \times$ TBE 电泳缓冲液中(W/V 为 1.0%), 在电磁炉或电炉上煮开熔化, 混匀, 冷却至 $45 \sim 50^\circ\text{C}$, 将琼脂糖凝胶倒入已插样品梳并封好边的凝胶灌制平台上。

(2) 胶凝固后(30 min 左右), 从制胶平台上拔出梳子。

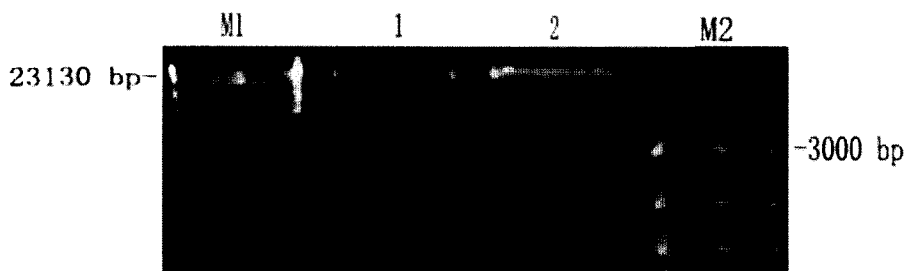
(3) 往电泳槽加入适量的 $1 \times$ TBE 电泳缓冲液, 小心将凝胶放入电泳槽, 缓冲液刚好没过凝胶表面为宜。

(4) 于 Parafilm 封口膜上,用移液枪注入 2 μL 加样缓冲液于每 Marker 或样本中,Marker 各 1 μL ,DNA 样本各 2 μL 。充分混匀,然后用移液器将样品和缓冲液一起依次加入到凝胶样品孔中。Marker 为 Fermentas 公司产品,分别为 Lambda DNA/HindIII Marker 2(23 130 ~ 125 bp) 和 GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder (3 000 ~ 100 bp)。

(5) 接通电极,在 110 V 电压下电泳。当溴酚蓝与二甲苯青迁移到适当位置时,关闭电源。

(6) 小心取出凝胶,移入含有溴化乙锭(EB)的溶液中染色,后经清水漂洗。

(7) 凝胶成像仪拍片,观察分析(见图 1)。



M1: Lambda DNA/HindIII Marker 2; 1: 马尾松样本 1 的总 DNA;
2: 马尾松样本 2 的总 DNA; M2: GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder

图 1 基因组 DNA 凝胶电泳图

3.2 DNA 纯度与浓度的测定

将抽提的 DNA 于 U-3210 spectrophotometer(日本 Hitachi 公司制造)上检测。利用紫外分光光度法,测定抽提的 DNA 样品的纯度与浓度。

每次取 DNA 样品 2 μL ,稀释 500 倍,于波长 260 nm 和 280 nm 分别测定 5 次,计算得到平均值。试验虽做了一个植株,但做了 2 个管,管(1)和管(2)。所提取的 DNA 纯度用 OD_{260} 和 OD_{280} 的比值来评判^[4]。

管(1)DNA 纯度 = $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280} = 0.03110/0.01886 = 1.648$;

管(2)DNA 纯度 = $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280} = 0.04308/0.02626 = 1.640$;

2 个比值接近,均小于 1.8,没有 RNA 污染;均大于 1.6,表明没有或极少有蛋白质、酚等污染。

DNA 样本浓度($\text{ug} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) = $\text{OD}_{260} \times \text{稀释倍数} \times 50/1000$ 。

管(1)浓度 = $50 \times 0.0311 \times 500 = 0.777 (\text{ug} \cdot \mu\text{L}^{-1}) = 777 (\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1})$;

管(2)浓度 = $50 \times 0.0431 \times 500 = 1.077 (\text{ug} \cdot \mu\text{L}^{-1}) = 1077 (\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1})$ 。

4 结果与讨论

4.1 马尾松基因组 DNA 抽提时,应尽量采用幼嫩、无病虫害材料,所采集的针叶应该低温运输,并尽快保存于 -20°C 。手工研磨时应尽量避免材料解冻,并多次倒入液氮,研磨时保持均匀全面,使植物细胞壁有效破碎。

4.2 在 DNA 的提取和使用过程中,应避免激烈震荡(如震荡器)和急速吹吸(如移液枪),以免发生 DNA 断链。

4.3 本次基因组 DNA 提取目的是用于扩增 CCR 基因,通常一次 PCR 扩增反应所需的 DNA 模板用量仅为 50 ~ 100 ng,当样品 DNA 浓度最低达 $60 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$,纯度在 1.6 以上时可满足 PCR 实验要求。

4.4 改良 CTAB 法抽提马尾松针叶 DNA 的浓度和纯度均符合以上要求。本实验中样本的总基因组 DNA 未提纯和提纯后,杂质含量都较少,可直接用于 CCR 基因的 PCR 实验,已成功扩增出 CCR 基因(GenBank 登录号:EU753854)。

4.5 方法一没有加入 PVP,混和物颜色深暗,而方法二加入 PVP,混和物颜色浅,因为木本植物的 DNA 提取

过程中加入 PVP,有利于阻止酚类氧化而抑制酶的活性。方法一离心时转速低,只有 $4\,000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$,导致 CTAB 与核酸的复合物同蛋白质、多糖类物质不能很好地分开,上清液浑浊,影响 DNA 提取效果。方法二离心时转速高达 $10\,000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$,CTAB 与核酸的复合物同蛋白质、多糖类物质能很好地分开,上清液清澈透明,DNA 提取效果好。

4.6 在 65°C 水浴过程中,要不断将混合液摇匀。而且,时间不宜太长,否则材料易发生褐化,DNA 质量和产量都不理想。

4.7 DNA-CTAB 复合物的沉淀为白色纤维状,很容易从溶液中钩出^[1]。本试验用离心方法,将 DNA-CTAB 复合物沉淀用离心的方法分离,离心的时间不宜太长。如果沉淀过分紧密,会导致 DNA 难重新溶解,但加入双蒸水后,用手指轻弹,仍然可以溶解,只是时间延长。

参考文献

- [1] 唐效蓉,申响保,陈明皋,等. 马尾松针叶 DNA 抽提[J]. 湖南林业科技,2006,33(5):1-4.
- [2] 李丹,凌定厚. 五种提取马尾松基因组 DNA 方法的比较[J]. 植物学通报,2000,17(2):168-173.
- [3] 王关林,方宏筠,等. 植物基因工程[M]. 2 版. 北京:科学出版社,2002:744.
- [4] 周延清. DNA 分子标记技术在植物研究中的应用[M]. 北京:化学工业出版社,2005:43-44.