

文章编号: 1000-5692(2006)06-0664-05

光皮桦基因组 DNA 提取方法比较

谢一青¹, 李志真¹, 黄儒珠², 肖祥希¹, 王志洁¹

(1. 福建省林业科学研究院, 福建 福州 350012; 2. 福建师范大学 生命科学学院, 福建 福州 350007)

摘要: 为从富含次生代谢物的光皮桦 *Betula luminifera* 嫩叶中获得高质量 DNA, 设计了 5 种先提核再提 DNA 的 CTAB 法 I, CTAB 法 II, CTAB 法 III, CTAB 法 IV 及改进的 SDS 法, 并以常规 CTAB 法为对照。用不同的方法就光皮桦基因组 DNA 进行了提取, 采用琼脂糖凝胶电泳检测、 A_{260}/A_{280} 值测定、限制性内切酶处理和 PCR 扩增等方法对所提的 DNA 进行了比较分析。结果表明: 实验设计的 5 种改进方法提取的 DNA 质量要比常规法的好, 但提取的效果差异较大。其中改进的 CTAB 法 I 是提取光皮桦基因组 DNA 的最佳方法; PCR 扩增结果表明, 不同的 DNA 提取方法会影响 PCR 带型的变化。图 3 表 1 参 13

关键词: 植物学; 光皮桦; DNA 提取; CTAB 法; SDS 法; 顽拗类植物

中图分类号: S718.43 **文献标识码:** A

光皮桦 *Betula luminifera* 为桦木科 Betulaceae 桦木属 *Betula* 落叶乔木, 天然分布于秦岭、淮河流域以南的河南、四川、贵州、云南、安徽、湖北、湖南、广东、广西、江西、浙江、福建等 10 多个省(自治区), 是我国特有的优良速生用材树种, 具有很高的生态、经济价值与开发前景^[1~3]。自 20 世纪 90 年代以来, 许多学者就已开展了对光皮桦的研究, 但多限于群落特征、育种造林及栽培管理等方面^[4~8], 从分子水平上对其进行系统分析与研究, 迄今尚未见报道。光皮桦基因组 DNA 提取是开展 DNA 标记、分子杂交等分子生物学实验的基础性工作, 其质量的好坏将直接关系到实验的成败。由于同一植物采用不同方法或不同植物采用相同方法提取的基因组 DNA, 其纯度和提取率有很大差异^[8], 而且不同植物材料的组分差异较大, 其 DNA 含量也各异, 提取的难易程度亦不同, 故针对不同树种应采用不同的 DNA 提取方法。光皮桦属顽拗类植物, 组织内富含多糖类、多酚类及其他次生代谢物质, 严重干扰 DNA 的提取。笔者曾采用常规的 SDS (sodium dodecyl sulfate) 法和 CTAB (cetyltrimethyl ammonium bromide) 法以及前人针对顽拗类植物而改进的方法提取过 DNA, 均未获得满意的效果。为此, 拟以光皮桦嫩叶为材料, 设计了 5 种不同的方法提取其总 DNA, 并对其结果进行比较, 以确定较理想的光皮桦 DNA 提取方法, 为进一步开展光皮桦分子生物学研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

选用同一株光皮桦树上当年生嫩叶作为 DNA 提取的材料。新鲜嫩叶采自福建省林业科学研究院。

1.2 主要试剂

CTAB, SDS, Primer S107, λ DNA (48 kb), DNA 分子量标准物、聚乙烯吡咯烷酮(PVP-40T)和琼

收稿日期: 2005-12-07; 修回日期: 2006-04-24

基金项目: 福建省林业厅重大科学技术攻关项目(200306)

作者简介: 谢一青, 工程师, 从事林木遗传育种研究。E-mail: xie1q@yahoo.com.cn

脂糖等购自上海生工生物工程技术有限公司, *Hind* III *Eco*R I, *Taq* 聚合酶等其他药品为 TaKaRa 公司产品。提取方法中用到的主要试剂: 3×CTAB 裂解液[100 mmol·L⁻¹Tris-HCl (pH 8.0), 25 mmol·L⁻¹EDTA, 1.5 mol·L⁻¹NaCl 和 30 g·L⁻¹CTAB]; 核分离缓冲液 I [200 mmol·L⁻¹Tris-HCl (pH 8.0), 50 mmol·L⁻¹乙二胺四乙酸(EDTA)(pH 8.0), 250 mmol·L⁻¹氯化钠(NaCl)]; 核分离缓冲液 II (100 mmol·L⁻¹EDTA, 30 g·L⁻¹可溶性 PVP, 体积分数为 2%的 β-巯基乙醇); 核分离缓冲液 III [50 mmol·L⁻¹Tris-HCl (pH 8.0), 50 mmol·L⁻¹EDTA, 150 g·L⁻¹蔗糖, 20 g·L⁻¹PVP, 体积分数为 2%的 β-巯基乙醇]; 核分离缓冲液 IV[50 mmol·L⁻¹Tris-HCl (pH 8.0), 50 mmol·L⁻¹EDTA, 250 mmol·L⁻¹NaCl, 150 g·L⁻¹蔗糖, 20 g·L⁻¹PVP]; 核分离缓冲液 V [0.4 mol·L⁻¹葡萄糖, 20 g·L⁻¹PVP, 体积分数为 2%的 β-巯基乙醇]; SDS 核裂解液[100 mmol·L⁻¹Tris-HCl (pH 8.0), 20 mmol·L⁻¹EDTA, 0.5 mol·L⁻¹NaCl, 15 g·L⁻¹SDS, 20 g·L⁻¹PVP, 体积分数为 2%的 β-巯基乙醇]。

1.3 DNA 提取方法

参考前人对顽拗类植物 DNA 的提取研究^[10-12], 并针对光皮桦材料特点, 设计了改良的 CTAB 法 I, CTAB 法 II, CTAB 法 III, CTAB 法 IV 和改进的 SDS 法提取 DNA。路线是先破碎细胞, 离心去除存在于细胞质中的影响 DNA 提取质量的多酚类等次生代谢物质, 收集细胞核; 核裂解, 分离提纯 DNA。

1.3.1 常规 CTAB 提取法 参照 Clark^[12] 的方法进行。

1.3.2 改良 CTAB 法 I 取光皮桦嫩叶 200 mg, 洗净吸干水分剪碎后放入研钵中, 直接加 30 mg PVP-40T, 少许抗坏血酸和石英砂, 1.5 mL 预冷的核分离缓冲液 I 和 20 μL β-巯基乙醇, 迅速研磨后, 移入 2 mL 离心管, 置冰上 10 min; 取出, 4 °C 下 7 000 r·min⁻¹离心 10 min, 弃上清; 沉淀(细胞核)加 1 mL 65 °C 预热的 3×CTAB 裂解液, 混匀, 65 °C 水浴裂解 60 min; 取出, 10 000 r·min⁻¹离心 10 min, 取上清, 用等体积的氯仿/异戊醇(体积比为 24:1)抽提 2 次, 取上清, 加 1/2 体积 NaCl (5 mol·L⁻¹) 和 2/3 体积的冷异丙醇, 混匀, 置 -20 °C 冰箱过夜; 次日取出, 10 000 r·min⁻¹离心 5 min, 沉淀用体积分数为 75% 的乙醇洗涤 2 次, 无水乙醇洗涤 1 次, 自然风干后, 溶于 60 μL TE 缓冲液。

1.3.3 改良 CTAB 法 II 取嫩叶 200 mg, 洗净, 吸干水分, 加少量石英砂及 1.5 mL 核分离缓冲液 II, 迅速研磨后, 移到 2.0 mL 的离心管中, 5 000 r·min⁻¹离心 5 min, 弃上清, 沉淀再加 1 mL 核分离缓冲液 II, 混匀, 5 000 r·min⁻¹离心 5 min, 弃上清, 收集细胞核。后续操作与改良 CTAB 法 I 相同。

1.3.4 改良 CTAB 法 III 取嫩叶 200 mg, 洗净, 吸干水分, 加少量石英砂及 1.5 mL 核分离缓冲液 III 处理 1 次, 再用核分离缓冲液 IV 处理 1 次, 收集细胞核。后续操作同改良 CTAB 法 I。

1.3.5 改良 CTAB 法 IV 取嫩叶 200 mg, 洗净, 吸干水分, 加少量石英砂及 1.5 mL 核分离缓冲液 V, 迅速研磨, 移到 2.0 mL 的离心管中, 5 000 r·min⁻¹离心 5 min, 弃上清, 收集细胞核。后续操作同改良 CTAB 法 I。

1.3.6 改良 SDS 法 取嫩叶 200 mg, 洗净, 吸干水分, 加少量石英砂及 1.5 mL 核分离缓冲液 V, 迅速研磨, 移到 2.0 mL 的离心管中, 5 000 r·min⁻¹离心 5 min, 弃上清, 沉淀中加入 1 mL SDS 核裂解液, 裂解 60 min。其他操作同改良 CTAB 法 I。

1.4 DNA 鉴定

1.4.1 紫外检测 提取的 DNA 样品用 GenQuanTM pro DNA/RNA 紫外分光光度计测定波长 260 nm 和 280 nm 的光吸收值, 以 A_{260} 估算样品得率, A_{260}/A_{280} 比值判断样品的大致纯度。

1.4.2 电泳检测 将提取产物上样于 8.0 g·kg⁻¹ 的琼脂糖凝胶, 电泳, EB 染色, 检测所得 DNA 的大致分子量。

1.4.3 酶切反应 *Hind* II 单酶解: 反应体积 20 μL, 含样品 DNA 1 μL, 酶 250.05 nkat (15 U), buffer 2 μL。 *Hind* II 和 *Eco*R I 双酶解: 反应体积 20 μL, 含样品 DNA 1 μL, *Hind* II 和 *Eco*R I 各 125.03 nkat (7.5 U), buffer 2 μL。酶解条件: 37 °C, 4 h。酶解产物点样于 8.0 g·kg⁻¹ 的琼脂糖凝胶上, 电泳、EB 染色后, 观察并拍照。

1.4.4 PCR 扩增检测 以提取的样品 DNA 为模板, 用 RAPD 引物 S107 (3'-CTGCATCGTG-5') 进行 PCR 扩增, 20 μL 反应体系中含模板 DNA 30 ng, MgCl₂ 2.5 mmol·L⁻¹, 引物 0.4 μmol·L⁻¹, dNTP 0.2 mmol·

L^{-1} , *Taq* DNA 聚合酶 16.67 nkat (1U), $10\times$ PCR 缓冲液 2 μ L。扩增程序为: 95 $^{\circ}$ C 变性 300 s; 然后按 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 40 $^{\circ}$ C 复性 60 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 120 s, 循环扩增 41 次; 最后在 72 $^{\circ}$ C 延伸 300 s。产物以 15.0 $g\cdot kg^{-1}$ 琼脂糖凝胶电泳、EB 染色, 观察, 拍照。

2 结果与分析

2.1 DNA 产物的质量浓度、纯度和得率

除改良 CTAB 法 IV 提取的 DNA 为淡黄色外, 其他 5 种方法提取的 DNA 外观上均为白色沉淀。表 1 表明, 6 种方法所获取的光皮桦基因组 DNA 得率为 (鲜叶) 207.8 ~ 590.3 $\mu g\cdot g^{-1}$, 其中改良 CTAB 法 II 获得的 DNA 量最多, 其他方法获取的 DNA 得率由高到低依次是 CTAB 法

表 1 不同方法提取的光皮桦 DNA 产物的质量浓度和纯度

Table 1 Concentration and purity of different DNA products extracted

样品编号	提取方法	质量浓度/($mg\cdot L^{-1}$)	得率/($\mu g\cdot g^{-1}$)	A_{260}/A_{280}
1	常规 CTAB 法	692.0	207.8	2.015
2	CTAB 法 I	1506.2	452.3	1.821
3	CTAB 法 II	1965.7	590.3	1.747
4	CTAB 法 III	1353.7	406.5	1.802
5	CTAB 法 IV	1535.8	461.2	1.691
6	改良 SDS 法	1023.0	307.2	1.895

IV, CTAB 法 I, CTAB 法 II 和 SDS 法, 常规 CTAB 法提取的 DNA 得率最低。从表 1 还可看出, 6 种方法提取的 DNA A_{260}/A_{280} 比值为 1.691 ~ 2.015, 其中 CTAB 法 I 和 CTAB 法 II 提取的 DNA A_{260}/A_{280} 比值在 1.800 左右, 表明所提到的 DNA 基本没有蛋白质的污染, 纯度较高。而 CTAB 法 IV 提得的 DNA 溶液 A_{260}/A_{280} 为 1.691, 说明该法除蛋白质的效果较差, 其得率也偏低。

2.2 DNA 琼脂糖凝胶电泳检测结果

由图 1 可知, 除 CTAB 法 IV 外, 其他 5 种方法提取的 DNA 片段较完整, 大小在 48 kb 左右。其中 CTAB 法 I 和 CTAB 法 II 提取的 DNA 样品谱带较清晰, 成一条直线, 拖尾现象较少, 说明 DNA 降解少, 完整性相对较好。另从图 4 还可看出, 常规 CTAB 法和 CTAB 法 I 的点样孔基本没有残留物, 说明这两种方法在去除光皮桦嫩叶中多糖的效果较佳。而其他 4 种方法的点样孔基本都残留一些杂质, 其中 CTAB 法 IV 和改进的 SDS 法点样孔最亮, CTAB 法 IV 所获得的 DNA 样品电泳速度也较慢, 这说明该 DNA 样品中含有较多的未被去除的多糖或其他杂质。

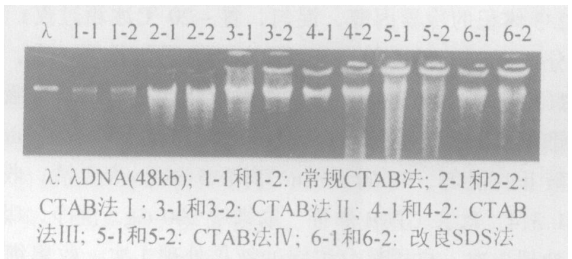


图 1 不同方法提取的光皮桦 DNA 电泳图

Figure 1 Electrophoretogram of DNA extracted with different methods

2.3 DNA 限制性酶切结果

由于多糖对限制性内切酶活性具有抑制作用, 因此用限制性内切酶 *Hind* III 和 *Eco*RI 对 6 种提取方法所得 DNA 样品分别进行单酶切 (图 2-a) 和双酶切 (图 2-b)。DNA 的酶解程度可通过观察未被降解的和电泳后处于凝胶顶端的大分子量 DNA 的多少来加以判断^[3]。从图 2 可看出, 6 种方法所得 DNA 样品均能被 *Hind* III 和 *Eco*RI 酶切, 且单酶切和双酶切的效果差异不大。但从凝胶顶端的大分子量 DNA 的量看, 6 种提取方法中, 以 CTAB 法 II 所提的 DNA 的酶切带 (泳道 3 和泳道 9) 在靠近点样孔处的量较多, 可见该法提的 DNA 单酶切和双酶切

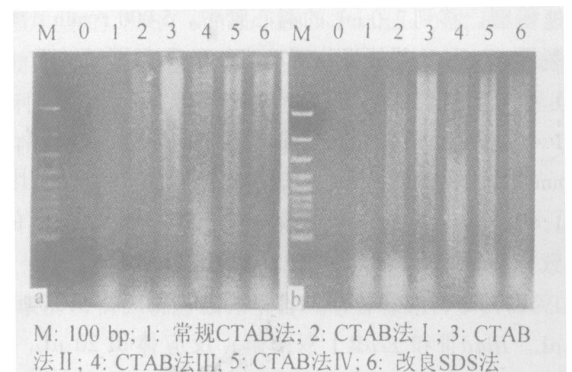


图 2 光皮桦 DNA *Hind* III 单酶切 (a) 及 *Hind* III 和 *Eco*RI 双酶切 (b) 图谱

Figure 2 DNA digested with *Hind* III (a), *Hind* III and *Eco*RI (b)

的效果相对较差, 这说明 CTAB 法 II 提取的 DNA 中可能含有其他杂质。

2.4 DNA 样品的 PCR 带型

模板 DNA 质量对 PCR 带型有重要影响, DNA 降解严重时甚至导致无扩增产物, 而 DNA 质量受提取方法的影响。6 种提取方法所得 DNA 样品的 PCR 带型见图 3。图 3 显示: 常规 CTAB 法和 CTAB 法 II 所得 DNA 虽能扩增出条带, 但扩增不完全, 条带少, 不适合分子生物学分析和研究; CTAB 法 I, CTAB 法 III, CTAB 法 IV 和改良 SDS 法提取的 DNA 经 PCR 扩增后产物质量浓度较高, 条带多且清晰, 可用于分子生物学研究, 但只有 CTAB 法 I 提取的 DNA 能扩增出 780 bp 和 1 200 bp 条带。重复实验时也发现用 CTAB 法 IV 和改良 SDS 法所得 DNA 作为模板进行 RAPD 反应的稳定性较差。可见这 2 种方法不适用于对大批量样品进行 RAPD 实验的 DNA 提取, 因为其结果可能很难准确反映群体的遗传多样性特征。

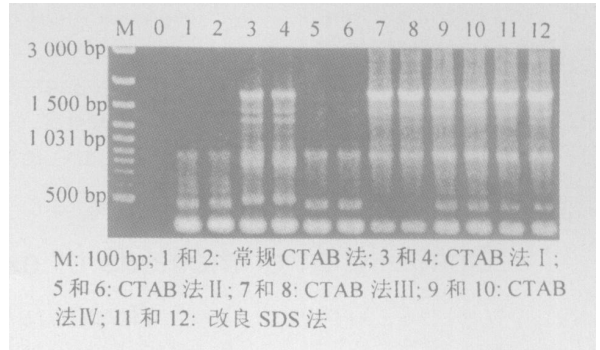


图 3 6 种方法提取的光皮桦 DNA 的 PCR 扩增带型

Figure 3 RAPD products with DNA samples as templates

3 结论与讨论

由于光皮桦体内含有大量的糖类、酚类及其他次生代谢物, 用常规的 CTAB 法和 SDS 法能获得少量的 DNA, 但质量较差, 提取的总 DNA 基本上都被降解, PCR 扩增也不完整。本实验设计的 5 种改进方法通过先破细胞壁再收集细胞核, 并在提取时或在核分离缓冲液中加入 20 或 30g·L⁻¹ PVP 和体积分数 2%β-巯基乙醇以防止多酚类物质的氧化作用, 避免了常规法中因细胞与细胞核同步裂解而导致核 DNA 受大量杂质污染。紫外检测、凝胶电泳、酶切检测及 PCR 扩增结果表明, 设计的 5 种改进方法均能提取光皮桦 DNA, 但提取的效果差异较大。综合考虑, 由于 CTAB 法 I 所获得 DNA 质量好, 纯度高, 操作程序相对简单, 扩增条带完整, 重复性也高, 适于分子生物学研究, 因此确定 CTAB 法 I 为光皮桦基因组 DNA 提取的最佳方法。

此外, 本研究选择同一株光皮桦的叶片来提取 DNA, 其出发点一方面是便于考虑比较不同提取方法差异, 另一方面也是为了更好考察和比较不同提取方法与 PCR 反应带型间的关系。对于后者, 由于 6 种方法对杂质的去除程度不一。这种因提取方法上的差异而带来的 DNA 扩增带型上的差异能否影响随后的分子生物学研究结果, 是本研究希望能解决的一个问题。从本实验结果看, 用 6 种方法提取的光皮桦基因组 DNA 进行 PCR 扩增结果是不一致的, 这说明提取方法与 PCR 带型之间有相关性, 即提取方法的差异会影响 PCR 带型。这一结果有助于我们判断随后利用提取的 DNA 作为模板进行 PCR 分析结果的可靠性。

参考文献:

- [1] 陈存及, 陈伙法. 阔叶树种栽培[M]. 北京: 中国林业出版社, 2000.
- [2] 郑万钧. 中国树木志: 第 2 卷[M]. 北京: 中国林业出版社, 1985.
- [3] 潘新建. 光皮桦资源的开发利用与发展前景[J]. 资源开发与市场, 2000, 16(4): 220-221.
- [4] 李健民. 光皮桦天然林群落特征研究[J]. 林业科学, 2000, 36(2): 122-124.
- [5] 郑仁华, 邹绍荣, 杨宗武, 等. 光皮桦优树子代性状遗传变异及选择[J]. 植物资源与环境学报, 2004, 13(2): 44-48.
- [6] 董建文, 陈慈禄, 陈东阳, 等. 光皮桦栽培生物学特性研究[J]. 江西农业大学学报, 2001, 23(2): 220-223.
- [7] 刘芳. 杉木光皮桦纯林及混交林生物量[J]. 浙江林学院学报, 2002, 19(2): 143-147.
- [8] 李建民, 谢芳, 张思玉, 等. 不同干扰强度下光皮桦群落树木物种多样性比较[J]. 浙江林学院学报, 2001, 18

(4): 359—361.

- [9] 刘萍, 代红军, 张立杰, 等. DNA 提取方法与植物种类的效应比较[J]. 宁夏农林科技, 1998 (1): 15—18.
- [10] ZENG J, ZOU Y P, BAI J Y, *et al.* Preparation of total DNA from “Recalcitrant Plant Taxa” [J]. *Acta Botanica Sinica*, 2002, 44 (6): 694—697.
- [11] 潘晓华, 黄儒珠, 朱锦懋. 樟树总 DNA 提取技术的研究[J]. 福建林业科技, 2004, 31 (1): 31—33, 41.
- [12] CLARK M S. 植物分子生物学实验手册[M]. 顾红雅, 瞿礼嘉, 译. 北京: 高等教育出版社, 1998.
- [13] 洪付祥, 徐金森, 熊玲媛, 等. 鹤望兰基因组 DNA 的提取方法[J]. 应用与环境生物学报, 2002, 8 (4): 366—370.

Comparison of methods of extracting genomic DNA from *Betula luminifera*

XIE Yi-qing¹, LI Zhi-zhen¹, HUANG Ru-zhu², XIAO Xiang-xi¹, WANG Zhi-jie¹

(1. Fujian Academy of Forestry, Fuzhou 350012, Fujian, China; 2. College of Life Sciences, Fujian Normal University, Fuzhou 350007, Fujian, China)

Abstract: Six methods including basic CTAB method, modified CTAB methods as CTAB I, CTAB II, CTAB III, CTAB IV, and improved SDS methods were used to extract high-quality DNA from the young leaves of *Betula luminifera*. The DNA samples obtained by the above methods were tested by agarose-gel electrophoresis, restricted enzyme digests and PCR. Results showed that the modified methods were better than the basic CTAB method in terms of the quality of total DNA, but the effects of DNA extraction differed greatly. Among them, the modified CTAB I method was the best for extracting *B. luminifera* DNA from leaves. The comparisons of PCR patterns of genomic DNA extracted with different methods showed that different extracting methods would affect the changes of PCR patterns. [Ch, 3 fig. 1 tab. 13 ref.]

Key words: botany; *Betula luminifera*; DNA extracting; CTAB method; SDS method; recalcitrant plant taxa

浙江林学院 8 项科研项目获国家自然科学基金资助

经国家自然科学基金委员会评审, 2006 年浙江林学院有 8 项研究项目获得国家自然科学基金资助, 总资助经费 171 万元。其中, 生命科学部 7 项, 信息科学部 1 项。

(王义辉)