

提取大白菜基因组 DNA 的几种方法比较

王永飞¹, 王 鸣¹, 郑学勤², 张鲁刚³

S634.103.2

Q781

(1 西北农林科技大学 园艺系, 陕西 杨陵 712100; 2 热带作物生物技术国家重点实验室, 海南 海口 571101; 3 西北农林科技大学 蔬菜花卉研究所, 陕西 杨陵 712100)

[摘要] 对用 SDS 法、尿素法、改良 SDS 法、氯化苄和 CTAB 法提取的大白菜基因组 DNA 进行了比较。结果表明, 改良 SDS 法提取的 DNA 具有典型的天然 DNA 分子的标准紫外吸收光谱特点, 其 A_{260}/A_{280} 为 1.7~1.9, A_{260}/A_{230} 为 1.8~2.0, 叶片的 DNA 产量为 400 $\mu\text{g}/\text{g}$ 。用该法提取的大白菜 DNA 适于进行 RAPD 分析。

[关键词] 大白菜; DNA 提取方法; 改良 SDS 法; 基因组; 遗传转化

[中图分类号] S634.1; Q781 **[文献标识码]** A

快速提取高质量的 DNA 是对植物基因组进行研究的基础, 也是对植物遗传转化后代进行分子鉴定的前提。目前国内外提取 DNA 的方法很多^[1~9], 但因所研究的对象和目的不同而有差异。本试验对 5 种有代表性的方法所提取的大白菜基因组 DNA 进行了比较研究, 旨在筛选出一种快速、简便且可获得高质量 DNA 分子的方法, 为进一步开展大白菜分子生物学研究奠定基础。

1 材料和方法

材 料 试验材料为大白菜异源胞质不育系 CMS3411-7 及其保持系 3411-7^[10]。

试材的培养 挑选成熟度好、饱满且表面光滑的大白菜种子。先用体积分数为 70% 乙醇处理 30 s, 然后用质量分数为 0.1% HgCl_2 消毒 15 min, 无菌水冲洗 5 次后备用。在 100 mL 的三角瓶中加入 20 mL 固体 MS 培养基, 每瓶播处理好的种子 10 粒, 置于 25℃, 16 h/d 光照, 光强 1 500 lx 条件下培养 14 d, 取幼嫩的叶片提取 DNA。

DNA 提取方法 采用 SDS 法^[1]、尿素法^[2]、改良 SDS 法^[3]、氯化苄法^[4]和 CTAB 法^[5]对大白菜基因组 DNA 进行提取。

RAPD 扩增反应 反应体积为 25 μL , 其中含 10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.3), 50 mmol/L KCl, 10 mmol/L MgCl_2 , 4 种 dNTPs 各 150 $\mu\text{mol}/\text{L}$, 随机引物 1.0 $\mu\text{mol}/\text{L}$, 基因组 DNA 约 25 ng, Taq DNA 聚合酶 10 $\mu\text{mol}/(\text{L} \cdot \text{min}^{-1})$ (华美生物工程公司产品)。扩增反应在 DNA Thermal Cycler 4800 型 PCR 仪 (PE 公司制造) 上进行。反应程序如下: 94℃ 预变性 5 min 后执行 94℃ 变性 1 min, 37℃ 复性 1 min, 72℃ 延伸 2 min, 经 35 个循环, 最后 72℃ 再延伸 5 min, 扩增产物在质量分数为 1.5% 的琼脂糖凝胶上电泳, 在紫外

[收稿日期] 1999-12-15

[基金项目] 高等学校博士学科点专项科研项目 (960701)

[作者简介] 王永飞 (1972-), 男, 副教授, 博士, 现在烟台师范学院生物系工作, 山东烟台 264025。

透射仪上观察照相^[11~15]。

2 结果与分析

2.1 电泳检测

取 2~6 μL DNA 溶液在质量分数为 1.0% 琼脂糖凝胶上进行电泳,用 $\lambda\text{-DNA}/\text{Hind III}$ 作标准分子质量对照,结果见图 1。从图 1 可以看出,5 种方法所提的 DNA 都大于 25 kb,泳带清晰整齐。SDS 法、改良 SDS 和 CTAB 法所提取的 DNA 明显优于氯化苄和尿素法所提取的 DNA。用氯化苄和尿素法提取的 DNA 有部分降解现象,而用其他 3 种方法所提取的 DNA 则无此现象。在这 3 种方法中又以改良 SDS 提取的 DNA 条带最好。

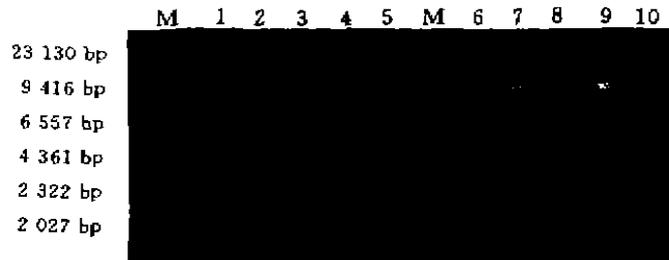


图 1 5 种方法提取的 DNA 电泳图

M 为 $\lambda\text{DNA}/\text{Hind III}$ Markers; 1, 2, 3, 4, 5 分别为用 SDS 法、尿素法、改良 SDS 法、氯化苄法和 CTAB 法提取的“CMS3411-7”的 DNA; 6, 7, 8, 9, 10 分别为用 SDS 法、尿素法、改良 SDS 法、氯化苄法和 CTAB 法提取的“3411-7”的 DNA。

2.2 紫外吸收检测

取 4 μL DNA 溶液用 TE 稀释至 400 μL , 在 BECKMAN[®] DU-70 型紫外检测仪上进行扫描,5 种方法所提取的 DNA 样品在 230, 260, 280 nm 波长处的紫外吸值的 3 次平均结果如表 1。

表 1 5 种方法提取的 DNA 紫外吸收值

品 种	方 法	A_{230}	A_{260}	A_{280}	A_{260}/A_{230}	A_{260}/A_{280}	DNA 产量/ ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)
CMS3411-7	SDS 法	0.702 3	1.263 8	0.738 3	1.799	1.712	631.90
	尿素法	0.265 3	0.433 7	0.270 1	1.635	1.606	216.85
	改良 SDS 法	0.431 3	0.842 5	0.462 3	1.953	1.822	421.25
	氯化苄法	0.262 3	0.412 3	0.269 5	1.572	1.529	206.15
	CTAB 法	0.293 2	0.546 7	0.301 2	1.865	1.815	273.35
3411-7	SDS 法	0.642 4	1.123 6	0.667 3	1.749	1.684	618.00
	尿素法	0.250 1	0.410 3	0.263 2	1.640	1.559	205.15
	改良 SDS 法	0.411 3	0.825 3	0.448 3	2.006	1.841	412.65
	氯化苄法	0.253 4	0.402 6	0.265 3	1.588	1.518	201.30
	CTAB 法	0.284 3	0.532 7	0.290 5	1.874	1.834	266.35

从表 1 可见,用尿素法和氯化苄法提取的 DNA A_{260}/A_{230} 和 A_{260}/A_{280} 偏低,说明采用这两种方法提取的 DNA 盐离子、糖类及蛋白质含量较高,纯度不好。并且用这两种方法提取的叶片 DNA 量较少(大致为 200 $\mu\text{g}/\text{g}$)。CTAB 法和改良 SDS 法提取的 DNA A_{260}/A_{230} 和 A_{260}/A_{280} 都大于 1.8,说明采用这两种方法提取的 DNA 纯度较好,盐离子和蛋白质及糖类含量较少。但采用 CTAB 法所提取的叶片 DNA 产率较低,只有 250 $\mu\text{g}/\text{g}$,

且提取步骤繁多,成本较高,毒性较大。采用 SDS 法所提取的叶片 DNA 虽产率较高(650 $\mu\text{g/g}$),但其纯度较改良 SDS 法和 CTAB 法所提取的较差。综合来看,改良 SDS 法是一种适于大白菜 DNA 提取的方法,采用该方法提取的 DNA 纯度较高,其紫外吸收曲线具有典型的天然 DNA 的标准吸收光谱特征。

2.3 RAPD 分析

以改良 SDS 法提取的 CMS3411-7 和 3411-7 的 DNA 为模板,用 Operon 公司的 OPA-10 和 OPB-12 随机引物进行扩增,扩增产物带型丰富且条带清晰(图 2)。对这一结果进行了多次重复,均表现出了良好的稳定性和重复性。此外以改良 SDS 提取的 CMS3411-7 和 3411-7 的 DNA 为模板,用 200 多个随机引物进行扩增,都得到了理想的扩增结果。



图 2 DNA 样品的 RAPD 分析

M 为 PCR Markers;1,3 分别为以 CMS3411-7 DNA 为模板,OPA-10 和 OPB-12 为引物的 RAPD 图谱;

2,4 分别为以 3411-7 DNA 为模板,OPA-10 和 OPB-12 为引物的 RAPD 图谱。

3 讨 论

提取植物 DNA 的方法虽然很多,但每种方法最关键的 3 步为:①破碎细胞壁和细胞膜使 DNA 释放到提取缓冲液中;②消除蛋白质、多糖、色素等杂质的污染;③防止 DNA 的降解。各种方法都是针对以上 3 步做了不同的改进和完善。一般来说,一个好的 DNA 提取方法应符合以下标准:①所得到的 DNA 应当完整,电泳检测时应得到精确性高、重复性好的迁移带型;②所得的 DNA 纯度应满足后续操作的要求;③所得的 DNA 应有足够的量;④操作程序应当快速、简便、成本低,并尽可能避免使用有毒试剂。在以上衡量标准下,本研究选择了 5 种有代表性的方法对大白菜细胞质雄性不育系 CMS3411-7 和其保持系 3411-7 的基因组 DNA 进行提取,经电泳分析,紫外检测及 RAPD 分析,发现改良 SDS 法最适于大白菜基因组 DNA 的提取,用该法提取的 DNA 分子质量大,纯度高,作模板可产生带型丰富、清晰的 RAPD 图谱。笔者以改良 SDS 法提取的大白菜基因组 DNA 为材料,已鉴定出了与大白菜细胞质雄性不育基因及其保持基因相连锁的 RAPD 标记,并对这些特异片段进行了克隆测序(将另文报道)。

[参考文献]

- [1] Pich U, Schubert I. Miniprep method for isolation of DNA from Plants with a high content of polyphenolics [J].

- Nucleic Acids Research, 1993, 21(14): 3328—3332.
- [2] 傅荣昭, 孙勇如, 贾士荣. 植物遗传转化技术手册[M]. 北京: 中国科学技术出版社, 1994. 131—136.
- [3] 江昌俊, 陈彦. 分离芸薹属植物基因组 DNA 的一种方法[J]. 中国油料, 1995, 17(4): 34—36.
- [4] 朱衡, 瞿峰, 朱立煌. 利用氯化苄提取适于分子生物学分析的真菌 DNA[J]. 真菌学报, 1994, 13(1): 34—40.
- [5] 顾红雅, 瞿礼嘉. 植物分子生物学: 实验手册[M]. 北京: 高等教育出版社, 1998. 3—12.
- [6] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南[M]. 第 2 版. 金冬雁, 黎孟枫译. 北京: 科学出版社, 1992. 954—960.
- [7] Murray H G, Thompson W F. Rapid isolation of high molecular weight DNA[J]. Nucleic Acids Research, 1980, 9(8): 4321—4325.
- [8] Tai T H, Tanksley D D. Rapid and inexpensive method for isolation of total DNA from dehydrated plant tissue[J]. Plant Mol Biol Rep, 1990, 8(4): 229—303.
- [9] 巩振辉, Cecchini E, Milner J J. 以 PCR 鉴定转基因植株的微量 DNA 提取方法[J]. 西北农业大学学报, 1997, 25(1): 45—48.
- [10] 柯桂兰, 赵雅雅, 宋胭脂, 等. 大白菜异源胞质雄性不育系 CMS3411-7 的选育及应用[J]. 园艺学报, 1992, 19(4): 333—340.
- [11] Williams J C K, Kubelik A R, Livak K J, et al. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers[J]. Nucleic Acids Research, 1990, 18(22): 6531—6535.
- [12] 曹家树, 曹寿椿, 易清明. 白菜及其相邻类群基因组 DNA 的 RAPD 分析[J]. 园艺学报, 1995, 22(1): 47—52.
- [13] 张鲁刚, 王鸣, 陈杭, 等. 白菜 RAPD 反应条件的优化[J]. 西北农业大学学报, 2000, 28(2): 1—7.
- [14] 王跃进, Lamikanra O, Schell L, 等. 用 RAPD 分析鉴定葡萄远缘杂种[J]. 西北农业大学学报, 1997, 25(3): 16—20.
- [15] 王跃进, Lamikanra O. 葡萄无核基因 RAPD 标记的序列分析(英文)[J]. 西北农业大学学报, 1997, 25(4): 1—5.

Comparison of genomic DNA extraction methods of Chinese cabbage (*Brassica campestris* ssp. *pekinensis*)

WANG Yong-fei¹, WANG Ming¹, ZHENG Xue-qin², ZHANG Lu-gang³

(1 Department of Horticulture, Northwest Science and Technology University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China; 2 National Key Biotechnology Laboratory for Tropical Crops, Haikou, Hainan 571101, China; 3 Vegetable and Flower Institute, Northwest Science and Technology University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: The DNA samples of Chinese cabbage male sterile line “CMS3411-7” and maintainer line “3411-7” were prepared by SDS, Urea, improved SDS, Benzyl chloride and CTAB methods, respectively. The results showed that DNA samples obtained by the improved SDS method possessed the standard ultraviolet absorbance spectrum of pure natural DNA, whose A_{260}/A_{280} was 1.70—1.90 and A_{360}/A_{230} was 1.8—2.0. The yield of DNA obtained by the improved SDS method was 400 $\mu\text{g/g}$ young leaves, and the DNA samples prepared by this procedure were suitable for RAPD analysis.

Key words: Chinese cabbage (*Brassica campestris* ssp. *pekinensis*); DNA extraction method; improved SDS