

# 一种少量提取植物组织DNA的快速方法<sup>\*</sup>

李维平, 赵文明, 雷 萍

(西安交通大学 生命科学与技术学院, 陕西 西安 710049)

**[摘 要]** 为了从植物组织中快速提取核酸, 从多种DNA提取方法中遴选出2种基本方法。通过优化基本方法的操作步骤、试剂用量与作用时间, 建立了一种改良的DNA快速提取方法。在此方法中, 用氯仿代替液氮或提取液进行植物组织研磨, 之后加入提取液抽提DNA, 并用氯仿-异戊醇反复抽提, 可显著降低蛋白质含量; 通过应用RNA酶可获得纯度较高的DNA。该方法的特点是在室温下即可进行简便操作, 快速(提取核酸的过程仅需30 min), 污染器皿少, 实用性强, 提取物产量高, 纯度好。

**[关键词]** DNA; 提取方法; 植物组织

**[中图分类号]** Q 78

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1671-9387 (2002) 06-0125-04

在分子生物学中, 核酸是重要的研究对象, 对DNA的研究更是重中之重。无论是对农作物品种纯度的检测、种质资源的评价与分类研究、作物性状的RAPD分子标记、利用DNA导入法从事分子育种研究, 还是重要性状的基因定位、克隆和测序等工作, 都必须提取高产量、高纯度的基因源植物总DNA<sup>[1,2]</sup>。依据所采用的试剂不同, 植物DNA提取的方法分为SDS法<sup>[3]</sup>、CTAB法<sup>[4]</sup>、脲法等, 其基本程序为: 首先破碎植物组织; 其次破碎细胞壁; 第三是从细胞核中抽提DNA; 四是纯化DNA。这些方法在提取植物核酸方面各有优缺点, 但多数步骤繁琐, 提取时间长, 不能满足现代植物分子生物学研究中大批量提取DNA的要求<sup>[1,2]</sup>。RAPD分子标记中需要对后代群体进行数十个乃至数百个样品的DNA提取和测定, 作物品种的杂交种纯度鉴定中, 亦需大批量的样品鉴定。因此, 从植物组织中提取DNA的方法亟需改进和提高。目前已有一些关于DNA提取改进方法的报道<sup>[5-8]</sup>, 但鲜见真正简便快捷者<sup>[9]</sup>。本文结合玉米光温敏核不育性的研究工作, 查阅了大量有关DNA提取方法的文献, 从中遴选了2种DNA提取方法作为改进基础, 对这两种方法的试剂和作用时间等因素择优组配, 摸索出了一个成本低、产量较高、适用性较强、无毒副作用的快速、简便的DNA提取新方法。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

试验材料有玉米种子、玉米成年叶片和小麦成年叶片。供试材料为自育的品种(系)和自交系, 经2001年田间种植鉴定为高纯度不育系、可育系上代种子的籽粒和当代的成株。田间试验在西北农林科技大学农作一站试验区进行。玉米种子先浸种1~3 d, 蒸馏水冲洗后用手术刀剥出胚仁, 进行细胞核基因组DNA提取(可免去种子籽粒发芽过程); 玉米叶片为抽雄后采集的成年叶片, -70℃储存于冰箱中备用, 进行植物总DNA的提取。小麦叶片为抽穗到开花期的成年叶片, 处理方法同玉米。

### 1.2 试剂和仪器

氯仿、DNA提取液(0.45 mol/L 氯化钠; 0.045 mol/L 柠檬酸三钠盐(3×SSC); 0.1 mol/L 乙二胺四乙酸二钠盐(EDTA); 质量分数1%的十二烷基硫酸钠(SDS); 调节pH=7.0)、氯仿-异戊醇(体积比为24:1)、无水乙醇、体积分数70%乙醇、溶解液(0.1×SSC和10×SSC)等。

AB204型全自动电子天平; CENTRIFUGE TGL-1613微型高速离心机; BECKMAN DU 640型紫外-可见分光光度计; 1.5 mL Eppendorf离心管; 研钵。磨制圆尖头玻棒1支, 使其圆尖头恰可与Eppendorf离心管底部吻合。

<sup>\*</sup> [收稿日期] 2001-10-19

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(39670478); 西安交通大学博士学位论文基金(DFXJU 2000-10)

[作者简介] 李维平(1954-), 男, 陕西西县人, 教授, 硕士生导师, 主要从事农作物遗传育种及分子生物学教学和研究工作。

### 1.3 方法

整体试验采取对比方法进行,按DNA提取程序操作步骤完成不同处理的同一操作步骤后再进行下一操作。试验中记录试剂用量、核酸提取关键步骤操作时间。不同处理间蛋白质含量和核酸含量利用紫外分光光度计测定,计算的公式如下:

蛋白质含量 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) =  $\text{asb}(260\ 0)\text{ nm} \times (-757.29) + \text{asb}(280\ 0)\text{ nm} \times 1\ 552\ 00$ ,

核酸含量 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) =  $\text{asb}(260\ 0)\text{ nm} \times (62\ 900\ 00) + \text{asb}(280\ 0)\text{ nm} \times (-36\ 000)$ 。

依据吸光率 (asb) 260/280 值评价核酸纯度及核酸中RNA的含量。通过凝胶电泳鉴定提取DNA的纯度,以图谱条带丰度来直观显示样品核酸中DNA含量与RNA含量的多少,达到评价不同方法

表 1 两种DNA提取方法的比较

Table 1 Comparison between two methods for extraction nucleic acid

| 方法<br>Methods | 样品<br>Sample | asb     |         | asb 260 nm/<br>asb 280 nm | 蛋白质/<br>( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )<br>Content of<br>protein | 核酸/<br>( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )<br>Content of<br>D/RNA | 提取率/%<br>Extraction<br>ratio |
|---------------|--------------|---------|---------|---------------------------|-------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|------------------------------|
|               |              | 260 nm  | 280 nm  |                           |                                                                         |                                                                      |                              |
| I             | 1            | 2 005 0 | 1 409 6 | 2 154 2                   | - 40 928 6                                                              | 51 324 8                                                             | 11 660                       |
|               | 2            | 0 520 3 | 0 379 6 | 2 232 3                   | - 15 812 2                                                              | 11 919 1                                                             | 2 709                        |
|               | 3            | 1 727 5 | 1 209 8 | 2 154 9                   | - 35 826 6                                                              | 44 629 4                                                             | 1 014                        |
| II            | 1            | 0 057 7 | 0 032 1 | 2 304 6                   | - 3 793 2                                                               | 2 138 6                                                              | 0 779 6                      |
|               | 2            | 0 178 3 | 0 099 2 | 2 127 8                   | - 4 167 4                                                               | 6 865 5                                                              | 1 170                        |
|               | 3            | 0 030 7 | 0 016 6 | 2 096 3                   | - 0 457 7                                                               | 1 236 5                                                              | 0 211                        |

注: 小麦叶片未加RNA酶。

Note: Leaves of wheat are not to add RNase

郭景伦等<sup>[9]</sup>提出了一种快速提取植物组织DNA的方法(方法II),经应用于玉米种子胚的DNA提取,认为简便快捷。其缺点是DNA提取产量很低(表1,表2);同时试剂用量不足时蛋白质去除不彻底(表3);且在植物组织RNA含量高的情况下,作用逊色。

在对比2种方法异同、优缺点的基础上,择优组配两者的优点,重建植物组织DNA提取的快速新方法(方法III)。改进方案主要是:用氯仿作为组织研磨液;用氯仿-异戊醇反复提取除去蛋白质;提高氯仿和氯仿-异戊醇用量,最后用RNA酶纯化DNA。具体操作步骤如下。

(1) 提取玉米种子DNA时,玉米胚仁称量后置于Eppendorf离心管中,加入200  $\mu\text{L}$  氯仿,用自制的圆尖头玻棒进行组织研磨。研碎后加300  $\mu\text{L}$  DNA提取液,继续研磨1~2 min,10 000 r/min离心5 min;叶片DNA提取时,取叶片100~200 mg,蒸馏水冲洗后置于研钵中,加入500  $\mu\text{L}$  氯仿进行研磨。叶片组织研碎之后,加入1 500  $\mu\text{L}$  DNA提取液研磨稍许,之后将组织提取液分别装入2~3个

提取DNA优缺点的目的。

## 2 结果与分析

### 2.1 改进方案的选定

陈永强<sup>[10]</sup>介绍的Bendick等<sup>[3]</sup>提出的DNA提取方法(方法I),基本可代表SDS法。在液氮中研磨植物组织材料,加提取液研磨少许之后加入等量氯仿-异戊醇,5 000 r/min下离心5 min,上清液再转入氯仿-异戊醇中以脱除组织蛋白质。两次加入氯仿-异戊醇,具有较好的蛋白质变性失活作用,核酸提取率高(表1)。其缺点是需要高温水浴,低温预冷等方法,耗时长达3 h以上;液体转移多达15次以上,污染器皿多,易造成实验室环境污染;且使用了毒性大的高氯酸钠,有害于研究人员的身体健康。

Eppendorf管,10 000 r/min离心5 min。

(2) 上清液移入300  $\mu\text{L}$  氯仿-异戊醇的Eppendorf管中,摇动约30 s,7 000 r/min离心6 min。

(3) 重复(2)。

(4) 将上清液慢慢滴入提前加入500  $\mu\text{L}$  无水乙醇的Eppendorf管中,轻轻倒置2~3次,使DNA沉淀,12 000 r/min离心6 min。

(5) 去上清液,用体积分数70%乙醇100  $\mu\text{L}$  冲洗沉淀2~3次,风干后加入180  $\mu\text{L}$  0.1  $\times$  SSC溶解,之后加入20  $\mu\text{L}$  10  $\times$  SSC,用紫外分光光度计测定核酸含量。

(6) 在溶解的核酸溶液中加入RNA酶,使其最终质量浓度为50~70 g/L,37  $^{\circ}\text{C}$  保温30 min。

(7) 重复(2)、(4)、(5)步,即可获得植物材料的总DNA。提取完毕的DNA贮存于4  $^{\circ}\text{C}$  备用。

应用本方法提取核酸大约需30 min,纯化DNA大约需40 min,全过程需1 h左右。

### 2.2 氯仿的作用

氯仿是核酸提取中重要的试剂,新方法将其用作研磨液来变性蛋白质。在同一提取液的情况下,使

用氯仿和不使用氯仿的试验结果(表 2)表明,氯仿具有明显变性蛋白质的作用。从表 2 可以看出,氯仿不但具有明显变性蛋白质作用,同时也具有降低核酸含量的负作用。前者是新方法所取之处;后者是方法 II 产量低的原因所在,也是新方法利用方法 I 的提取液进行综合改进的重要方面。

表 2 氯仿对蛋白质的变性作用

| 试剂<br>Reagents        | 样品<br>Samples | asb     |         |         | asb 260 nm/<br>asb 280 nm | asb 280 nm/<br>asb 260 nm | 蛋白质/<br>( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )<br>Protein | 核酸/<br>( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )<br>Nucleic acid |
|-----------------------|---------------|---------|---------|---------|---------------------------|---------------------------|-----------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|
|                       |               | 260 nm  | 280 nm  | 320 nm  |                           |                           |                                                           |                                                               |
| 氯仿<br>$\text{CHCl}_3$ | 1             | 0 305 2 | 0 268 0 | 0 218 7 | 1 756 2                   | 0 5694                    | 10 939 8                                                  | 3 669 4                                                       |
|                       | 2             | 0 306 0 | 0 268 4 | 0 217 6 | 1 739 3                   | 0 574 9                   | 11 930 5                                                  | 3 729 6                                                       |
| CK                    | 1             | 0 465 3 | 0 361 4 | 0 220 8 | 1 738 5                   | 0 575 2                   | 33 126 0                                                  | 10 318 8                                                      |
|                       | 2             | 0 470 0 | 0 363 0 | 0 220 2 | 1 748 9                   | 0 571 8                   | 32 506 5                                                  | 10 569 3                                                      |

2 3 剂量优化

降低核酸提取液中蛋白质含量是有效提取的保证。根据笔者等的试验,针对不同组织的蛋白质含量须将方法 II 中氯仿和氯仿-异戊醇的用量从 100  $\mu\text{L}$  提高到 200~ 300  $\mu\text{L}$ 。在提取玉米种子胚 DNA 时,使用 300  $\mu\text{L}$  氯仿和 300  $\mu\text{L}$  氯仿-异戊醇,能较好地消除蛋白质。成年植物叶片浸出液中常含有大

量水溶性糖和蛋白质,使 asb 260 nm/asb 280 nm 值降低。本方法将氯仿-异戊醇抽提这一步骤重复 2~ 3 次,可使 asb 260 nm/asb 280 nm 值提高至 1.8 以上。以离心后水相与有机相间蛋白质层的厚薄作为判断依据确定重复次数,随着几次用氯仿-异戊醇处理后,该层逐渐变为痕量,说明蛋白质被有效去除(表 3)。

表 3 氯仿-异戊醇用量对蛋白质变性的作用

| 氯仿+ 氯仿-异戊醇/ $\mu\text{L}$<br>Chloroform and<br>chloroform-isoamyl<br>alcohol | 样品<br>Samples | asb     |         | asb 260 nm/<br>asb 280 nm | 蛋白质/<br>( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )<br>Protein | 核酸/<br>( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )<br>Nucleic<br>acid | 核酸提取率/%<br>Extract<br>ratio |
|------------------------------------------------------------------------------|---------------|---------|---------|---------------------------|-----------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|-----------------------------|
|                                                                              |               | 260 nm  | 280 nm  |                           |                                                           |                                                                  |                             |
| 200+ 200                                                                     | 1             | 0 366 9 | 0 238 2 | 1 987 3                   | 6 124 1                                                   | 11 601 0                                                         | 2 630                       |
|                                                                              | 2             | 0 019 7 | 0 009 6 | 1 791 6                   | 2 505 3                                                   | 0 984 0                                                          | 0 062                       |
|                                                                              | 3             | 0 130 2 | 0 106 1 | 1 845 5                   | 4 396 8                                                   | 2 280 3                                                          | 0 518                       |
| 300+ 300                                                                     | 1             | 0 180 4 | 0 116 7 | 2 011 3                   | 1 816 9                                                   | 5 701 6                                                          | 1 290                       |
|                                                                              | 2             | 0 056 0 | 0 028 6 | 1 968 7                   | 1 726 6                                                   | 2 482 3                                                          | 0 564                       |
|                                                                              | 3             | 0 035 3 | 0 019 3 | 2 338 2                   | - 2 624 8                                                 | 1 332 9                                                          | 0 303                       |
| 300+ 300<br>抽提 2~ 3 次<br>Extracting 2- 3 times                               | 1             | 0 129 1 | 0 060 8 | 2 353 6                   | - 11 637 5                                                | 5 659 4                                                          | 1 286                       |
|                                                                              | 2             | 0 143 4 | 0 074 3 | 2 694 7                   | - 19 929 5                                                | 5 445 6                                                          | 1 238                       |
|                                                                              | 3             | 0 124 7 | 0 063 6 | 2 219 2                   | - 6 451 2                                                 | 5 196 2                                                          | 1 181                       |
|                                                                              | 4             | 0 122 0 | 0 065 7 | 2 096 5                   | - 1 829 6                                                 | 4 919 2                                                          | 1 118                       |
|                                                                              | 5             | 0 128 2 | 0 071 5 | 2 068 7                   | 0 778 7                                                   | 4 998 6                                                          | 1 136                       |
|                                                                              | 6             | 0 122 6 | 0 063 8 | 2 121 9                   | - 2 879 3                                                 | 5 107 2                                                          | 1 161                       |
|                                                                              | 7             | 0 084 6 | 0 042 4 | 2 090 9                   | - 1 211 5                                                 | 3 698 1                                                          | 0 840                       |

2 4 琼脂糖电泳

图 1 是用方法 I (第 1, 2 泳道)、方法 II (第 3, 4 泳道)和方法 III (第 5~ 8 泳道)提取的 DNA 进行电泳鉴定纯度的结果。其中,第 7, 8 泳道是氯仿和氯化锂对蛋白质及 RNA 的提取作用。从图 1 可以看出:

(1) 方法 I (第 1 泳道)和方法 III (第 5, 7 泳道)均能获得较高产量的 DNA,说明改进的方法保留了被改进方法的优点。

(2) 经 RNA 酶处理后,方法 I 和方法 III 的 DNA 带整齐(第 2, 5, 6, 8 泳道),无拖带和弥散现象。

(3) 方法 II 未经 RNA 酶处理,含有较多的 RNA (第 3, 4 泳道的下部)。

(4) 不论何种方法,未经 RNA 酶处理的 DNA,均含有一定数量大小不等的 RNA 片段(1, 3, 4, 7 泳道),分布于泳道的中下部。

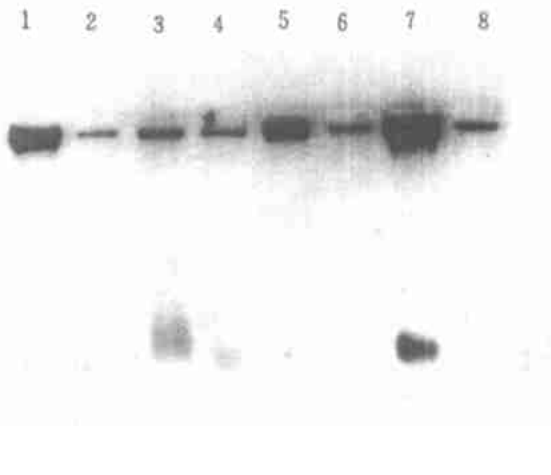


图 1 不同方法提取 DNA 的电泳鉴定纯度结果

1, 2 为方法 I; 3, 4 为方法 II; 5~ 8 为方法 IV

Fig 1 Results of electrophoresis of different methods for extraction DNA

1, 2 methods I; 3, 4 methods II; 5- 8 methods IV

### 3 讨 论

从植物组织中提取核酸时, 必须抑制DNA 酶的水解活性, 以防止其对DNA 的降解。一般的提取方法是先加入提取液进行研磨提取, 并在 72 °C 水浴中保温 3~ 4 min, 以灭活组织内的DNA 酶<sup>[7]</sup>, 并不单独使用氯仿。本试验选用先加氯仿研磨, 再用提取液抽提DNA 的方法<sup>[9]</sup>, 这与在液氮中研磨的原理和效果相似, 延迟了DNA 的释放时间, 减少了研磨期间DNA 酶对DNA 的降解作用, 又能提前使细胞质中释放的蛋白质失活变性, 比在液氮中研磨更为廉价和方便。此方法能使蛋白质和DNA 酶随着其从植物组织中释放而逐渐被氯仿失活变性, 在加入提取液后DNA 集中释放, 其释放后在液体中存留时间短, 使DNA 片段能保持相对完整。另外, 本方法提取核酸时减少了保温、预冷、液体多次转移、长时间离心等程序, 缩短了提取时间, 使核酸提取过程减少到 30 min, 其中从抽提到乙醇沉淀DNA 仅 20 min, 减少了DNA 被DNA 酶降解的机会, 从

而大大缩短了提取核酸的时间, 减少了DNA 被降解和提取液转移时机械损伤的各种机会, 因此可提高DNA 的相对产量和质量。另外, 本方法应用玉米籽粒胚提取DNA, 可免去种子籽粒发芽过程, 能满足作物品种 (玉米杂交种) 纯度鉴定中当即试验和大批量样品鉴定的需要。

在分子生物学实验室中, 防止DNA 的污染是DNA 提取成功的保障。CTAB 法对处理含多糖成分的组织有独特的优点<sup>[11]</sup>, 但提取缓冲液用量大, 使用的盛器多而大, 且必须首先对材料进行研磨, 由于研磨所用器皿一般都不是一次性的, 易构成样品和用具的污染。SDS 法相对于CTAB 法所用器皿少, DNA 污染也小。应用本方法提取玉米籽粒胚中DNA 时, 仅用 3 个 1.5 mL 的 Eppendorf 离心管 (其中 1 个用作保存提取物) 和 1 个自制的圆尖头玻棒, 从而减少了DNA 的污染和传播。另外, 本研究方法不使用对人体有害的试剂, 如酚、高氯酸钠等有毒物质, 不形成污染源。

### [参考文献]

- [1] 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, 1998. 954 - 963
- [2] 奥斯伯 F, 布特伦 R, 金斯顿 R E. 精编分子生物学实验指南 [M]. 北京: 科学出版社, 1998. 7- 38
- [3] Bendick A J, Bolton E J. Relatedness among plants as measured by the DNA -agar technique [J]. Plant Physiol, 1974, 42: 959- 965
- [4] Murry M, Thomas W F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA [J]. Nucleic Acid Res, 1980, 8: 4321- 4325
- [5] 朱 衡, 霍 峰, 朱立煌, 等. 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
- [6] 刘学春, 潘春欣, 宋云枝, 等. 一种单子叶植物总DNA 提取方法的改进与应用 [J]. 山东农业大学学报, 1995, 26 (4): 491- 495
- [7] 刘小勇, 田素荣, 秦国庆, 等. 提取植物和微生物DNA 的 SDS-CTAB 改进法 [J]. 北京林业大学学报, 1997, 19 (3): 100- 104
- [8] McDonald M B. DNA extraction from dry seeds for RAPD analysis in varietal identification studies [J]. Seed Science and Technology, 1994, 22: 174- 177
- [9] 郭景伦, 赵夕然, 尉德铭, 等. 玉米单粒种子DNA 提取新方法 [J]. 北京农业科学, 1997, 15 (2): 122
- [10] 陈永强. 植物组织DNA 提取的一种快速方法 [J]. 遗传, 1979, 10 (1): 39- 40
- [11] Alessio Scarafoni, Marcello D. An approach to the critical assessment of the experimental conditions in practical molecular biology: isolation of plant DNA [J]. Biochemistry and Molecular Biology Education, 2001, 29: 21- 23

## Rapid method for extracting DNA from plant tissues

L I Wei-ping, ZHAO Wen-ming, LEI Ping

(Life Science and Technology college, Xi'an Jiaotong University, Xi'an City, Shaanxi, 710049, China)

**Abstract:** Two methods were selected from various DNA isolated methods for extracting DNA from plant tissues rapidly. Through optimizing the steps, dosage of reagents and manipulating time, a reformative method is formed for extracting DNA rapidly. In our method, chloroform is replaced with liquid nitrogen, extracting reagent in which plant tissues are skived was added, chloroform-isoamyl alcohol is used to extract DNA repeatedly, high yield of DNA is gained. Using RNase, varified DNA could be obtained. The trait of the method is simple to apply in room temperature, time-saving (30 min), less polluting, adaptable for extracting DNA from different plant materials and effective.

**Key words:** DNA; extraction and isolation method; plant tissues