

植物总 DNA 提取方法的改进

王文斗, 段英俊, 那冬晨 (山西师范大学生命科学学院, 山西临汾 041004)

摘要 [目的]改进植物总 DNA 的提取方法。[方法]采用 2 种研磨方式进行植物 DNA 提取效果的比较。[结果]2 种研磨方式所得 DNA 质量都较高,可用于后续分子生物学研究;采用研磨缓冲液提取的 DNA 得率高于液氮研磨。[结论]该方法降低了 DNA 的提取成本,是一种经济实用的 DNA 提取方法。

关键词 DNA 提取;研磨缓冲液;经济实用

中图分类号 S188 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2013)24-09913-01

Improvement of Extraction Method of Total DNA from Plant

WANG Wen-dou et al (College of Life Science, Shanxi Normal University, Linfen, Shanxi 041004)

Abstract [Objective] The aim was to improve the extraction method of total DNA from plant. [Method] Two kinds of grinding method of DNA extraction were compared in extraction effects. [Result] The quality of DNA extracted by the two kinds of grinding method was good, and the DNA could be used in the follow-up molecular biology study; the DNA extraction yield of grinding buffer grinding was higher than that of liquid nitrogen grinding. [Conclusion] The method could reduce the cost of DNA extraction, and was an economical and available method for DNA extraction.

Key words DNA extraction; Grinding buffer; Economical and available

DNA 提取是植物分子生物学研究的基础和起点, DNA 质量是进行后续分子生物学研究的保证。目前, DNA 的提取方法有 CTAB 和 SDS 法, 提取之前需用液氮充分研磨植物材料, 以保证 DNA 的提取质量。而液氮需贮藏在特殊的容器(液氮罐)中, 价格昂贵, 且运输和使用时具有一定的危险性。该试验在低温下利用研磨缓冲液研磨, 不需液氮即可充分研磨植物材料, 减少了 DNA 的提取成本, 且提取的 DNA 质量较高, 能满足后续分子生物学研究。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 供试材料。费菜、华北景天、垂盆草、八宝、小麦的叶片。

1.1.2 主要试剂。研磨缓冲液[1.4 mol/L 的 NaCl; 0.1 mol/L 的 Tris-HCl (pH 8.0); 0.02 mol/L 的 EDTA (pH 8.0)]; 4% CTAB 提取缓冲液; 氯仿、异戊醇、无水乙醇、ddH₂O。0.1 × TE; 0.5 × TBE; Loading buffer。

1.1.3 主要仪器。微量移液器、离心机、电泳仪、凝胶成像系统。

1.2 方 法

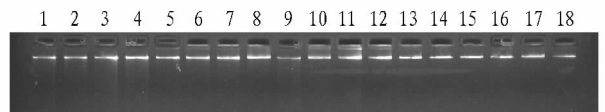
1.2.1 植物总 DNA 的提取。①将植物材料放入预冷的研钵中, 加入适量预冷的研磨缓冲液, 迅速研磨成浆; ②吸取 200 μl 植物浆液, 加入等体积 65 °C 预热的 4% CTAB 提取缓冲液, 65 °C 水浴 20 min; ③取出离心管, 冷却至室温, 加入 400 μl 氯仿:异戊醇(24:1, V/V), 轻柔摇动离心管, 使之充分作用 15 min; ④12 000 r/min 离心 10 min, 取上清, 移入另一新离心管; ⑤加入等体积的氯仿:异戊醇(24:1), 轻柔摇动离心管, 使之充分作用 15 min; ⑥重复第④步骤; ⑦在上清液中, 加入 2 倍体积预冷的无水乙醇, 轻柔颠倒, 充分混匀, 室温放置 10

min; ⑧12 000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 用 70% 的乙醇洗涤沉淀 2 次; ⑨室温挥发乙醇, 加入适量的 0.1 × TE 溶解。

1.2.2 电泳检测。取 3 μl 提取的植物总 DNA, 加入 2 μl Loading buffer, 在 2% 琼脂糖凝胶中电泳, 检测 DNA 的质量。

2 结果与分析

该试验采用 2 种研磨方式(液氮研磨和利用研磨缓冲液研磨)提取了费菜、华北景天、垂盆草、八宝、小麦的基因组 DNA, 电泳结果如图 1 所示。从电泳结果可看出, 2 种研磨方式所得 DNA 质量都很高, 无拖尾现象, 且所得 DNA 完整, 无降解, 均符合后续分子生物学研究的要求。采用研磨缓冲液研磨, DNA 得率高, 质量好。



注: 1~9. 利用研磨缓冲液研磨; 10~18. 液氮研磨。

图 1 植物总 DNA 电泳结果

3 讨 论

3.1 研磨方式比较 经典植物 DNA 的提取均采用液氮研磨, 以保证总 DNA 的提取质量和数量。该试验将 2 种研磨方式进行了比较, 从 DNA 的质量和得率上看, 采用研磨缓冲液研磨所得 DNA 的质量与液氮研磨的没有差别, 而且得率超过液氮研磨的得率; 从成本上看, 液氮研磨提取成本较高, 需购买液氮罐和液氮, 而研磨缓冲液所需的化学试剂价格便宜; 从操作上看, 液氮研磨具有一定的危险性, 容易冻伤, 而研磨缓冲液研磨不存在任何危险, 且操作方便, 易掌握。总之, 利用研磨缓冲液研磨提取植物总 DNA, 是一种廉价、方便、可行的方法, 可以推广应用。

3.2 植物材料选择 一般来说, 植物总 DNA 提取所用材料为幼嫩组织, 可得到高质量的 DNA。该试验所用植物材料为费菜、华北景天、垂盆草、八宝的新鲜叶片及小麦的老叶片,

作者简介 王文斗(1963-), 男, 辽宁新民人, 副教授, 农业推广硕士, 从事园林植物、园林设计方面的研究, E-mail: 007ndc007@163.com。

收稿日期 2013-07-17

(下转第 9923 页)

法,是因为在使用普通 PCR 程序进行试验的过程中,发现这 2 个基因,无论是完整的开放阅读框,还是截取的短片段目的基因都存在一个不稳定的状态,即在相同药品、相同仪器、相同程序并保证没有试验操作错误的前提下,从前能够扩增出的目的片段会在一个时间点后扩增不出来;或用 *rTaq* DNA 聚合酶筛选退火温度后,更换 *Ex Taq* DNA 聚合酶目的片段也会“消失”。而降落 PCR 虽然在程序的设定上较为麻烦,但省去了退火温度筛选的步骤,而且解决了目的片段突然消失的问题。该试验也存在缺点,即 SOE-PCR 的融合 PCR 时,出现了杂带,这有可能是由于引物设计不够完善,提高最高退火温度可能会改善,但这并不影响后续的凝胶回收或克隆表达的试验。

气肿疽的发病地区呈顽固性,因气肿疽梭菌有芽孢,抵抗力强,存在于土壤中,很难将其彻底消灭^[18]。而且此病发病急,死亡率高,未经治疗死亡率达 100%^[19]。据此可得出,控制或消灭该传染病的最好方法即预防。现有的疫苗为灭活苗和弱毒苗,这些传统疫苗存在保护率低、安全性差、副作用大等弊端^[20],所以,在生物工程高速发展的今天,人们有条件制备气肿疽的生物工程疫苗,以减少该病在畜牧业中带来的损失。*NanA* 基因全长 2 519 kb,编码 772 个氨基酸,编码蛋白为唾液酸酶,该蛋白与疾病的传播及病原体的定殖息息相关,且在气肿疽的感染过程中,与病程的快速发展也有着极其重要的关系。因此此基因表达的蛋白有可能延长病程,减慢气肿疽梭菌在体内的繁殖速度,从而为治疗该病争取时间,另一方面鞭毛蛋白是气肿疽梭菌的重要抗原,在细菌侵染的初期就会对机体起到保护作用。这样神经氨酸酶和鞭毛蛋白 2 种重要抗原所制备疫苗的双重保护,为气肿疽的控制增加了新希望。该试验为制备气肿疽的双表达亚单位疫苗奠定了基础,为疫苗的制备提供了理论依据。

参考文献

- [1] 丁宜宝. 兽用疫苗学[M]. 北京:中国农业出版社,2008:468-470.
- [2] 陆承平. 兽医微生物学[M]. 北京:中国农业出版社,2007:197-198.
- [3] 陈博言. 兽医传染病学[M]. 北京:中国农业出版社,2006:302-304.
- [4] NAGANO N, ISOMINE S, KATO H, et al. Human Fulminant Gas Gangrene

(上接第 9913 页)

提取结果都比较理想。该方法还可用于冷冻植物材料的 DNA 提取。对于一些次生代谢产物较多的植物材料,研磨时可适量加一些 PVP,防止褐化^[1-2],还可有效去除多糖^[3-4],可获得高质量的 DNA。

参考文献

- [1] 邓力超,邱道寿,屠乃美,等. PVP 对烟草基因组 DNA 提取的影响[J]. 广东农业科学,2009(5):37-39.
- [2] 陈瑾,迪丽拜尔·托乎提,郭卫东. 五种提取草珊瑚叶片总 DNA 方法的比较研究[J]. 新疆师范大学学报:自然科学版,2008,27(1):87-89.
- [3] 孔德政,刘芝平,田云芳. 改良 CTAB 法对碗莲叶片基因组 DNA 提纯效

- Caused by *Clostridium chauvoei* [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2008,46(4):1545-1547.
- [5] 金鑫,鲁承,许玲玲,等. 气肿疽灭活苗的制造[J]. 延边大学学报,1998(5):31.
- [6] MAYUML,蒋玉文. 抗气肿疽梭菌鞭毛单克隆抗体的生产鉴定及保护作用[J]. *Infection and Immunity*,1987,55(8):1779-1783.
- [7] VILEI E M, JOHANSSON A, SCHLATTER Y, et al. Genetic and functional characterization of the *NanA* sialidase from *Clostridium chauvoei* [J]. *Veterinary Research*,2001,42(2):1186-1297.
- [8] 谷铁军,张凤羽,段治,等. SOE-PCR 合成狂犬病毒单链抗体基因 Fv57 [J]. *生物技术*,2011,21(3):36-39.
- [9] 张艳丽,张文卿,徐腾飞,等. 利用 SOE-PCR 技术构建 *eglAp-rhIL-12* 融合基因的条件优化[J]. *青岛大学医学院学报*,2012,48(2):101-104.
- [10] 钟志成,黎斌耀,朱利,等. 一种可用于多 DNA 片段连接的新 SOE-PCR 方法[J]. *热带医学杂志*,2010,10(3):253-257.
- [11] ARNOLD K, BORDOLI L, KOPP J, et al. The SWISS-MODEL Workspace: A web-based environment for protein structure homology modeling [J]. *Bioinformatics*,2006,22:195-201.
- [12] ZDOBNOV E M, APWEILER R. InterProScan - an integration platform for the signature - recognition methods in InterPro [J]. *Bioinformatics*, 2001,17(9):847-848.
- [13] 张维铭. 现代分子生物学实验手册[M]. 北京:科学出版社,2008:78-79.
- [14] 智海东,王云峰,陈洪岩. 我国兽用基因工程研发现状与策略[J]. *动物医学进展*,2011,32(6):174-178.
- [15] 段翠兰. 溶藻弧菌外膜蛋白的抗原性分析及其亚单位疫苗的研制[D]. 湛江:湛江海洋大学,2004.
- [16] 冯胜军,孙万邦. 空肠弯曲杆菌亚单位抗原研究概况及进展[J]. *遵义医学院学报*,2003,26(1):84-88.
- [17] 代雅. 抗 TIR-scFv-EGFP 融合蛋白的构建,表达及特异性研究[D]. 武汉:华中科技大学,2007.
- [18] 马贵平. 气肿疽梭菌毒素的研究[J]. *中国畜禽传染病*,1991(2):46-49.
- [19] HALM A, WAGNER M, JOSEF KÖFER, et al. Novel Real - Time PCR Assay for Simultaneous Detection and Differentiation of *Clostridium chauvoei* and *Clostridium septicum* in Clostridial Myonecrosis [J]. *Journal of Clinical Microbiology*,2010,48(4):1093-1098.
- [20] 韩雪清,刘湘涛. 基因工程疫苗的研究进展[J]. *中国兽医科技*,2003,33(5):1133-1136.
- [21] LIU S Z, ZHANG M, TANG X, et al. Transformation of *Arabidopsis* by Rice *OsWRKY78::GFP* Fusion Gene and Subcellular Localization of *OsWRKY78* Protein [J]. *Agricultural Science & Technology*,2012,13(7):1395-1398.
- [22] 邱道寿,刘晓津,王军,等. TAT PTD - Tachyplesin 融合基因的重叠延伸 PCR 法合成[J]. *安徽农业科学*,2013,41(4):1438-1441.
- [23] 刘佳,黄丛林,吴忠义,等. TAV-CP/CVB-CP/CChMvd 基因片段的融合及其 RNAi 载体的构建[J]. *华北农学报*,2013(1):106-111.

- 果的影响[J]. *沈阳农业大学学报*,2005,36(4):428-431.
- [4] HU Y C, SUN Z H, WANG J, et al. Comparison on Four Extraction Methods of Genomic DNA from *Clematis fasciculiflora* Franch [J]. *Agricultural Science & Technology*,2011,12(10):1420-1423.
- [5] HU Y C, SUN Z H, WANG J, et al. Comparison on four extraction methods of genomic DNA from *Clematis fasciculiflora* Franch [J]. *Agricultural Science & Technology*,2011,12(10):1420-1423.
- [6] 王仕玉,郭凤根,刘芸君,等. 云南岩白菜资源的 DNA 提取和 ISSR 引物筛选[J]. *华北农学报*,2012(S1):24-26.
- [7] 张楠,谢放. 高质量加工番茄基因组 DNA 提取方法的改进[J]. *湖南农业科学*,2011(15):16-17,20.