

蓖麻 DNA 的提取方法综述

尚雨丝^{1,3}, 杨萍萍², 李欢², 季喜梅², 莫贵霜², 雷培², 陈永胜^{2,3*} (1. 内蒙古民族大学农学院, 内蒙古通辽 028042; 2. 内蒙古民族大学生命科学院, 内蒙古通辽 028042; 3. 内蒙古自治区高校蓖麻产业研究中心, 内蒙古通辽 028042)

摘要 介于蓖麻叶片富含多糖、多酚等大分子物质, DNA 的提取比较困难, 文中总结性介绍了近年来提取蓖麻基因组 DNA 的几种主要方法: CTAB 法、SDS 法、磁性微球法、试剂盒法和酚-氯仿法等, 并叙述了对现有的方法进行优化改进所取得的良好效果, 为蓖麻的分子生物学研究提供参考。

关键词 蓖麻 (*Ricinus communis* L.); DNA 提取; 基因组

中图分类号 S188 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2013)32-12541-01

Review on DNA Isolation from *Ricinus communis* L.

SHANG Yu-si et al (College of Agriculture, Inner Mongolia University for Nationalities, Tongliao, Inner Mongolia 028042)

Abstract Castor leaves are rich in macromolecular substances such as polyphenols and polysaccharides. It takes many difficulties for the DNA extraction. Several methods of genomic DNA extraction of castor were summarized: CTAB, SDS, magnetic microspheres method, skin lightening cream method and phenol-chloroform method and so on. The existing methods were optimized to improve the good results, which provide reference for castor molecular biology research.

Key words Castor; DNA extraction; Genomic

蓖麻 (*Ricinus communis* L.) 俗称草麻、大麻子、老麻子等, 属于大戟科 (Euphorbiaceae) 蓖麻属 (*Ricinus*) 植物, 原产于非洲东部, 栽培历史悠久, 是一种传统的油料作物, 为世界十大油料作物之一, 具有特殊的用途和很高的经济价值。蓖麻广泛用于国防、机械、化工、医药、纺织、印染、造纸、榨糖、皮革、化纤、化妆品等行业。我国对蓖麻的研究开始于新中国成立初期, 在 20 世纪 70~80 年代发展较为迅速, 并取得相当的成果。

随着当今生物技术日新月异的迅猛发展, 分子生物学已开始大量运用于植物研究领域, 而植物基因组 DNA 的有效提取, 是进行分子生物学 DNA 试验的前提和基础。目前, 基因组 DNA 的提取方法很多, 如十六烷基三乙基溴化铵 (CTAB) 法^[1]、十二烷基硫酸钠 (SDS) 法^[2] 和提取试剂盒^[3]、磁性微球法^[4]、试剂盒法^[5] 和酚-氯仿法^[6] 等。虽然这些方法可以满足大多数植物基因组 DNA 的提取, 但是对于含有特殊物质的物种, 还需要对现有的方法进行挑选并且经过优化改进才可以取得较好的效果^[7]。笔者介绍了近年来提取蓖麻基因组 DNA 的几种主要方法, 并叙述了对现有的方法进行优化改进所取得的良好效果, 以期对蓖麻的分子生物学研究提供参考。

1 DNA 提取方法

蓖麻叶片富含多糖、多酚等大分子物质, DNA 的提取比较困难, 目前适用于蓖麻基因组 DNA 的提取方法主要有: CTAB 法、SDS 法、磁性微球法、试剂盒法和酚-氯仿法等。

1.1 CTAB 提取法及其优化 CTAB (十六烷基三乙基溴化铵) 是一种阳离子去垢剂, 可溶解细胞膜, 能与核酸形成复合物, 在高盐溶液中 (0.7 mol/L 的 NaCl) 是可溶的, 当降低盐

溶液浓度到一定程度时 (0.3 mol/L NaCl), CTAB 与核酸的复合物从溶液中沉淀, 通过离心就可将该复合物同蛋白质、多糖类物质分开, 然后将 CTAB 溶于高盐溶液, 再加入乙醇使核酸沉淀, CTAB 溶于乙醇中^[8]。

王亚对 CTAB 法进行改良, 在提取缓冲液中加入一定量的 β -巯基乙醇和 PVP, 防止酚类氧化发生褐变^[9]。提取的蓖麻基因组 DNA, 经琼脂糖凝胶电泳检测, 并与 SDS 提取法比较。结果表明, 改良的 CTAB 法比 SDS 法提取的基因组 DNA 条带整齐, 清晰, 纯度高。

1.2 SDS 提取方法及其优化 SDS (十二烷基磺酸钠) 是一种阴离子去垢剂, 在高盐离子浓度下能溶解细胞膜并使蛋白质变性, SDS 与核酸结合形成一种复合物, 该复合物从溶液中沉淀, 通过离心可与蛋白质、多糖类物质分开, 然后加入乙醇使核酸沉淀, SDS 则溶于乙醇中。

黄文霞等参考多种植物的基因组 DNA 提取方法, 通过改良 SDS 方法从蓖麻叶片中提取 DNA, 该方法提取的 DNA 经琼脂糖凝胶电泳检测, 获得的 DNA 条带较亮且无明显拖尾现象^[10]。利用 ISSR 引物对提取的蓖麻基因组 DNA 进行 PCR 检测, 获得清晰稳定的条带。具体的改良方法是: ①采用新鲜蓖麻叶片, 在常温下用石英砂快速研磨, 并将获得的粉末迅速转移到含有抗氧化剂聚乙炔吡咯烷酮 (PVP) 和 β -巯基乙醇的 SDS 提取缓冲液中, 从而避免了叶片在常温下研磨发生褐变。②在进行氯仿: 异戊醇 (24:1, V/V) 抽提之前增加了一次离心去沉淀的步骤, 同时用低浓度的 NaAc 沉淀 DNA, 以促进 DNA 与多糖和其他次生代谢产物的分离, 从而使最后获得的 DNA 比较纯净, 该方法提取的蓖麻基因组 DNA 能够满足 PCR 反应的需要。

1.3 磁性微球提取法 磁性微球法原理是 DNA 在高浓度 NaCl 和聚乙二醇 (PEG) 溶液中被吸附到硅包覆的磁性微球表面。利用外磁场将负载核酸的磁性微球从样品溶液中分

(下转第 12559 页)

基金项目 国家自然科学基金项目 (31160290); 教育部新世纪优秀人才支持计划 (NCET-08-0870); 研究生科研资助项目 (S10136201308)。

作者简介 尚雨丝 (1985-), 女, 辽宁建平人, 硕士研究生, 研究方向: 作物分子生物学。* 通讯作者, 教授, 硕士生导师。

收稿日期 2013-10-10

发芽率及幼苗畸形率的影响跟前人研究相似。

3.2 多倍体与二倍体之间的性状差异 研究多倍体与二倍体之间的差异,能有效辅助多倍体植株的鉴别,并能有效解决染色体鉴别效率低的问题。两者差异归纳起来有以下几个方面:①形态特征方面。四倍体较二倍体叶片变大增厚,叶色加深,片叶重和单位叶面积重均增加,枝条数减少,矮壮,皮木粗糙,叶序不规则等。三倍体的外形介于四倍体、二倍体之间,但枝条数量和生长高度较二者旺盛,枝条直立性与伸长性能好,芽再发性能强,发根性也好,叶片大于亲本二倍体,营养生长旺盛,有交大增产潜力。②组织结构方面。四倍体叶片海面组织显著增厚,栅栏组织和好眼组织薄壁细胞巨大而排列疏松,叶脉维管束厚壁细胞巨大,叶脉粗壮。桑叶气孔的大小随倍数性的增加而变大,单位面积的气孔数量随倍数性的增加而减少。但单位面积的气孔口近似面积,

(上接第 12541 页)

离出来,经适当清洗后,在高 pH 和低盐溶液中脱附即得到纯化核酸。王雅凡等采用溶剂热方法合成 Fe_3O_4 磁性微球,在其表面进行硅包覆,将其应用于蓖麻叶染色体 DNA 提取^[11]。具体方法为:利用透射电子显微镜(TEM),红外光谱仪(FT-IR),振动磁强计(VSM)对合成的磁性微球进行表征,用磁性固相提取法和氯仿-异戊醇抽提法对比,提取蓖麻叶染色体 DNA,最后分别测定 DNA 在 260 和 280 nm 下的吸光度,得到 A_{260}/A_{280} ,并对 2 种方法提取 DNA 的纯度及产率进行了比较。结果表明,合成的硅包覆的磁性微球粒径均匀、具有超顺磁性和高饱和磁含量。对蓖麻叶染色体 DNA 提取发现, A_{260}/A_{280} 达到 1.83,产率为 0.556 mg/g。与传统氯仿-异戊醇抽提法相比,基于硅包覆磁微球的磁固相提取 DNA 方法具有操作简便,周期短,提取率高,不需要有毒的化学试剂,产品纯度高等优点。

1.4 DNA 提取试剂盒法优化 黄凤兰等利用 DNA 提取试剂盒提取蓖麻叶片 DNA 并对其过程进行改良优化,在原试剂盒的操作基础上,对乙醇进行冰预冷,消化时间改为 50 min、采用 60 μ l 洗脱液用量、材料用量改为 100 mg 等 4 项改良处理,并对所提取的基因组 DNA 的浓度和纯度进行了检测,优化后的方法提取到了较高质量的蓖麻基因组 DNA^[12]。

1.5 酚-氯仿法及其优化 酚-氯仿法原理是首先酚使蛋白质变性,同时抑制了 DNase 的降解作用,蛋白分子溶于酚相,而 DNA 溶于水相,氯仿有加速有机相与液相分层的作用,最后用氯仿抽提,去除核酸溶液中的微量酚。对于 SRAP-PCR 扩增效果对模板 DNA 的浓度不敏感,而对其完整性要求很高^[13]。毕川等采用改良的酚-氯仿法提取蓖麻基因组 DNA,在提取剂中增加 PVP 和 β -巯基乙醇的含量,裂解完毕后加入醋酸钠溶液以除去多糖,得到 DNA 的 OD 值为 1.8~2.0,经电泳检测显示条带明亮整齐,无拖尾现象,扩增效果理想,所提取 DNA 的纯度、浓度和完整性均符合 SRAP-

三倍体、四倍体、六倍体都比二倍体大。③细胞结构方面。多倍体细胞均比二倍体大,保卫细胞增大,所含叶绿体数量增加 23%~50%。

参考文献

- [1] 杨新华,杨今后,骆承军. 桑树多倍体育种的回顾与展望[J]. 浙江农业科学,2000(6):306-308.
- [2] 郭展雄,肖更生,苏大道. 秋水仙素处理桑树杂种实生苗诱导四倍体植株的研究[J]. 蚕业科学,1989,15(1):13-16.
- [3] 林强,朱方容,邱长玉,等. 广西四倍体桑种质资源研究进展[J]. 广西农业科学,2009,40(7):923-927.
- [4] 覃初贤,白景彰,黄贤帅,等. 桑种冷藏技术与效果分析[J]. 广西蚕业,2005,42(4):34-36.
- [5] 东成功. 桑树多倍体的研究及其应用[J]. JARQ,1985,18(3):222-228.
- [6] 杨今后. 桑树四倍体的诱导及其应用[J]. 蚕业科学,2004,30(1):6-10.
- [7] 潘一乐. 桑树根尖细胞染色体的检查技术[J]. 蚕业科学,1980,6(3):195-196.

PCR 扩增试验的要求^[14]。

2 小结

随着蓖麻被更多的应用于生产及社会各个领域,对蓖麻进行品种鉴定、遗传分析、种质资源鉴定等研究也会更多更广^[15],各国在蓖麻资源综合开发方面的专利,正以每年 250 多项的速度增加,尤其在分子生物学方面进展极为迅速。对蓖麻 DNA 的提取纯度的要求也越来越高, DNA 提取方法的改进需求已然成为重要研究方向。

参考文献

- [1] 宋艳波,吴国良,牛洪斌. 改良 CTAB 法在核桃叶片基因组 DNA 提取中的应用研究[J]. 山西农业大学学报:自然科学版,2011,31(2):109-112.
- [2] 卢东柏,李晓方,刘志霞. 改良 SDS 法提取棉花基因组 DNA 研究[J]. 广东农业科学,2008(5):23-25.
- [3] 王爱迪,冉晓华,陈磊,等. 超强磁性微球提取深加工转基因食品 DNA [J]. 食品科学,2013,34(10):130-133.
- [4] 周旋,王丽,夏曙华,等. 全血 DNA 提取试剂盒改良法[J]. 检验医学与临床,2005(4):168-169.
- [5] 马洪雨,郭金峰,岳永生. 用改进的酚-氯仿法提取鱼类基因组 DNA 效果的分析[J]. 家畜生态学报,2006,27(2):85-87.
- [6] BOSTEIN D, WHITE R L, SKOLNICK M, et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism [J]. Genet, 1980, 32:314-331.
- [7] 樊锦春,黄海涛. 蓖麻的开发利用与栽培技术[J]. 上海农业科技,2003(1):90-92.
- [8] 蒋细旺,包满珠,李智崎,等. 菊花 DNA 提纯方法的优化[J]. 江汉大学学报,2002,19(3):42.
- [9] 王亚. 蓖麻单雌性状的 ISSR 分析[D]. 太原:山西大学,2010.
- [10] 黄文霞,何觉民,朱宏波. 一种适于 PCR 扩增的蓖麻基因组 DNA 提取方法[J]. 中国农学通报,2007,23(11):61-63.
- [11] 王雅凡,黄艳凤,杨华,等. 制备硅包覆的磁性微球用于蓖麻叶 DNA 的提取[J]. 现代生物医学进展,2010,17(10):3205-3208.
- [12] 黄凤兰,郭志强,孟凡娟,等. 试剂盒法提取蓖麻基因组 DNA 的条件优化[J]. 内蒙古民族大学,2010,25(1):29-33.
- [13] 黄文霞,何觉民,朱宏波. 一种适于 PCR 扩增的蓖麻基因组 DNA 提取方法[J]. 中国农学通报,2007,23(11):61-63.
- [14] 毕川,刘思洁,余晓琴,等. 蓖麻纯合骨干亲本的亲缘关系分析[J]. 广东农业科学,2010(8):191-193.
- [15] 任玉,王得无,张银东. 相关序列扩增多态性(SRAP)——一种新的分子标记[J]. 中国农学通报,2004,20(6):11-13.