

侯泽菁,常迺滔.用改良 SDS 法提取适于 PCR 扩增的小麦基因组 DNA[J].江苏农业科学,2014,42(5):49-51.

用改良 SDS 法提取适于 PCR 扩增的小麦基因组 DNA

侯泽菁,常迺滔

(沈阳农业大学植物保护学院,辽宁沈阳 110866)

摘要:由于 PCR 技术已经被广泛地应用于小麦分子生物学研究领域中,因此建立一种适合 PCR 扩增的 DNA 快速提取方法十分必要。对传统的 SDS 提取法进行改良和优化后,经检测发现,改良后的 SDS 提取法提取的小麦基因组 DNA 产量高、纯度好,适用于 PCR 分析。与传统的 CTAB 法相比,改良的 SDS 方法的特点是快速、试验成本低、污染少、可在室温下简便操作,因此研究结果为大批量 DNA 样品的提取提供了参考。

关键词:小麦;DNA 提取;SDS;PCR

中图分类号: S512.101 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)05-0049-02

小麦(*Triticum aestivum*)是全世界主要的粮食作物之一,是世界上产地分布范围最广、栽培面积最大、总产量最高的作物^[1]。随着现代分子生物学的发展和完善,科学工作者们利用分子生物学相关手段对小麦的品种、产量、品质、抗病性等方面做了大量深入的研究工作,比如遗传多样性^[2]、分子标记辅助选择^[3]、分子标记定位^[4]、转基因后代的检测^[5]等。上述研究的发展依靠准确、稳定可靠的 DNA 遗传标记,而多数分子标记研究所需的 DNA 量较多,甚至需要整个基因组。小麦庞大的基因组使得分子标记技术在小麦上的应用落后于其他农作物,因此简便、快捷、高效的 DNA 提取方法是从分子水平上推进小麦相关研究发展的必要前提^[6-7]。SDS 法、CTAB 法是最为常用与有效的植物基因组 DNA 提取方法^[8]。近年来也出现了其他 DNA 提取方法,如高盐低 pH 值法^[9]、异硫氰酸胍法^[10]、尿素法^[11]等,这些方法各有优缺点,且多数步骤繁琐、耗时长,不适用于大批量单株小麦基因组 DNA 的提取。本研究在综合分析多种提取方法的基础上,对 SDS 法进行改进,以期建立一个低成本、高质量、少污染的快速提取方法,在保证 DNA 提取质量的同时简化操作步骤、降低试验成本,最终用于大批量的样本 DNA 提取。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

1.1.1 试验材料 小麦种子中国春由沈阳农业大学植物保护学院提供。用穴盘播种,取 3~4 周苗龄的小麦植株。

1.1.2 试验试剂 CTAB 提取液:20 g/L CTAB,100 mmol/L Tris-HCl(pH 值 8.0),20 mmol/L EDTA(pH 值 8.0),1.4 mol/L NaCl(pH 值 8.0),20 g/L PVP,2% β -巯基乙醇;SDS 提取液:1 mmol/L Tris-HCl(pH 值 8.0),5 mmol/L NaCl,0.5 mmol/L EDTA(pH 值 8.0),20% SDS;1×TE 缓冲

液:10 mmol/L Tris-HCl(pH 值 8.0),1 mmol/L EDTA(pH 值 8.0);其他试剂:氯仿-异戊醇(体积比 24:1);70%乙醇;无水乙醇(-20℃);RNAase(1 mg/mL);3 mol/L 醋酸钠(pH 值 5.2)。

1.2 试验方法

1.2.1 改良的 SDS 方法 (1)取 0.1 g 新鲜的小麦叶片,将其尽可能剪成细小的片段,置于 1.5 mL 离心管中,先加入 300 μ L SDS 提取液,用圆尖头玻璃棒(玻璃棒的圆尖头与离心管底部吻合)或镊子研磨,再加入 300 μ L 在 65℃条件下预热的 SDS 提取液,65℃水浴 30 min,其间颠倒 3~4 次;(2)加入等体积的氯仿-异戊醇(24:1),混匀,10 000 r/min 离心 10 min,取上清液;(3)重复步骤(2);(4)取上清液,加入 1/10 体积的乙酸钠和 2 倍体积的冷无水乙醇(-20℃),混匀并静置 20 min(-20℃),10 000 r/min 离心 10 min,倒掉液相后用 70%乙醇冲洗 2 次沉淀后干燥,将干燥的 DNA 样品溶于 40 μ L 1×TE 中;(5)在溶解的 DNA 中加入 1 μ L RNAase(1 mg/mL),37℃水浴 30 min,-20℃保存备用。

1.2.2 对照方法——CTAB 法 (1)取 0.1 g 新鲜的小麦叶片置于预冷的研钵中,加入适量的液氮,快速磨碎后转入 1.5 mL 离心管中,加入 600 μ L CTAB 提取液,65℃水浴 1 h,其间颠倒 3~4 次;(2)加入等体积的氯仿-异戊醇(24:1),混匀后于 10 000 r/min 离心 10 min,取上清液;(3)重复步骤(2);(4)取上清液,加入冷无水乙醇(-20℃),混匀后静置 20 min(-20℃),10 000 r/min 离心 10 min;(5)倒掉液相,加入 350 μ L 1×TE 和 10 μ L RNAase(1 mg/mL),37℃水浴 30 min;(6)加入等体积氯仿-异戊醇(24:1),颠倒混匀后于 10 000 r/min 离心 10 min;(7)加入 1/10 体积的醋酸钠、2 倍体积的冷无水乙醇(-20℃),混匀后静置 20 min(-20℃),10 000 r/min 离心 10 min;(8)倒掉液相,用 70%的乙醇冲洗 2 次后干燥,将干燥的 DNA 样品溶于适量 1×TE,-20℃保存备用。

1.2.3 电泳检测 取 5 μ L DNA 样品和 2 μ L 上样缓冲液(0.25%溴酚蓝和 40%蔗糖)混匀,在 0.8%琼脂糖凝胶电泳中检测,缓冲液为 1×TAE,电压 80 V,电泳 40 min 后,EB 染色,于紫外凝胶成像系统下观察、照相。

1.2.4 紫外分光光度计测 DNA 纯度和浓度 用紫外分光光

收稿日期:2013-09-11

基金项目:辽宁省科学基金(编号:200623116)。

作者简介:侯泽菁(1987—),女,天津人,硕士研究生,从事小麦病害分子生物学方面的研究。E-mail:hzjt007@163.com。

通信作者:常迺滔,博士,副研究员,主要从事小麦病害分子生物学方面的研究。E-mail:naitaochan@163.com。

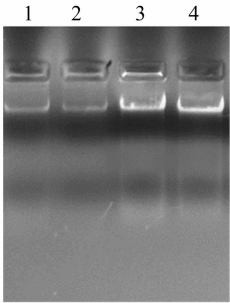
度计 (Thermo NanoDrop 2000) 测定 DNA 的浓度及 $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 、 $D_{260\text{ nm}}/D_{230\text{ nm}}$ 的比值以确定 DNA 纯度。 $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 的数值在 1.8~2.0 (不含 1.8) 之间,说明 DNA 纯度较高、蛋白质和 RNA 污染较少; $D_{260\text{ nm}}/D_{230\text{ nm}}$ 的数值 >2.0,说明样品中残存的盐类物质较少。

1.2.5 PCR 扩增及产物检测 从 Torada 等报道的 SSR 标记研究^[12] 中,随机选取 5 对引物 (barc232; wmc291; wmc11; gwm153; gwm455) 作为试验引物,PCR 反应在 T - gradient Thermal Cycler PCR (bio - metra) 仪上完成。PCR 反应体系 (总体积 25 μL): 2.5 μL 10 \times PCR buffer, 2 μL 20 mmol/L Mg^{2+} , 0.5 μL 10 mmol/L dNTP, 各 3 μL 2 $\mu\text{mol/L}$ Primer, 3 μL DNA (20 ng), 0.5 μL *Taq* 酶 (2 U), 10.5 μL ddH₂O。扩增反应程序: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 4 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 0.5 min, 50~60 $^{\circ}\text{C}$ (根据引物各自的特性) 退火 1 min, 73 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 30 个循环; 73 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min; 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。PCR 扩增产物通过 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。

2 结果与分析

2.1 小麦基因组 DNA 的完整性检测结果

从小麦 DNA 的琼脂糖凝胶电泳分析图谱 (图 1) 看出,用改良后的 SDS 方法提取的小麦基因组 DNA 基本无降解,点样孔无残留,无 RNA 污染,条带清晰明亮,产量高。对照 CTAB 法,2 种方法所得基因组 DNA 带型基本一致,但 CTAB 法提取的 DNA 主带较弱,原因可能是抽提次数较多,导致 DNA 产量下降。



1、2泳道: CTAB法提取的DNA;3、4泳道: 改良的 SDS法提取的DNA

图1 2种方法提取的小麦基因组DNA琼脂糖凝胶电泳图

2.2 小麦基因组 DNA 的纯度和浓度

紫外分光光度计测 DNA 纯度和浓度的结果 (表 1) 表明,用改良后的 SDS 法提出的 DNA $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 数值在 1.8~2.0 范围内, $D_{260\text{ nm}}/D_{230\text{ nm}}$ 数值也接近 2.0,说明提取的小麦 DNA 纯度高、杂质少,且 DNA 浓度均大于 CTAB 法获得的 DNA 浓度。

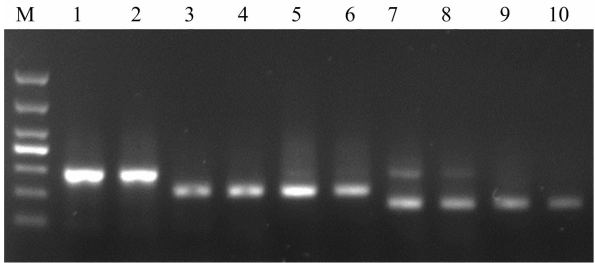
结合紫外检测和电泳检测的结果,改良的 SDS 法提取的 DNA 与 CTAB 法提取的 DNA 的纯度基本一致,但产量相对较高。

表 1 提取小麦基因组 DNA 的纯度和浓度

编号	$D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$	$D_{260\text{ nm}}/D_{230\text{ nm}}$	DNA 浓度 (ng/ μL)
1 (CTAB 法)	1.87	2.11	542.6
2 (CTAB 法)	1.83	2.05	445.9
3 (SDS 法)	1.91	1.99	1 207.1
4 (SDS 法)	1.89	2.01	1 116.5

2.3 PCR 检测结果

用 5 对不同 SSR 引物对改良的 SDS 法与传统的 CTAB 方法所提取的 DNA 进行 PCR 扩增,电泳检测结果如图 2 所示,可见 2 种方法均能得到稳定、清晰可辨的谱带,表明改良的 SDS 提取法提取的 DNA 质量好、纯度高,可以满足一般 PCR 扩增的需要。



M: MarkerDL2000; 1、3、5、7、9泳道为CTAB法提取的DNA 扩增结果; 2、4、6、8、10泳道为改良的SDS法提取的DNA 扩增结果; 引物顺序: 1、2泳道为barc232; 3、4泳道为wmc291; 5、6泳道为wmc11; 7、8泳道为gwm153; 9、10泳道为gwm455

图2 PCR扩增产物电泳图

3 结论与讨论

一般来说,CTAB 法对处理含糖多成分的植物组织有独特的优势^[13],广泛应用于植物基因组 DNA 的提取;SDS 法在植物基因组 DNA 的提取中应用较少。传统的 CTAB 法操作繁琐,试剂消耗量大,并且使用器皿多,研磨器皿等需要重复利用,易造成样品污染;虽然得到的 DNA 纯度较高,但产率较低^[14]。改进的 SDS 法操作简单,省略了液氮研磨和研钵遇冷的步骤,仅需要几个离心管和圆尖头玻璃棒或镊子,减少了 DNA 的污染,且所需试剂种类少、消耗量小,降低了试验成本。另外,本试验方法避免使用酚、高氯酸钠、异硫氰酸胍等有毒试剂,减少了人体伤害和环境污染。

本研究通过紫外分光光度计、琼脂糖凝胶电泳、PCR 扩增进行研究,并用传统的 CTAB 方法做对比,结果表明改良的 SDS 方法所提取的小麦基因组 DNA 的浓度和纯度均能满足普通的 PCR 扩增试验,可用于群体中大批量单株小麦的 DNA 提取。

参考文献:

[1] 彭居刚,何中虎. 近期国际和国内小麦形势分析[J]. 麦类作物学报,2009,29(1):179-182.
[2] Prasad M, Varshney R K, Roy J K, et al. The use of microsatellites for detecting DNA polymorphism, genotype identification and genetic diversity in wheat[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2000, 100 (3/4): 584-592.
[3] Briney A, Wilson R, Potter R H, et al. A PCR - based marker for selection of starch and potential noodle quality in wheat[J]. Molecular Breeding, 1998, 4(5): 427-433.
[4] Anderson J A, Stack R W, Liu S, et al. DNA markers for Fusarium head blight resistance QTLs in two wheat populations[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2001, 102(8): 1164-1168.
[5] 徐惠君, 庞俊兰, 叶兴国, 等. 基因枪介导法向小麦导入黄花叶病毒复制酶基因的研究[J]. 作物学报, 2001, 27(6): 688-693.
[6] 师丽红, 杨文香, 刘大群. 小麦基因组的一种简易提取方法[J]. 中国农学通报, 2010, 26(19): 22-26.

徐俊华. 玉米 *ZmCIPK* 基因的克隆及表达分析[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(5): 51–53.

玉米 *ZmCIPK* 基因的克隆及表达分析

徐俊华

(淄博职业学院, 山东淄博 255314)

摘要:根据玉米 *CIPK* 基因 EST 序列设计引物, 采用 RT-PCR 技术从玉米中克隆了 1 个 *ZmCIPK* 基因。分析结果表明, *ZmCIPK* 基因 cDNA 全长 1 748 bp, 5′-非编码区长 115 bp, 3′-非编码区长 508 bp, 编码区长 1 125 bp, 编码 374 个氨基酸, 预测分子量为 41.72 Ku, 等电点为 6.96。氨基酸同源性分析发现, *ZmCIPK* 蛋白与高粱的 *CIPK* 蛋白同源性较高。实时定量 PCR 检测表明, *ZmCIPK* 基因的表达受盐胁迫和低温诱导, 说明玉米 *ZmCIPK* 基因可能参与玉米对逆境胁迫的应答。

关键词:玉米; *ZmCIPK* 基因; 表达模式; 逆境

中图分类号: Q786 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)05-0051-03

真核细胞中钙 (Ca^{2+}) 是普遍存在的第二信使, 在信号传导过程中具有重要的作用^[1]。 Ca^{2+} 信号通过 Ca^{2+} 结合蛋白进行传递。目前存在 3 类 Ca^{2+} 结合蛋白: 钙调素^[2]及类钙调素蛋白^[3] (calmodulin and calmodulin-like proteins)、钙依赖性蛋白激酶^[4] (Ca^{2+} -dependent protein kinases, CDPK) 和类钙调磷酸酶 B 蛋白^[5] (calcineurin B-like protein, CBLs)。CBL 蛋白自身不具有功能, 必须与 CIPK (CBL-interacting protein kinase) 结合才具有功能。在植物中, CIPK 是由多基因家族编码的一类具有丝氨酸/苏氨酸结合位点的蛋白激酶^[1]。前人研究发现拟南芥有 25 个 *CIPK* 基因^[6], 水稻有 30 个 *CIPK* 基因^[7]。CIPK 在植物逆境胁迫应答中具有重要的功能。例如, 过量表达玉米 *ZmCIPK16* 提高转基因拟南芥的耐盐能力^[8]。玉米是重要的粮食作物和饲料来源。干旱、高盐和低温等逆境胁迫严重影响玉米的产量和品质。通过转基因方法, 将逆境相关基因转化玉米, 是提高玉米抗逆性的有效方法之一。本研究利用 RT-PCR 方法从玉米中克隆了 1 个 *ZmCIPK* 基因, 利用实时定量 PCR 方法分析了 *ZmCIPK* 基因在不同逆境胁迫下的表达模式, 为进一步分析 *ZmCIPK* 基因在逆境胁迫中的功能提供依据。

收稿日期: 2014-01-07

基金项目: 淄博职业学院科技基金 (编号: KJ13306)。

作者简介: 徐俊华 (1968—), 女, 山东人, 硕士, 讲师, 主要从事生物学、动植物学、微生物学等学科的教学与研究。E-mail: 1697986428@qq.com。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料为玉米品种旱玉 5 号。

1.2 方法

1.2.1 材料处理 种子经 0.1% HgCl_2 消毒 15 min, 并用蒸馏水冲洗 3 遍, 播种于装有蛭石的盒子中, 在培养箱中以 28 °C、16 h 光照→22 °C、8 h 黑暗的条件培养至 3 叶期。对 3 叶期的玉米分别进行脱水干旱、300 mmol/L NaCl、低温 (4 °C) 胁迫处理, 分别取处理后 0、1、2、6、12、24 h 的叶片, 立即经液氮冷冻, -80 °C 保存备用, 供提取总 RNA。

1.2.2 RNA 提取及 cDNA 第一链的合成 根据 RNA 提取试剂 TRIzol (Invitrogen) 的操作说明提取不同胁迫处理的玉米叶片总 RNA, 总 RNA 用 DNase I (Invitrogen) 处理, 去除基因组 DNA。按照反转录试剂盒 (Invitrogen) 的操作步骤合成 cDNA 第一链, 产物作为基因克隆和荧光定量 PCR 的模板。

1.2.3 *ZmCIPK* 全长 cDNA 的克隆及分析 根据 *ZmCIPK* 拼接序列设计 1 对特异引物, *ZmCIPK*-F: 5′-TGTTTCCGT-TCCCAATCCCCTT-3′ 和 *ZmCIPK*-R: 5′-ACTGGATAAA CGATTTATTTCTTA-3′, 以玉米叶片 cDNA 第一链为模板, 扩增基因全长 cDNA。50 μL 体系中含 cDNA (20 ng/μL) 1 μL, 2×GC-PCR buffer 25 μL, dNTP (10 mmol/L) 2 μL, 引物 (25 μmol/L) 1 μL 和 LA-Taq (5 U/μL) 0.5 μL (TaKaRa), ddH₂O 补足 50 μL。PCR 程序为: 94 °C 预变性 4 min; 94 °C

[7] 王长有, 吉万全, 薛秀庄. 分子标记技术在小麦遗传育种中的应用现状[J]. 麦类作物学报, 2000, 20(4): 75–80.

[8] 思彬彬, 张超, 徐如宏, 等. 小麦基因组 DNA 改良提取方法的探讨[J]. 山地农业生物学报, 2005, 24(2): 142–145.

[9] 许理文, 王风格, 赵久然, 等. 高盐低 pH 值法提取玉米基因组 DNA 的研究[J]. 玉米科学, 2009, 17(1): 59–61, 70.

[10] 雷开荣, 石春焱, 李明顺, 等. 一种玉米叶片基因组 DNA 快速提取新方法的初步研究[J]. 华北农学报, 2006, 21(2): 10–12.

[11] 曹文波, 郑璐璐, 谢文海. 一种提取植物基因组 DNA 的方法——改良尿素法[J]. 华中师范大学学报: 自然科学版, 2008,

42(3): 448–451.

[12] Torada A, Koike M, Mochida K, et al. SSR-based linkage map with new markers using an intraspecific population of common wheat[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2006, 112(6): 1042–1051.

[13] Alessio S, 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, 2008, 29(1): 21–23.

[14] 李维平, 赵文明, 雷萍. 一种少量提取植物组织 DNA 的快速方法[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2002, 30(6): 125–128.