

张晓波,许沛东,赵 艳. 野牛草基因组 DNA 提取方法的筛选[J]. 江苏农业科学,2014,42(8):26-28.

# 野牛草基因组 DNA 提取方法的筛选

张晓波,许沛东,赵 艳

(海南大学农学院,海南海口 570228)

**摘要:**采用十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)法、十二烷基磺酸钠(SDS)法以及高盐法 3 种方法对野牛草叶片的基因组 DNA 进行提取,并利用分光光度计和琼脂糖凝胶电泳检测比较 3 种方法提取 DNA 的纯度与浓度。结果表明,3 种方法提取到的野牛草叶片 DNA 的纯度、完整性都较好,质量从高到低依次为 CTAB 法 > 高盐法 > SDS 法,产率依次为 SDS 法 > CTAB 法 > 高盐法,综合来看 CTAB 法是提取野牛草基因组 DNA 的最佳方法。

**关键词:**野牛草;DNA 提取;CTAB 法;SDS 法;高盐法

**中图分类号:**S688.403 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2014)08-0026-03

野牛草是广泛种植于我国西北、华北及东北地区的暖季型草坪草,在 20 世纪 50 年代初由中科院胡淑良先生从美国引进<sup>[1-2]</sup>。野牛草耐旱性强,在年降水量 300~600 mm 的干旱、半干旱地区也可以正常生长,在持续干旱 2~3 个月的夏季生长状况依旧良好。野牛草喜 pH 值为 6.1~8.0 的黏质土壤,但在高原丘陵瘠薄土壤上也可顽强生长;野牛草具有较强的耐寒性,在我国北方大部分地区都可越冬,甚至在西北、东北的寒冷地带 -39℃ 的低温条件下也可以正常越冬<sup>[3-6]</sup>。由于野牛草良好的抗逆性,应用广泛,对其研究也越来越多,但主要集中在品种选育<sup>[7-9]</sup>和抗逆性<sup>[3,10-12]</sup>的研究方面,而对野牛草基因组 DNA 的研究相对较少。然而,对于我国这个水资源平均占有量不足世界平均水平 1/4,被联合国列入世

界 13 个贫水国之一的国家来说<sup>[13]</sup>,收集优质草坪种质材料,对其生物学特征及遗传多样性进行分析鉴定研究,筛选具有观赏价值和节水环保作用的草坪品种,有着广泛的应用前景和现实意义的。关于植物基因组 DNA 提取方法,国内外都有一定的研究,包括高粱等作物<sup>[14]</sup>、红掌等花卉<sup>[15]</sup>以及狗牙根等草坪草<sup>[16-17]</sup>。本试验结合国内外相关研究,参考 Staub 等的研究方法<sup>[18-20]</sup>,针对野牛草的特性,如叶片纤维含量高,具有绒毛、韧性高的特点,对适合基因组 DNA 提取的十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)法、十二烷基磺酸钠(SDS)法、高盐法 3 种方法进行比较,筛选出最佳方法。旨在为野牛草未来的遗传多样性研究提供一定的参考,同时也为适应我国城市绿化以及西部生态环境建设的需要,培育适合我国国情的环保型耐旱草坪植物奠定一定的基础。

收稿日期:2013-11-11

基金项目:海南大学青年基金(编号:qnjj1149)。

作者简介:张晓波(1978—),男,山西岢岚人,博士,副教授,主要从事草坪管理相关研究。E-mail:angiaoo@126.com。

通信作者:赵 艳。E-mail:yanbo315@126.com。

1 个漆酶 cDNA 全长基因和基因组 DNA 全长序列,这对于今后研究漆酶基因的同源表达、异源表达及蛋白质的纯化奠定了基础。利用 SEFA-PCR 技术在红平菇菌株中克隆 1 个漆酶 5'启动子序列,这对于今后研究红平菇漆酶的表达调控具有十分重要的意义。

## 参考文献:

- [1] Baldrian P. Fungal laccases - occurrence and properties [J]. FEMS Microbiology Reviews, 2006, 30(2): 215-242.
- [2] Faraco V, Giardina P, Sannia G. Metal-responsive elements in *Pleurotus ostreatus* laccase gene promoters [J]. Microbiology, 2003, 149(8): 2155-2162.
- [3] Rushmore T H, King R G, Paulson K E. Regulation of glutathione S-transferase Ya subunit gene expression: identification of a unique xenobiotic-responsive element controlling inducible expression by planar aromatic compounds [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1990, 87(13): 3826-3830.
- [4] Soden D M, Dobson A. Differential regulation of laccase gene expression in *Pleurotus sajor-caju* [J]. Microbiology, 2008, 147(8):

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试材料为中国农业科学院畜牧研究所培育的野牛草品

1755-1763.

- [5] Xiao Y Z, Chen Q, Hang J, et al. Selective induction, purification and characterization of a laccase isozyme from the basidiomycete *Trametes* sp. AH28-2 [J]. Mycologia, 2010, 96(1): 26-35.
- [6] Marzluf G A. Genetic regulation of *Nitrogen metabolism* in the fungi [J]. Microbiological Reviews, 1997, 61(1): 17-32.
- [7] 陈 军, 高大文, 池玉杰, 等. 偏肿拟栓菌 *Pseudotrametes gibbosa* 产漆酶的条件优化 [J]. 菌物学报, 2008, 27(6): 940-946.
- [8] Liu Y G, Chen Y L. High-efficiency thermal asymmetric interlaced PCR for amplification of unknown flanking sequences [J]. Biotechniques, 2007, 43(5): 649-650.
- [9] Treger J M, Magee T R, Mcentee K. Functional analysis of the stress response element and its role in the multistress response of *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1998, 243(1): 13-19.
- [10] Strauss J, Horvath H K, Abdallah B M, et al. The function of CreA, the carbon catabolite repressor of *Aspergillus nidulans*, is regulated at the transcriptional and post-transcriptional level [J]. Molecular Microbiology, 1999, 32(1): 169-178.

系植株。

## 1.2 试验方法

1.2.1 野牛草基因组 DNA 的提取方法 CTAB 法: (1) 取野牛草叶片 3 ~ 5 g, 用蒸馏水洗净, 吸干表面水珠后置于 1.5 mL 离心管中, 加入适量液氮致冷, 研成细粉; (2) 吸取 900  $\mu$ L 提前预热到 65  $^{\circ}$ C 的 CTAB 提取液加入到样品中混匀; (3) 将离心管放入水浴槽中, 在 65  $^{\circ}$ C 的温度下浸提 15 ~ 20 min, 每 2 min 取出充分混匀; (4) 取出冷却后, 加入 500  $\mu$ L 三氯甲烷 - 异戊醇 (24 : 1), 振荡 5 min; (5) 在 6 000 ~ 8 000 r/min 下离心 10 min; (6) 弃上清液, 重复 4 ~ 5 步; (7) 取出上清液后, 加入 1/10 体积的 3 mol/L 醋酸钠和等体积异丙醇, 摇匀至出现白色絮状沉淀; (8) 在 12 000 r/min 下离心 5 min, 弃上清液; (9) 用 75% 乙醇清洗 2 次, 在室温干燥 1 h 后溶于 200  $\mu$ L 的 TE 缓冲液 (2 mol/L Tris - HCl; 0.5 mol/L EDTA), 在 4  $^{\circ}$ C 的温度条件下保存备用。

SDS 法: (1) 取叶片 0.05 ~ 0.1 g, 置于 1.5 mL 离心管中, 适量液氮冷冻后研磨成粉; (2) 加入 400  $\mu$ L 预热至 65  $^{\circ}$ C 的缓冲液 (100 mmol/L Tris - Cl, pH 值 8.0; 50 mmol/L EDTA; 500 mmol/L NaCl; 15 mg/mL SDS; 10 mmol/L 2 - 巯基乙醇; 30 mg/mL PVP); (3) 混匀后置于 65  $^{\circ}$ C 的水浴中 0.5 ~ 1 h; (4) 冷却后, 加入 1/3 体积的 5 mol/L KAC, 置于冰箱 10 min, 取出后再加入 1/3 体积的三氯甲烷/异戊醇, 混匀后离心 10 min; (5) 将上清移至另 1 支加入了等体积预冷异丙醇的离心管中, 轻轻混匀, 在 13 000 r/min 下离心 10 min; (6) 弃上清, 用 70% 乙醇洗涤沉淀 2 次, 在室温下干燥; (7) 加入 50  $\mu$ L TE 溶解沉淀, 经 RNase 酶消化后保存备用。

高盐法: (1) 取 0.05 ~ 0.1 g 叶片, 加入液氮研成粉末后分装于 1.5 mL 的离心管中; (2) 加入 400  $\mu$ L DNA 高盐提取缓冲液 (200 mmol/L Tris - HCl, pH 值 8.0; 2 mmol/L NaCl; 70 mmol/L EDTA, pH 值 8.0), 加入 100  $\mu$ L 5% 肌氨酸钠, 混匀; (3) 放入 65  $^{\circ}$ C 水浴锅中保温 30 min, 其间翻转离心管 2 ~ 3 次; (4) 冷却后在 13 000 r/min 离心 15 min, 取上清液至新离心管中, 加入 RNase 酶 37  $^{\circ}$ C 保温 30 ~ 60 min; (5) 然后加入等体积三氯甲烷/异戊醇 (24 : 1), 混匀, 13 000 r/min 下离心 10 min; (6) 取上清液至新的离心管中, 加入 0.2 倍体积的 10 mol/L  $\text{NH}_4\text{Ac}$  和 0.7 倍体积的异丙醇, 混匀, 放入 -20  $^{\circ}$ C 冰箱中静置 30 min; (7) 在 13 000 r/min 下离心 15 min, 弃上清, 倒置离心管 1 min; (8) 加入 70% 乙醇 500  $\mu$ L 洗涤, 在 13 000 r/min 下离心 2 ~ 3 min, 弃上清液, 重复洗净 2 次, 于室温下晾干; (9) 加入 30 ~ 50  $\mu$ L TE, 65  $^{\circ}$ C 水浴中溶解 30 min, 放入 -20  $^{\circ}$ C 的冰箱中保存备用。

1.2.2 基因组 DNA 纯度检测 制备 0.8% 琼脂糖凝胶, 取 DNA 2  $\mu$ L, 在 1  $\times$  TAE 缓冲液、电场强度 3 ~ 5 V/cm 条件下电泳 60 ~ 90 min。放入紫外灯下观察、拍照, 观察点样孔及整个泳道, 判断 DNA 样品纯度。

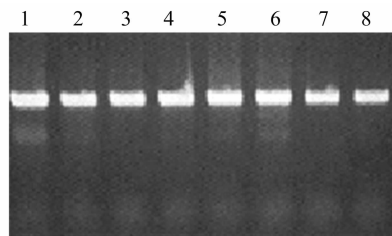
1.2.3 基因组 DNA 总浓度测定 将 4  $\mu$ L DNA 样品和 396  $\mu$ L TE 混匀后, 放入分光光度计中测量并记录 DNA 样品  $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$  值以及 DNA 浓度, 若  $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$  值在 1.8 ~ 2.0 之间时, 说明 DNA 样品纯度好, 适于作 RAPD 分析。同时根据  $D_{260\text{ nm}}$  值为 1 的 DNA 样品浓度为 50 ng/ $\mu$ L 计算 DNA 浓度, 计算公式为:

$$\text{DNA 浓度} = D_{260\text{ nm}} \times \text{核酸稀释倍数} \times 50 \text{ ng}/\mu\text{L}$$

## 2 结果与分析

### 2.1 DNA 电泳检测结果

采用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳对用 CTAB 等 3 种方法提取的 DNA 分别进行纯度检测, 结果 (图 1) 表明, 3 种方法所提取到的 DNA 谱带亮度差异不明显, 观察 DNA 泳道, 背景都比较清晰, 说明 DNA 的完整性较好, 蛋白质、RNA 及其他杂质均比较少, 可以满足 RAPD 试验的要求。检测结果表明 3 种方法都可用于野牛草基因组 DNA 的提取。



1~2—高盐法; 3~5—CTAB 法; 6~8—SDS 法

图1 3种方法提取 DNA 的电泳结果

### 2.2 DNA 总浓度测定结果

试验用 3 种不同提取方法均得到了野牛草叶片的基因组 DNA, 但在纯度和产率上有一定的差别。如表 1 所示, SDS 法产率最高, 达到 310 ~ 375 ng/mg 之间, 但其质量最差,  $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$  值为 1.25 ~ 1.60, 若想到试验要求还须继续纯化; CTAB 法所提 DNA 质量最好,  $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$  比值为 1.76 ~ 1.94, 且产率较高, 达到 240 ~ 360 ng/mg; 高盐法所提 DNA 质量和产率均处于 CTAB 法和 SDS 法之间,  $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$  值为 1.57 ~ 1.82, 产率为 230 ~ 360 ng/mg。综合来看, 3 种方法提取到的野牛草叶片 DNA 的纯度、完整性都较好, 但 CTAB 法提取的  $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$  比值最高, 所以 CTAB 法是提取野牛草基因组 DNA 的最佳方法。

## 3 结论与讨论

获得一定数量和质量的 DNA 样品, 是进行 PCR 等分子生物学试验的前提。目前, 根据研究目的和研究对象的差异, 国内外研究者往往都采取不同的 DNA 提取方法<sup>[21~27]</sup>。其中有使用较通用方法的, 也有针对某一具体物种或针对含多糖、多酚等次生代谢物植物而使用改良方法的。而如果所提取的 DNA 样品用于 PCR 分析, 则 DNA 提取的步骤越少越好, 否则多步骤多试剂容易造成交叉污染, 而 PCR 极其灵敏, 步骤繁多容易影响 PCR 的准确性<sup>[26]</sup>。

本试验针对野牛草叶片纤维含量较高, 具有绒毛、韧性高等特点, 设计采用 CTAB 法、SDS 法以及高盐法分别提取到了野牛草基因组 DNA, 并对 3 种方法进行比较, 对所得 DNA 的浓度和纯度进行了检测。结果表明, 3 种不同的方法均可提取野牛草叶片的基因组 DNA, 但在纯度和产率上却有着明显的差别。SDS 法产率最高, 但质量最差,  $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$  值为 1.25 ~ 1.60, 需要继续纯化才能用于 RAPD 反应; CTAB 法所提取到的 DNA 质量最好, 颜色为白色,  $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$  值为 1.76 ~ 1.93, 且产率较高, 可达 240 ~ 355 ng/mg; 高盐法所提取到的 DNA 质量和产率均介于其他 2 种方法之间。综合

表 1 3 种 DNA 提取方法的 D 值及产率比较

材料	SDS 法		高盐法		CTAB 法	
	$D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$	产率(ng/mg)	$D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$	产率(ng/mg)	$D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$	产率(ng/mg)
1	1.46	370	1.63	270	1.85	250
2	1.47	310	1.82	310	1.76	355
3	1.50	330	1.57	290	1.80	260
4	1.49	340	1.59	265	1.89	240
5	1.60	350	1.75	230	1.93	280
6	1.25	330	1.70	270	1.84	310
7	1.42	340	1.67	300	1.79	280
8	1.45	330	1.81	310	1.87	360
9	1.35	320	1.47	360	1.94	350
10	1.43	375	1.68	340	1.84	310

所述,CTAB 法、SDS 法以及高盐法提取的野牛草叶片基因组 DNA 的纯度和完整性都较好,其中以 CTAB 法提取的 DNA D 值最高。因此,提取野牛草基因组 DNA 的最佳方法是 CTAB 法。

但是,在利用 CTAB 法提取野牛草基因组 DNA 时,需要注意以下几点问题:(1)野牛草叶片的纤维含量较高,且具有绒毛、韧性高等特点,短时间的研磨不能完全破坏野牛草叶片细胞的细胞壁,所以在提取过程用液氮研磨时一定要充分;(2)CTAB 缓冲液一定要现配现用,并且为了使其更好地发挥裂解作用,一定要预热,并在缓冲液中加入 2% PVP;(3)在研磨前加入 2%  $\beta$ -巯基乙醇。如果在温度过高的季节提取,要尽量使用超低温离心机;(4)机械张力极其容易造成 DNA 分子的断裂,所以在抽提过程中,要小心操作;此外,为获得较高浓度的 DNA,可以在吸取上清液减少的前提下,尽量减少抽提次数。

参考文献:

[1]胡叔良. 草坪种植[M]. 北京:北京科学技术出版社,1985.

[2]胡叔良. 禾本科和豆科植物引种驯化的研究[C]//中国草原学会第五次全国学术会议论文编审组. 中国草地科学研究与发展战略. 北京:中国科学技术出版社,1991:261-264.

[3]谭玉霞. 野牛草蒸散量与抗旱性的研究[D]. 兰州:甘肃农业大学,2009.

[4]Beard J B, Kim K S. Low - water use turfgrass[J]. USGA Green Section Record,1989,27: 12-13.

[5]刘彦明. 野牛草的草坪建植与养护管理[J]. 河南林业科技, 2005,25(3):48-50.

[6]Beard J B. Turfgrass: science and culture[M]. NJ:Prentice - Hall Englewood Cliffs,1973.

[7]Riordan T P, Shazer S A, Johnson - Cicalese J M, et al. An overview of breeding and development of buffalograss for golf course turf[J]. Internatioanal Turfgrass Society Research,1993(7): 816-822.

[8]胡晓艳,李 敏,杨青川,等. 坪用野牛草种质资源搜集及品种选育研究进展[J]. 中国草地,2005,27(6):54-60.

[9]Johnson P G, Kenworthy K E, Auld D L, et al. Distribution of buffalograss polyploid variation in the southern Great Plains[J]. Crop Science,2001,41(3):909-913.

[10]张晓波,李 敏,杨青川,等. 野牛草耐寒性研究进展[J]. 草业

科学,2005,22(4):99-102.

[11]谭玉霞,刘荣堂,王显国,等. 12 份野牛草材料蒸散量及抗旱性的研究[J]. 中国草地学报,2010,32(1):40-47.

[12]Mecarty L B, Colvin D L. Buffalograss tolerance to post emergence herbicides[J]. HortScience,1992,27:898-899.

[13]于沪宁,杨晓光. 珍惜自然资源[M]. 南宁:广西教育出版社,1999.

[14]高建明,夏卜咸,杨 洪,等. 4 种高粱基因组 DNA 快速提取方法的比较[J]. 安徽农业科学,2011,39(23):13942-13943,13946.

[15]葛亚英,沈晓岚,田丹青. 红掌基因组 DNA 提取试验[J]. 江苏农业科学,2010(1):64-65.

[16]周少云,黄春琼,刘国道. 狗牙根基因组 DNA 提取方法的比较[J]. 湖南农业科学,2009(11):8-10,14.

[17]黄春琼,刘国道. 3 种暖季型草坪草基因组 DNA 的提取方法[J]. 中国农学通报,2009,25(18):417-419.

[18]Staub J, Bacher J. Sources of potential error in the application of random amplified polymorphic DNA in cucumber[J]. HortScience, 1996,31(2): 262-266.

[19]Doyle J L, Doyle J J. Isolation of plant DNA from fresh tissue[J]. Focus,1990,12: 13-15.

[20]Murray M G, Thompson W F. Rapid isolation of high molecular plant DNA[J]. Nucleic Acids Research,1980,8(19): 4321-4325.

[21]Berthomieu P, Meyer C. Direct amplification of plant genomic DNA from leaf and root plices using PCR[J]. Plant Molecular Biology, 1991,17: 555-557.

[22]Cheng F S, Brown S K, Weeden N F. A DNA extraction protocol from various tissues in woody species[J]. HortScience, 1997, 32(5):921-922.

[23]徐 海,王义伟,陈 瑾,等. T7 噬菌体 DNA 的提取及其反向遗传拯救方法的建立[J]. 江苏农业学报,2012,28(2):355-358.

[24]Steiner J J, Poklemba C J. A rapid one - tube genomic DNA extraction process for PCR and RAPD analysis [J]. Nucleic Acids Research,1995,23(3): 2569-2570.

[25]贺 羽,李 鑫,王有福,等. 苹果球壳孢腐烂病菌 DNA 不同提取方法的比较[J]. 江苏农业科学,2012,40(6):38-40.

[26]王晶晶,高疆生. 不同方法提取葡萄基因组 DNA 的比较[J]. 塔里木大学学报,2010,22(2):41-44.

[27]郝朝运,刘 鹏,郭卫东,等. 忍冬科部分植物 DNA 提取方法的研究[J]. 浙江师范大学学报:自然科学版,2006,29(1):92-98.