

李可凡. 一种棉花 DNA 快速高效简便的提取方法[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(5): 54–56.

doi:10. 15889/j. issn. 1002–1302. 2015. 05. 016

一种棉花 DNA 快速高效简便的提取方法

李可凡

(周口职业技术学院, 河南周口 466001)

摘要:探索了一种提取棉花 DNA 的简便方法, 利用该方法提取的棉花总 DNA 经过分光光度计、琼脂糖凝胶电泳和随机 SSR 引物 PCR 扩增检测, 结果表明, 利用本方法提取的棉花总 DNA 纯度高, 无降解现象, 适用于进行常规 PCR 扩增以及高精度要求的 SSR 扩增。

关键词:棉花; 总 DNA; 提取

中图分类号:Q503 **文献标志码:**A **文章编号:**1002–1302(2015)05–0054–02

棉花是我国重要的经济作物之一, 而棉花 DNA 的提取是棉花基因工程研究中最基本、最重要的操作步骤。由于棉花中富含酚类、多糖、单宁等干扰物质, 在棉花 DNA 提取过程中, 细胞中的棉酚等多种酚类物质氧化与蛋白质、核酸等结合成复合物^[1–2], 从而影响 DNA 的提取率和质量, 进一步影响后续的试验结果。现在已报道的棉花 DNA 提取的方法主要有 SDS 法^[3–4]、CTAB 法^[1, 5–9]、氯仿–异戊醇法^[10–11], 以及在棉花 DNA 提取液中加入 PVP 的 PVP 法^[12–13], 或者在提取液中加入 β –巯基乙醇法^[14] 及用 SDS 和 CTAB 相结合的 SDS–CTAB 法^[15–17], 还有改良的 SDS–CTAB 法^[18–19] 等。因此找到一种快速、高效、简单、便捷且能保证棉花基因组 DNA 质量的 DNA 提取方法一直是广大科研工作人员的迫切需求。本研究在前人研究的基础上进行筛选和改进, 探索出一种适合大批量提取棉花 DNA 的快速、简化方法, 从而提高棉花 DNA 提取的工作效率。

1 材料与方法

1.1 植物材料

植物材料为棉花幼嫩叶片。

1.2 试验设备

直径 3 mm 钢珠, 磁铁, 1.5 mL 离心管, 2 mL 离心管, 移液器, 水浴锅, 高速冷冻离心机, 台式高速离心机, 涡旋仪, 真空干燥机, 紫外可见分光光度计 NanoDrop ND1000。

1.3 主要生化试剂

CTAB、EDTA、Tris–HCl、 β –巯基乙醇、NaCl, 其他化学试剂为国产分析纯。

1.4 棉花总 DNA 的提取方法

1.4.1 DNA 抽提缓冲液 2% CTAB, 100 mmol/L Tris–HCl (pH=8.0)、20 mmol/L EDTA (pH=8.0)、1.4 mol/L NaCl、 β –巯基乙醇。

1.4.2 DNA 提取步骤 (1)取 1 个 3 mm 钢珠放入 2 mL 离心管中, 取新鲜的棉花叶片放入管中钢珠上面, 再在棉花叶片

上面放 1 个 3 mm 钢珠, 盖上离心管盖子。(2)将离心管放入液氮中冷冻 3 min, 取出放置在涡旋仪上振荡粉碎。(3)待离心管中的叶片呈碎末状, 加入定量预热(60 ℃)的 DNA 抽提缓冲液, 置于 60 ℃水浴 30 min。(4)顺着离心管侧壁, 用磁铁吸出钢珠。(5)加入等体积的酚: 氯仿: 异戊醇=25: 24: 1 的混合液, 轻轻混匀。4 ℃ 12 000 r/min 离心 10 min。(6)将上清液移至新的 1.5 mL 离心管中, 加入 1 μ L RNase (1 mg/mL), 37 ℃下水浴 30 min。(7)加 2/3 体积的异丙醇, 轻轻摇匀, 于 –20 ℃条件下静置 2~3 h。(8)取出样品, 12 000 r/min 离心 10 min, 弃去上清液。(9)加入 500 μ L 70% 乙醇, 轻柔洗涤, 4 000 r/min 离心 5 min, 弃去上清液。(10)重复步骤(9)。(11)自然风干或者真空抽干 DNA 样品, 加入 200 μ L ddH₂O 充分溶解, 于 –20 ℃备用。

2 DNA 质量检测

2.1 DNA 浓度和纯度的检测

随机取 6 份上述所得 DNA 样品测定 $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 值及浓度。

2.2 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量

将提取的 DNA 样品用 1% 琼脂糖凝胶在 1×TAE 缓冲系统下电泳, 检测 DNA 提取情况, 电泳后置于紫外灯下观察、照相。

2.3 SSR 随机引物扩增检测

SSR–PCR 扩增体系总体积为 20 μ L: 20 ng/ μ L 模板 DNA 1 μ L, 10×buffer 2 μ L, 2.5 mmol/L dNTP 1.6 μ L, *Taq* DNA 酶 0.2 μ L (5 U/ μ L), 上、下游 10 μ mol/L SSR–Primer 各 1 μ L, ddH₂O 13.2 μ L。

PCR 反应程序为: 94 ℃ 5 min; 94 ℃ 45 s, 56 ℃ 45 s, 72 ℃ 30 s, 重复 30 个循环; 72 ℃延伸 10 min; 4 ℃保存。扩增产物经变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测^[20–21], 染色方法参考吴冠芸等的银染方法^[22]。

3 结果与分析

3.1 DNA 的浓度和纯度检测结果

随机取 6 份上述所得 DNA 样品进行相应的 $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 值及浓度检测(表 1), 其 $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 值在 1.8~2.0 之间, 说

收稿日期: 2014–06–09

作者简介: 李可凡(1977—), 男, 河南商水人, 讲师, 主要从事植物病虫害教学与实验工作。E–mail: Kefanli@126.com。

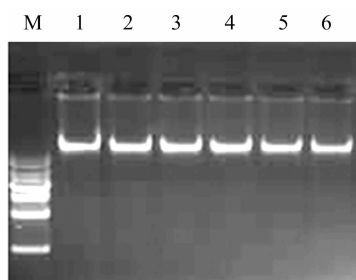
明利用上述方法提取的棉花基因组 DNA 质量较好,浓度较高,所提取的 DNA 浓度远远高于一般 PCR 反应体系对 DNA 浓度的要求。

表 1 6 份样品在紫外分光光度计上的吸光度

样品	$D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$	DNA 浓度 ($\mu\text{g/mL}$)
样品 1	1.97	289
样品 2	1.93	263
样品 3	1.91	119
样品 4	1.96	284
样品 5	1.89	168
样品 6	1.86	204

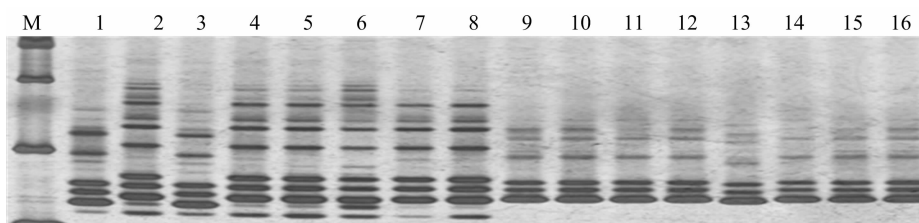
3.2 琼脂糖电泳检测结果

从图 1 可以看出, DNA 条带清晰、单一,无拖尾现象,说明此方法适用于棉花幼嫩叶片基因组 DNA 的提取,提取质量较好,无 DNA 降解。



M—1 kb; 1~6—提取的棉花 DNA

图1 棉花总 DNA 电泳图



M—DL2000; 1~16—SSR-PCR 扩增产物

图3 聚丙烯酰胺凝胶电泳检测 SSR-PCR 扩增图

可能造成的交叉污染,而且节省液氮的使用量。由于在研磨的过程中使用了涡旋仪研磨样品,加速了提取速度,节省了提取时间,从而可以在较短的时间内快速的提取上百个样品,与前人的方法^[23-24]相比大大提高了工作效率。

本方法所需的叶片样品无论是老叶还是嫩叶均可提出质量满意的 DNA,而且需要的量少,不会影响幼苗的生长,不影响对试验材料的其他研究工作。同时,本方法与以往研究的棉花 DNA 提取方法相比,具有操作简便、快速、成本低廉等优点,提取的棉花总 DNA 为乳白色、疏松的丝状,干后为透明状,能满足一般的 PCR 试验要求,PCR 扩增条带清晰。

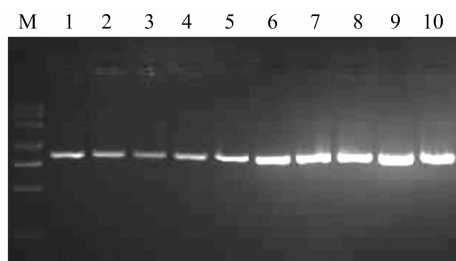
本研究形成了比较快速、简便的棉花基因组 DNA 提取方法,为 SSR 标记在棉花遗传育种研究中的应用奠定了基础,具有一定的应用价值。

参考文献:

[1] Paterson A H, Brubaker C L, Wendel J F. A rapid method for extraction of cotton (*Gossypium* spp.) genomic DNA suitable for RFLP or

3.3 普通 PCR 扩增检测

以本方法提取到的基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增,产物经琼脂糖凝胶电泳检测,结果如图 2 所示,扩增条带清晰。说明该方法提取到的基因组 DNA 能十分有效地进行 PCR 扩增反应。



M—DL2000; 1~10—以提取棉花DNA为模板的PCR扩增条带

图2 PCR 扩增电泳图

3.4 SSR-PCR 扩增检测

以本方法提取到的基因组 DNA 为模板,用 SSR 随机引物进行 PCR 扩增,产物经聚丙烯酰胺凝胶电泳检测,结果如图 3 所示,均扩增出多态性谱带,且带型清晰、无杂带、易区分。说明该方法提取到的基因组 DNA 能十分有效地进行 SSR 分子标记的检测。

4 讨论

本试验在棉花总 DNA 的提取过程中用钢珠进行快速单独研磨,与使用液氮研磨提取棉花总 DNA 相比,这样不但避免了样品使用液氮研磨时反复使用同一个研钵研磨多个样品

PCR analysis[J]. Plant Molecular Biology Reporter, 1993, 11 (3): 122 - 127.

[2] Elsalam K A, Asran - Amal A, El - Samawaty A M A. Isolation of high - quality DNA from cotton and its fungal pathogens[J]. Plant Diseases and Protection, 2007, 114 (3): 113 - 116.

[3] 郭宝生, 张 辉, 耿军义, 等. 改良 SDS 法快速提取小样品量棉花总 DNA 及其纯化[J]. 棉花学报, 2005, 17 (5): 320, 封三.

[4] 郭红媛, 余茂云. 一种改良的棉花总 DNA 提取方法[J]. 山西农业科学, 2009, 37 (2): 3 - 5.

[5] Zhang J F, Stewart J M. Economical and rapid method for extracting cotton genomic DNA[J]. Cotton Science, 2000, 4: 193 - 201.

[6] 宋国立, 崔荣霞, 王坤波, 等. 改良 CTAB 法快速提取棉花 DNA [J]. 棉花学报, 1998, 10 (5): 50 - 52.

[7] 刘 峰, 赵 佩, 徐子初, 等. 一种适用于 SSR - PCR 的棉花干种子 DNA 快速简便提取方法[J]. 分子植物育种, 2010, 8 (5): 981 - 986.

[8] 李忠旺, 厚毅清, 石有太, 等. 棉花基因组 DNA 快速提取方法改良[J]. 甘肃农业科技, 2012 (4): 11 - 13.

张永福,黄鹤平,银立新,等. 冷(热)激对干旱胁迫下玉米活性氧清除及膜脂过氧化的调控机制[J]. 江苏农业科学,2015,43(5):56-60.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.05.017

冷(热)激对干旱胁迫下玉米活性氧清除及膜脂过氧化的调控机制

张永福,黄鹤平,银立新,陈泽斌,刘佳妮,彭声静

(昆明学院农学院/云南省高校都市型现代农业工程研究中心,云南昆明 650214)

摘要:为了揭示冷(热)激对干旱胁迫下玉米活性氧清除系统及膜脂过氧化的调控机制,以会单2号幼苗为试材,经冷(热)激预处理后,待苗长至50 cm左右时用15%聚乙二醇(PEG-6000)模拟干旱处理。结果表明,随着干旱胁迫时间的延长,玉米叶片的相对电导率、丙二醛含量显著增加,质膜遭到损害,其中对照质膜的损害明显比冷(热)激处理的严重;SOD和POD活性在干旱胁迫初期迅速升高,随着胁迫时间的延长而逐渐变缓并略有下降,冷(热)激处理对干旱胁迫下玉米叶片这2种酶活性的响应差异较大,具有相互协调的作用;冷(热)激能显著降低玉米叶片在干旱胁迫下 O_2^- 产生速率和 H_2O_2 含量;叶绿素和类胡萝卜素含量在干旱胁迫初期呈现上升趋势,但随后便不同程度的下降,其中冷(热)激处理能够显著地减缓这种下降的速率;在干旱胁迫初期,各试材根系活力的下降幅度较小,但到了干旱胁迫中期以后,各试材根系活力迅速下降,其中冷(热)激预处理能够显著减缓根系活力的下降速率。可见,冷(热)激处理能够显著增强干旱胁迫下玉米叶片活性氧清除系统的功效,减轻膜质过氧化对玉米叶片的伤害,增强其耐旱性,其中以4℃冷激处理的效果最显著。

关键词:玉米;冷(热)激;干旱胁迫;活性氧;膜质过氧化;调控机制

中图分类号: Q945.78;S513.01

文献标志码: A

文章编号: 1002-1302(2015)05-0056-05

玉米(*Zea mays* L.)是世界主要粮食作物之一,以其适应性广、产量高而著称。但近年来,由于气候异常,每年玉米生长季节中干旱灾害频繁,制约着玉米的高产稳产。因此,研究

玉米在干旱逆境下的生长生理及抗旱机制具有重要意义。植物的抗旱性与活性氧代谢密切相关,干旱胁迫下植物体内会产生大量的 H_2O_2 、 O_2^- 等活性氧自由基,导致膜脂过氧化,进而造成膜系统的损伤^[1-2]。植物体内的酶促和非酶促的抗氧化剂能够清除活性氧,保护其细胞免受活性氧的伤害,维持膜系统的稳定,以增强植株的耐旱性^[3-4]。诱导植物对不同逆境的交叉适应性是其获得抗逆性的一种经济、环保的有效手段^[5]。关于各种逆境诱导植物的交叉适应性的报道较多。在玉米上,热激预处理可诱导对热、冷、干旱和盐胁迫的交叉

收稿日期:2014-05-30

基金项目:云南省教育厅科学研究基金(编号:2012Z097、2012Z096);

昆明学院引进人才科研项目(编号:YJL11030、YJL12002、YJL12007)。

作者简介:张永福(1981—),男,云南弥勒人,博士,副教授,主要从事植物抗性生理方面的研究。E-mail:123017360@qq.com。

[9]管长娟,梁维维,陈全家,等. 高质提取棉花总DNA的方法及引物多态性应用[J]. 江苏农业科学,2013,41(1):29-31.

[10]傅荣昭,孙勇如,贾士荣. 植物遗传转化技术手册[M]. 北京:中国科学技术出版社,1994.

[11]岳继承,李洪生,夏其志,等. 不同方法提取棉花DNA的比较[J]. 江西棉花,2010,32(6):11-15.

[12]田海燕,田新惠,李艳军,等. 棉花DNA的提取及其SSR分子标记体系的建立[J]. 石河子大学学报:自然科学版,2007,25(2):150-152.

[13]叶磊,王茜. 一种适于SSR-PCR的棉花基因组DNA提取法[J]. 分子植物育种,2007,5(5):738-742.

[14]曲延英,张强,孔祥祯,等. 4种快速提取棉花总DNA方法的比较[J]. 新疆农业大学学报,1999,22(4):320-322.

[15]孙志栋,王学德,倪西源,等. 棉花DNA提取方法的探讨[J]. 浙江农业学报,2004,16(4):177-181.

[16]蓝海燕,刘桂珍,王长海. 棉叶总DNA提取的改良方法[J]. 棉花学报,2000,21(1):53.

[17]高文伟,陈全家,曲延英,等. 棉花DNA提取及优化SSR反应体系的建立和应用[J]. 新疆农业大学学报,2009,32(6):34-37.

[18]孙鑫,崔洪志,胡宝忠,等. SDS-CTAB结合法提取棉花总DNA[J]. 生物技术通报,2004(5):45-47.

[19]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):14-16.

[20]吴冠芸,潘华珍. 生物化学与分子生物学实验常用数据手册[M]. 北京:科学出版社,1999:263.

[21]李丽,王海岗,张晓丽,等. SSR分子标记在作物遗传育种中的应用[J]. 山西农业科学,2008,36(3):15-18.

[22]孟全业,赵建宗,李巧英,等. SSR分子标记方法鉴定杂交向日葵品种纯度研究[J]. 山西农业科学,2008,36(5):42-44.

[23]孙林静,马忠友,苏京平,等. 一种简单快速的DNA提取方法在水稻上的应用[J]. 天津农学院学报,2007,14(3):1-4.

[24]卢振宇,李明顺,谢传晓,等. 玉米叶片DNA快速提取方法改进研究[J]. 玉米科学,2008,16(2):50-53,55.