

任梦云,陈彦君,王建军,等.一种高效提取干燥植物样品 DNA 的方法[J].江苏农业科学,2020,48(19):48-51.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.19.010

# 一种高效提取干燥植物样品 DNA 的方法

任梦云<sup>1</sup>,陈彦君<sup>2,3</sup>,王建军<sup>1</sup>,王美兴<sup>1</sup>,黄益峰<sup>1</sup>,杜龙岗<sup>1</sup>,关 潇<sup>2</sup>

(1. 浙江省农业科学院作物与核技术利用研究所,浙江杭州 310021; 2. 中国环境科学研究院,北京 100012;

3. 海南大学热带农林学院,海南海口 570228)

**摘要:**野外采集样品通常采用硅胶干燥的方法,但会不同程度降解 DNA 影响提取效果。为解决干燥植物样品 DNA 难提取的问题,提出 CTAB 法与全式金植物基因组 DNA 提取试剂盒相结合的方法,并以 4 种中药材为试验材料,利用改良 CTAB 法、传统 CTAB 法及试剂盒法等进行鉴定,并用 PCR 扩增和酶切验证检测提取 DNA 的质量。结果表明,CTAB 法与全式金植物基因组 DNA 提取试剂盒相结合的方法能够有效去除多酚和糖类物质对 DNA 提取的干扰,并有效富集 DNA,尤其适用于临近干燥或枯萎的植物干燥叶片,PCR 扩增和酶切反应应进一步证明利用该方法提取 DNA 能够达到下游试验的要求。本研究有效解决了传统方法提取干燥样品 DNA 低效的问题,能为接下来分子标记的开发、遗传多样性和后续遗传学分析提供基础。

**关键词:**干燥植物;DNA 提取方法;DNA 产率;琼脂糖凝胶;电泳;PCR 扩增;酶切试验

**中图分类号:**Q94-34<sup>+</sup>1;S184 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2020)19-0048-04

从植物组织中提取高质量的基因组 DNA 是进行分子生物学研究的第 1 步和必要条件<sup>[1]</sup>。高质量的基因组 DNA 是进行如简单重复序列标记(SSR)、限制性内切酶片段长度多态性(RFLP)、随机扩增多态性 DNA 标记(RAPD)、简单重复序列间扩增(ISSR)等后续遗传多样性分析的基础<sup>[2]</sup>。迄今为止,人们提出了诸多提取 DNA 的方法,目前最常用的提取方法是十二烷基苯磺酸钠(SDS)法、十

六烷基三甲基溴化铵(CTAB)法<sup>[3]</sup>。远距离采样一般无法对材料即刻提取 DNA,通常采用硅胶脱水干燥保存。然而有研究表明,从硅胶保存的植物样品中提取的基因组 DNA 会出现不同程度的降解现象,而且 DNA 的质量和浓度不及从新鲜样品中提取到的 DNA<sup>[4]</sup>。尤其枯萎的植物样品中 DNA 易被核酸内源酶降解,硅胶干燥后 DNA 降解程度更加严重,造成 DNA 提取质量下降<sup>[5]</sup>。因此,亟待开发一种能够适用于临近枯萎植物干燥样品的基因组 DNA 提取通用方法以适应研究要求。

本研究以山莨菪(*Anisodus tanguticus*)、桃儿七(*Sinopodophyllum hexandrum*)、四数獐牙菜(*Swertia tetraptera*)、椭圆叶花锚(*Halenia elliptica*)4 种中草药为材料,分别从紫外吸光度、凝胶电泳、PCR 扩增、酶切验证等方面对传统 CTAB 法、改良 CTAB 法和试剂盒法 3 种 DNA 基因组的提取方法进行比较,以期寻找能提取干燥样品较好质量 DNA 的方法。

收稿日期:2019-10-08

基金项目:浙江省农业(粮食)新品种选育重大科技专项(编号:2016C02050-9-2)。

作者简介:任梦云(1991—),女,安徽淮北人,博士,助理研究员,从事分子生物学研究。E-mail:916103207@qq.com。

通信作者:关 潇,博士,高级工程师,从事转基因作物风险评估工作,E-mail:cynthia815@126.com;杜龙岗,硕士,副研究员,从事鲜食玉米新品种选育及相关耕作制度研究,E-mail:dlgl38@163.com。

## 参考文献:

- [1] 彭 章,童华荣,梁国鲁,等.茶树叶片和胚根原生质体的分离及 PEG 诱导融合[J].作物学报,2018,44(3):463-470.
- [2] 蔡 肖,康向阳.小青杨叶肉原生质体分离条件的研究[J].中国农学通报,2011,27(10):18-22.
- [3] 李云鹤,王晓梅.试论中药三七对血液系统的药理药效作用[J].中国现代药物应用,2016,10(8):253-254.

- [4] Wei Z M, Xu Z H. Plant regeneration from protoplasts of soybean (*Glycine max* L.) [J]. Plant Cell Reports, 1988, 7(5):348-351.
- [5] 王 义,杨 晶,张 颖,等.人参原生质体的分离培养[J].吉林农业大学学报,2009,31(3):268-272.
- [6] 李 晓.马铃薯原生质体培养再生及利用 CRISPR/Cas9 瞬时转化的研究[D].呼和浩特:内蒙古大学,2019.
- [7] 苏 彤,姚陆铭,张 鑫,等.大豆愈伤原生质体的制备和培养方式探究[J].大豆科学,2018,37(5):741-747.

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

山茛菪、桃儿七、四数獐牙菜、椭圆叶花锚分别来源于甘肃省门源县、碌曲县神山村、临潭县贡巴寺和贡巴寺,样本均于 2016 年 9 月采集。

本研究中的改良 CTAB 法裂解缓冲液与常规配方相同,具体如下:CTAB 20 mg/mL, NaCl 1.4 mol/L,二胺四乙酸(EDTA)0.01 mol/L,三羟甲基氨基甲烷(Tris)0.1 mol/L,调节 pH 值至 8.0。

### 1.2 DNA 提取

分别采用传统 CTAB 法、北京全式金生物技术有限公司提供的 DNA 提取试剂盒(目录号为 EE111)法(简称试剂盒法)以及改良 CTAB 法(即利用传统 CTAB 法与试剂盒法相结合的方法)提取 4 种植物的基因组 DNA。改良 CTAB 法中所述的 EB、BB1、CB1、WB1、RnaseA 均来自北京全式金生物技术有限公司提供的 DNA 提取试剂盒(目录号为 EE111),根据该试剂盒说明书的记载,EB、BB1、CB1、WB1 分别为溶解液、结合液 1、清洗液 1、洗液 1。

取 90 mg 干燥植物材料,粉碎,分装,分别用上述 3 种方法提取 DNA,DNA 提取试剂盒的方法严格按照操作说明进行。改良 CTAB 法步骤:(1)称取 30 mg 干燥植物干材料,粉碎(如前所述);(2)加入已预热 CTAB 裂解缓冲液和一定体积的 RnaseA,涡旋振荡,于 65 ℃ 下水浴 30 ~ 50 min,每隔 5 min 上下颠倒混匀;(3)转移上清至干净的离心管中,加入等体积的三氯甲烷-异戊醇(体积比为 24 : 1,下同),颠倒混匀,15 ℃,12 000 r/min,离心 10 min,取上清;(4)转移上清至干净的离心管中,加入上清液 2/3 体积的预冷至 -20 ℃ 的异丙醇,轻颠倒混匀,于 -20 ℃ 下静置 30 min;(5)静置液于 15 ℃、12 000 r/min 条件下离心 10 min,倒掉上清,在离心管中加入 400 μL EB 溶液溶解沉淀,同时加入 400 μL 的三氯甲烷-异戊醇混合液,上下颠倒混匀,于 15 ℃、12 000 r/min 条件下离心 10 min,取上清;(6)转移上清至干净的离心管中,加入等体积的 BB1,颠倒混匀,将混合液转移至干净的离心柱中,于 15 ℃、12 000 r/min 条件下离心 5 min;(7)弃液体,加入 500 μL CB1,静置 5 min,于 15 ℃、12 000 r/min 条件下离心 5 min;(8)弃液体,加入 500 μL WB1,于 15 ℃、12 000 r/min 条件下离心 5 min,重复本步骤至少 1 次;(9)弃液体,于 15 ℃、

12 000 r/min 条件下离心 5 min,彻底去除残留的 WB1;(10)弃离心管,将离心柱放置在干净滤纸上风干 5 min;(11)将离心柱转移到干净的离心管中,向离心柱中心膜上加入 40 μL 预热至 60 ~ 70 ℃ 的 EB,静置 2 min,于 15 ℃、12 000 r/min 条件下离心 2 min,重复本步骤至少 1 次;(12)弃离心柱,收集所得离心液,即得植物基因组 DNA;(13)测定 DNA 的浓度和纯度,-20 ℃ 保存。

### 1.3 DNA 产率和质量检测

1.3.1 琼脂糖凝胶电泳检测 比较不同方法提取 DNA 的得率,琼脂糖凝胶电泳时每个样品上样 3 μL DNA 溶液。配制 1% 琼脂糖凝胶,电泳液为 1 × TBE 缓冲液[生工生物工程(上海)股份有限公司],GoldView(北京赛百盛基因技术有限公司)染色,于 100 V 条件下电泳 30 min。利用 UPV 紫外成像系统(EC3 system,美国)扫描成像。

1.3.2 分光光度计检测 采用紫外分光光度计(Merinton, SMA4000)分别测量 DNA 溶液在 230、260、280 nm 处的吸光度。通过计算  $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$  和  $D_{230\text{ nm}}/D_{260\text{ nm}}$  的值分别获得 DNA 溶液中蛋白、多糖、酚类的含量以及 RNA 的污染度,从而估算 DNA 浓度,公式为 DNA 样品浓度( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) =  $D_{260\text{ nm}} \times$  稀释倍数  $\times 50$ 。

1.3.3 PCR 检测 通过 PCR(德国 Biometra 公司)反应验证改良 CTAB 法所获得的 DNA 的质量,25 μL PCR 反应体系包含 12.5 μL 2 × Taq PCR Master Mix、上下游引物各 0.5 μL、2 μL 基因组 DNA(浓度约为 40 ng/μL)、9.5 μL ddH<sub>2</sub>O。用于扩增 ITS 序列的 1 对通用引物的序列为 ITS1(5' - AGAA GTCGTAACAAGGTTTC - 3')、ITS4(5' - TCCTCCGC TTATTTATATGC - 3')<sup>[6]</sup>。PCR 反应程序:95 ℃ 预变性 5 min;95 ℃ 变性 30 s,52 ℃ 退火 45 s,72 ℃ 延伸 1 min 40 s,35 个循环;72 ℃ 终延伸 10 min,16 ℃,停止反应。

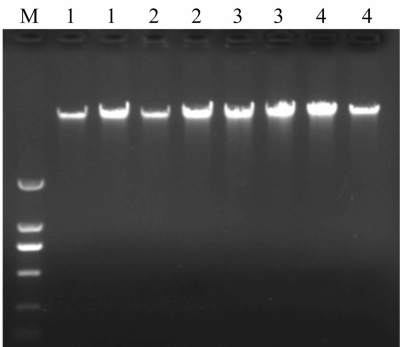
1.3.4 酶切验证 20 μL 酶切体系包括:5 μL DNA 模板(200 ng/μL),2 μL 10 × FlyCut<sup>TM</sup> Buffer,0.5 μL EcoR I 酶(20 U/μL),12.5 μL ddH<sub>2</sub>O。PCR 程序为 37 ℃ 10 min,65 ℃ 20 min。

## 2 结果与分析

### 2.1 DNA 得率和质量

用 3 种不同的方法提取样品基因组 DNA,琼脂糖凝胶电泳结果如图 1、图 2 所示,DNA 条带清晰,

无明显降解拖尾现象,尤其改良 CTAB 法提取的 DNA 条带清晰、明亮(图 1)。



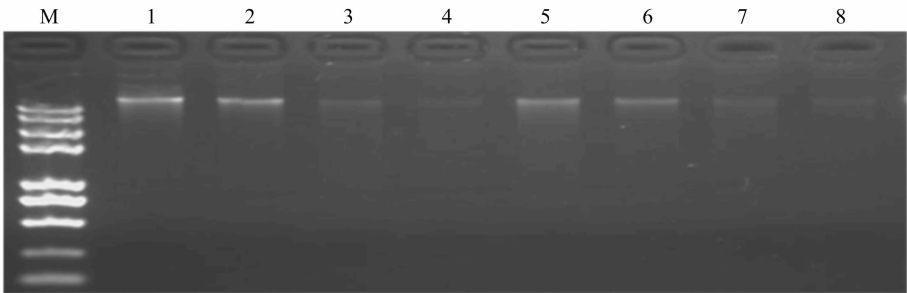
M—DNA maker(DL 2000); 1—山茱萸; 2—桃儿七; 3—四数箴牙菜; 4—椭圆叶花锚  
图1 改良 CTAB 法提取的 4 种干燥植物叶片总 DNA 的电泳结果

根据  $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$  的检测值(表 1)发现,改良 CTAB 法提取的 DNA 质量较好,传统 CTAB 法和试剂盒法略差( $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}} < 1.7$ ),说明这 2 种方法抽提的 DNA 中可能含有蛋白质杂质。改良 CTAB 法提取的 DNA 的浓度明显高于其他 2 种提取方法,除山茱萸试剂盒法提取的 DNA 浓度最低。

2.2 PCR 验证和酶切试验

DNA 的提取是分子生物学研究中至关重要的第 1 步,因此 DNA 提取方法的适用性还需要下游试验的验证。本研究通过 PCR 和酶切进一步验证该提取方法所获得的 DNA 的质量。

利用 ITS 引物以本研究提取获得的上述 4 种植物基因组 DNA 为模板,进行 PCR 扩增,结果见图 3。



M—DNA maker(Trans 2000 plus II); 1—山茱萸(传统 CTAB 法); 2—桃儿七(传统 CTAB 法); 3—四数箴牙菜(传统 CTAB 法); 4—椭圆叶花锚(传统 CTAB 法); 5—山茱萸(试剂盒法); 6—桃儿七(试剂盒法); 7—四数箴牙菜(试剂盒法); 8—椭圆叶花锚(试剂盒法)  
图2 传统 CTAB 法及 DNA 试剂盒提取法提取的 4 种干燥植物叶片总 DNA 的电泳结果

表 1 3 种方法提取 4 种枯萎干燥植物叶片 DNA 的质量比较

植物	DNA 的抽提法	DNA 浓度 ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )	$D_{260\text{ nm}}/D_{230\text{ nm}}$	$D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$
山茱萸	改良 CTAB 法	$187.15 \pm 52.71$	$1.740 \pm 0.03$	$1.790 \pm 0.03$
	传统 CTAB 法	$30.50 \pm 2.58$	$0.792 \pm 0.02$	$1.564 \pm 0.02$
	试剂盒法	$18.50 \pm 0.98$	$0.712 \pm 0.01$	$1.662 \pm 0.04$
桃儿七	改良 CTAB 法	$121.14 \pm 23.55$	$1.670 \pm 0.07$	$1.750 \pm 0.07$
	传统 CTAB 法	$50.00 \pm 1.28$	$1.176 \pm 0.03$	$1.639 \pm 0.04$
	试剂盒法	$25.00 \pm 0.85$	$1.190 \pm 0.05$	$1.633 \pm 0.03$
四数箴牙菜	改良 CTAB 法	$87.45 \pm 14.33$	$1.630 \pm 0.03$	$1.730 \pm 0.04$
	传统 CTAB 法	$17.00 \pm 0.74$	$0.895 \pm 0.01$	$1.627 \pm 0.03$
	试剂盒法	$6.70 \pm 0.15$	$0.394 \pm 0.02$	$1.489 \pm 0.06$
椭圆叶花锚	改良 CTAB 法	$85.45 \pm 12.25$	$1.550 \pm 0.07$	$1.720 \pm 0.07$
	传统 CTAB 法	$16.24 \pm 1.25$	$0.635 \pm 0.04$	$1.543 \pm 0.05$
	试剂盒法	$5.30 \pm 0.08$	$0.465 \pm 0.03$	$1.493 \pm 0.04$

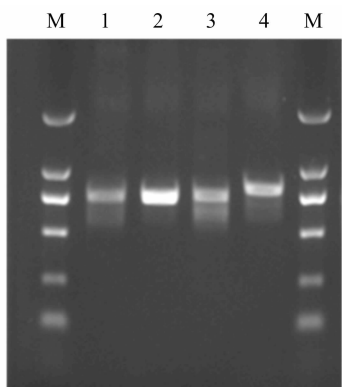
4 个样品中都扩增出了清晰的目的条带。PCR 试验结果证明,改良 CTAB 提取法获得的植物基因组 DNA 符合下游试验的要求。

*Eco*R I 限制性内切酶酶切电泳结果如图 4 所示,酶切获得的条带在凝胶上呈均匀的弥散状分

布,这表明改良 CTAB 法的 DNA 纯度良好,符合酶切试验及下游试验的要求。

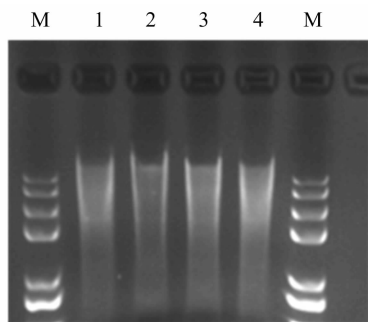
3 讨论与结论

在正常条件下,传统 CTAB 法以及试剂盒法都



M—DNA maker(DL 2000); 1—山茱萸; 2—桃儿七;  
3—四数獐牙菜; 4—椭圆叶花锚

图3 改良 CTAB 法提取的 4 种干燥植物 DNA PCR 电泳结果



M—DNA maker(Trans 2000 plus II); 1—山茱萸;  
2—桃儿七; 3—四数獐牙菜; 4—椭圆叶花锚

图4 改良 CTAB 法提取的 4 种干燥植物 DNA  
EcoRI 限制性酶切电泳

可以用于植物基因组 DNA 的抽提,但是如果从 DNA 的浓度、纯度和质量上综合考虑来说,本试验改良 CTAB 法提取干燥样本植物基因组 DNA 效率最好。在实际工作中,仍然须要根据植物本身的特性和不同的试验要求来选择合适的提取方法<sup>[7-8]</sup>。

目前最好的植物基因组 DNA 提取材料是鲜样或者是 -80℃ 冻存保留的样本材料<sup>[9-13]</sup>。但是当采样地位于野外时,野外采样一般无法对材料即刻提取 DNA,通常采用硅胶干燥,而经过硅胶干燥保存的植物样品的基因组 DNA 会发生不同程度的降解,提取的 DNA 质量和浓度远比从鲜样中提取的差。尤其枯萎的植物样品中 DNA 易被核酸内源酶降解,硅胶干燥后 DNA 降解程度更加严重,提取质量下降。因此,针对长期远距离采样难保存样品的问题,应寻找一种新的、简便经济实用的干燥样本 DNA 提取方法。

本研究利用全式金基因组 DNA 提取试剂盒所改良的 CTAB 法,能够有效去除多酚和糖类物质对 DNA 提取的干扰,尤其适应于临近干燥或枯萎的植物干燥叶片,能够有效地富集 DNA,并消除颜色对

DNA 的影响。PCR 试验结果证明,改良 CTAB 法获得的 DNA 能够达到下游试验的要求。与现有技术相比,该方法具有以下优点:(1)利用该方法从干燥植物样品组织中获得的 DNA 量显著高于普通提取方法获得的 DNA,且 DNA 纯度符合下游应用的要求。(2)经 PCR 和酶切试验证明最终获得的 DNA 能够达到一般分子生物学研究的要求。(3)该提取方法具有通用、高效和简便的特点。从表 1 和图 4 可以看出,传统 CTAB 法以及试剂盒法均不能从上述样品中成功提取出 DNA,紫外分光光度计检测结果表明提取获得的 DNA 纯度较差,不符合下游试验要求。本研究的改良 CTAB 法适合干燥样本,干燥样本操作方便,不受太多地理及环境因素的限定,适用于远距离样品的采集。

#### 参考文献:

- [1] 陈宗礼,陈昱宇,王睿婷,等. 组培枣苗基因组 DNA 提取方法及其含量的比较[J]. 基因组学与应用生物学,2011,30(1):110-116.
- [2] 李金璐,王 硕,于 婧,等. 一种改良的植物 DNA 提取方法[J]. 植物学报,2013,48(1):72-78.
- [3] Murray M G, Thompson W F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA[J]. Nucleic Acids Research,1980,8(19):4321-4325.
- [4] 梁红艳,付梦瑶,杨果果,等. 不同保存方法对柃柳基因组总 DNA 产量和质量的影响[J]. 基因组学与应用生物学,2016,35(8):2168-2172.
- [5] Stange C, Prehn D, Arce - Johnson P. Isolation of pinus radiata genomic DNA suitable for RAPD analysis[J]. Plant Molecular Biology Reporter,1998,16(4):366.
- [6] 王国勋,张明理. 应用核 DNA ITS 序列探讨广义花楸属(*Sorbus* L.) 属下系统关系[J]. 园艺学报,2011,38(12):2387-2394.
- [7] 李 萌,李 翔,庞晓明,等. 珍稀树种庙台槭不同组织 DNA 高效提取方法分析[J]. 分子植物育种,2019,17(4):1228-1237.
- [8] Thomson D, Henry R. Use of DNA from dry leaves for PCR and RAPD analysis[J]. Plant Molecular Biology Reporter,1993,11(3):202-206.
- [9] 谢中稳,葛 颂,洪德元. 从普通野生稻硅胶干燥的小量叶片中制备 DNA 用于 RAPD 分析和总 DNA 库的建立[J]. 植物学报,1999,41(8):807-812.
- [10] 吴 翼,刘 蕊,郭爱汕,等. 硅胶干燥对棕榈科植物 DNA 提取效果的影响[J]. 江苏农业科学,2019,47(18):83-86.
- [11] Marla M P, Robert P A. *In situ* preservation of DNA in plant specimens[J]. Taxon,1989,38(4):576-581.
- [12] Rogstad S H. Saturated NaCl - CTAB solution as a means of field preservation of leaves for DNA analyses[J]. Taxon,1992,41(4):701-708.
- [13] Chase H W, Hills H H. Silica gel: an ideal material for field preservation of leaf samples for DNA studies[J]. Taxon,1991,40(2):215-220.