

马铃薯叶片基因组DNA提取方法比较研究

李建武^{1,2}, 巩迎春³

(1. 甘肃省农业科学院马铃薯研究所, 甘肃 兰州 730070; 2. 农业部西北旱作马铃薯科学观测实验站, 甘肃 渭源 748201; 3. 甘肃农业大学生命科学技术学院, 甘肃 兰州 730070)

摘要: 以马铃薯叶片为试验材料, 采用改良CTAB法和试剂盒法提取马铃薯叶片基因组DNA。结果表明, 2种方法均可得到满足SSR-PCR扩增要求的DNA, 其中试剂盒较改良CTAB法提取的DNA质量高、杂质少, DNA得率低, 操作简单, 耗时短, 毒害小, 但费用较改良CTAB法高。实践中可根据条件选择适宜方法提取马铃薯基因组DNA。

关键词: 马铃薯; DNA 提取; 改良 CTAB; 试剂盒

中图分类号: S532 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-1463(2015)08-0025-04

doi: 10.3969/j.issn.1001-1463.2015.08.009

Study on Comparison of Methods to Extract Genomic DNA from Potato Leaves

LI Jianwu^{1,2}, GONG Yingchun³

(1. Institute of Potato, Gansu Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou Gansu 730070, China; 2. Scientific Observing and Experimental Station of Potato Dry Farming in Northwest China, Ministry of Agriculture, Weiyuan Gansu 748201, China; 3. College of Life Science and Technology, Gansu Agriculture University, Lanzhou Gansu 730070, China)

Abstract: The potato leaves as test materials, improved CTAB method and plant genomic DNA extraction Kit is used to extract genomic DNA from leaves of potato in field respectively. The result shows that DNA extracted by the two methods also met demands for SSR-PCR amplification; The quality of DNA obtained by plant genomic DNA Kit is better but the achievement rate of DNA is lower. Moreover, the method of plant genomic DNA Kit is much easier, needed shorter time, had lower toxicity, and high cost than improved CATB method. Suitable method can be choose to genomic DNA of potato according to the actual conditions of the laboratory.

Key words: Potato; DNA Extraction; Improved CTAB; Reagent box

马铃薯(*Solanum tuberosum* L.)是茄科(Solanaceae)茄属(*Solanum*)马铃薯组(Tuberarium)双子叶

草本植物,可一年一季或一年两季栽培,普通马铃薯是马铃薯亚组中能形成地下块茎的一年生草本

收稿日期: 2015-05-22

基金项目: 国家自然科学基金“四倍体马铃薯分子遗传图谱的构建与淀粉含量等重要农艺性状的 QTL 定位研究”(31160299); 甘肃省省青年科技基金计划“甘肃省马铃薯主栽品种指纹图谱的构建及遗传多样性分析”(1308RJYA047); 甘肃省农业科学院农业科技创新专项“甘肃省马铃薯主栽品种及重要种质资源 DNA 指纹图谱的构建”(2013GAAS43)部分内容

作者简介: 李建武(1978—), 男, 甘肃陇西人, 助理研究员, 研究方向为马铃薯遗传育种。联系电话: (0)18119380212。E-mail: ljw0931@163.com

美液体氮肥的适宜用量为 120~180 kg/hm²。建议高肥力地块和早熟品种用低量, 低肥力地块和晚熟品种用高量。

2) 在施用一定量磷钾肥的基础上, 施氮对制种玉米的综合农艺性状均有一定的影响, 特别是决定其产量的株粒数和株粒重增加明显^[3-4]。优斯美液态氮肥作为一种高浓度的液体肥料, 同时含有硝态、铵态和酰胺态 3 种形态的氮, 易于玉米吸收利用, 利用率高达 87.5%。在滴灌水氮一体化合理运筹条件下, 氮肥利用率显著提高。特别是在玉米拔节、大喇叭口和抽雄等需氮关键期, 通过滴

灌系统注入效果更好。

参考文献:

- [1] 曹建东. 7 个高密型玉米品种在临洮县旱作区的引种试验初报[J]. 甘肃农业科技, 2015(3): 52-54.
- [2] 罗照霞, 杨志奇, 马忠明, 等. 耕作措施对玉米的影响[J]. 甘肃农业科技, 2014(11): 19-21.
- [3] 杨德宝. 玉米栽培技术体系探析[J]. 甘肃农业科技, 2015(3): 70-72.
- [4] 杨新强, 包兴国, 杨文玉, 等. 缓释包衣尿素对保护性耕作玉米的影响[J]. 甘肃农业科技, 2014(10): 23-25.

(本文责编: 陈 伟)

四倍体作物。由于受到同源四倍体遗传复杂性的限制, 马铃薯遗传规律极为复杂, 常规杂交育种效率较低, 近年来在分子水平方面开展了大量的研究。DNA 的分离提取是进行植物分子生物学研究工作的基础, DNA 的提取效率和纯度严重影响分子生物学实验的结果, 因此快速提取得到高纯度的 DNA, 是分子生物学实验成败的关键因素之一^[1]。目前, 普通植物 DNA 提取方法已经非常成熟, 常用的有十六烷基三甲基溴化铵 (CTAB)^[2], 十二烷基苯磺酸钠 (SDS) 法^[3], 尿素法^[4]、试剂盒法提取基因组 DNA^[5]。其中, CTAB 法是植物提取的经典方法, 提取效果好, 但步骤繁琐、试剂组成复杂、易污染^[5-6]; SDS 法较为简易、产量高, 但有蛋白污染可能^[3]; 尿素法具有产量高、快速省时、可常温操作、成本耗用低等优点^[4]; 试剂盒法操作简便、快速省时、污染少、提取的 DNA 纯度高, 但其成本比较高^[4]。我们采用 CTAB 和试剂盒 2 种不同的 DNA 提取方法, 以常规种植马铃薯植株叶片为实验材料, 探索了适合批量高效的马铃薯叶片基因组 DNA 提取方法。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试材料为 8 份马铃薯品系, 均为普通栽培种。植物基因组 DNA 提取试剂盒 (DP305-2) 购自天根生化科技(北京)有限公司。

1.2 试验方法

试验材料于 4 月 28 日种植于农业部西北旱作区马铃薯野外观测实验站 (甘肃省渭源县), 出苗后 15 d, 剪取马铃薯植株上部倒数未完全展开的第 2 片复叶, 放入冰盒带到实验室, 经液氮速冻后置于 -80 °C 下保存备用。马铃薯基因型编号分别为 001、010、039、043、052、060、109、111。

1.3 DNA 提取

采用改良 CTAB 法和试剂盒法两种方法分别提取马铃薯叶片基因组 DNA。

1.3.1 改良 CTAB 法提取 DNA^[7] 取备用马铃薯叶片约 500 mg, 加液氮研磨成粉末状, 迅速移入 2 mL 离心管。加入 700 μ L 的 CTAB 提取缓冲液, 混匀 (CTAB 在 65 °C 水浴预热), 待所有样品研磨完后, 逐个加入 2 μ L β -巯基乙醇 (通风橱下), 放回水浴锅中, 每 5 min 轻轻震荡几次, 30 min 后加入 700 μ L 氯仿: 异戊醇 (24:1), 颠倒摇匀数次, 在 12 000 r/min 条件下离心 10 min。小心吸取上清

液 600 μ L 转入 1.5 mL 离心管, 加入等体积的饱和酚和氯仿: 异戊醇 (各 300 μ L) 溶液, 混匀, 在 12 000 r/min 条件下离心 10 min。小心吸取上清液 400 μ L 转入新离心管, 加入等体积的异丙醇, 混匀, 室温静置 10 min, 在 12 000 r/min 条件下离心 10 min, 弃去上清液, 用 70% 乙醇洗涤沉淀 2 次。室温下干燥 5~15 min 后, 溶于 100 μ L TE 溶液中, 置于 -20 °C 保存备用。每个基因型材料 DNA 提取重复 2 次。

1.3.2 试剂盒法提取 DNA 按试剂盒 (DP305-2) 说明书操作。提取马铃薯叶片基因组 DNA 后, 置于 -20 °C 保存备用。每个基因型材料 DNA 提取重复 2 次, 验证其 DNA 提取的效果。

1.4 DNA 检测

1.4.1 琼脂糖凝胶电泳法 取 DNA 样品 5 μ L, 与 1 μ L 6 \times Loading Buffer 混匀后上样, 以 2 000 bp DNA Ladder Marker 为参照, 在含荧光染料 EB 的 1% 琼脂糖凝胶上 120 V 电泳 20 min。电泳结束后, 通过凝胶成像系统 (BIO-RAD, GelDocXR+) 观察拍照, 进行纯度、浓度检测。

1.4.2 紫外分光光度法 取 2 μ L DNA 样品, 与 498 μ L 加 ddH₂O 稀释 250 倍至 500 μ L, 在紫外分光光度计 (岛津, UV-240) 上测定 DNA OD₂₆₀ 和 OD₂₈₀ 值, 并计算 OD₂₆₀/OD₂₈₀, 以检测纯度和浓度。

1.5 SSR-PCR 检测

利用文献公开发表的 SSR 引物 STM0024^[8], 对 8 份材料中的 1 个基因型的 4 份 DNA 样品进行 PCR 扩增, 引物由上海生工生物有限公司合成。STM0024 引物序列: 上游引物序列 CATTAC-CTTGTGAGATTAGATTG (5'-3'), 下游引物序列 CATATAAGTAGGAATAGGAGGTTT (5'-3'), 扩增目标片段 135 bp。

PCR 反应体系: 在 20 μ L 反应体系中加入上下游引物各 1.20 μ L (20 pmol/ μ L), 10 \times Buffer (含 Mg²⁺) 为 2.0 μ L, dNTPs 为 1.0 μ L, Taq 酶为 0.1 μ L (5U/ μ L), DNA 模板为 0.8 μ L (50 ng/ μ L)。扩增程序: 95 预变性 3 min, 95 °C 变性 30 s, 53.4 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 共 34 循环, 最后 72 °C 延伸 10 min, 4 °C 保存 PCR 产物。

吸取 PCR 产物 10 μ L, 加 2 μ L 6 \times Loading Buffer 配制样品, 以 2000 bp DNA Ladder Marker 为参照, 在含荧光染料 EB 的 2% 琼脂糖凝胶上, 120

V 电泳 30 min, 电泳结束后, 通过凝胶成像系统 (GelDocXR⁺) 观察拍照。

2 结果与分析

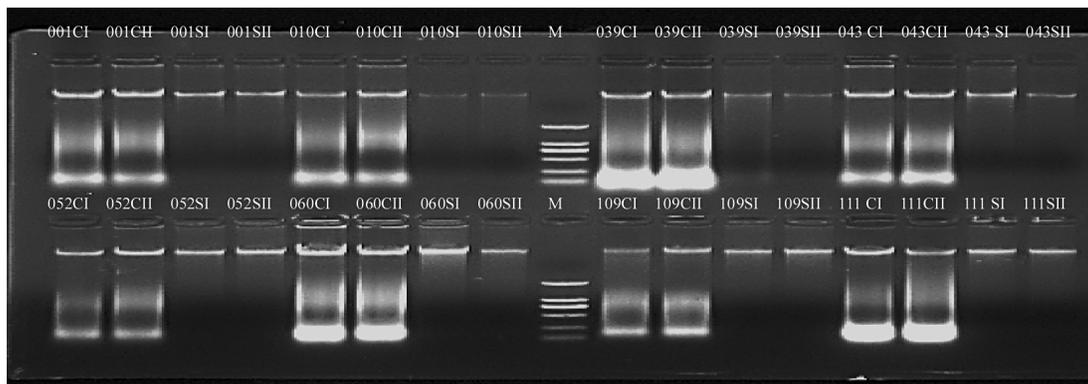
2.1 DNA 样品凝胶电泳检测结果

图 1 的 Marker 含 6 条带, 分子量由大到小依次为 2 000、1 000、750、500、250、100 bp, 其中 750 bp 条带的 DNA 浓度约为 100 ng, 其余条带约 50 ng。琼脂糖凝胶电泳结果显示, 2 种方法提取的 DNA 条带均清晰整齐、DNA 完整无杂带。改良 CTAB 法提取的 DNA 点样孔内有杂质且存在拖尾现象, 试剂盒提取的 DNA 只有少量点样孔内有杂质, 表明试剂盒提取的 DNA 纯度较高于改良 CTAB 法。改良 CTAB 法提取的 1 份样品 (109I)

DNA 浓度低于 50 ng, 8 份材料 2 次重复共 16 份次的 DNA 得率为 93.8%; 试剂盒提取的 5 份样品 (010I, 010II, 039I, 039II, 043II) 浓度低于 50 ng, 8 份材料 2 次重复共 16 份次的 DNA 得率 68.8%, 说明改良 CTAB 法提取 DNA 得率高于试剂盒。2 种方法提取的 DNA 样品浓度、纯度在各重复之间差异不明显。

2.2 紫外分光光度法测定结果

DNA 样品的纯度用 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 的比值来表示, 当 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值接近 1.8 时, DNA 纯度符合质量标准; 当 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值大于 1.9 时, 表明有 RNA 污染, 小于 1.6 时, 表明样品中存在蛋白质或酚污染^[9-10]。根据紫外分光光度分析(表1), 改



1. 数字代表不同的基因型。2. C 表示改良 CTAB 法提取的 DNA 样品; S 表示试剂盒法提取的 DNA 样品。3. I、II 表示重复 I 和 II。4. M 为 2000bp DNA Ladder Marker(6条带依次为 2000, 1000, 750, 500, 250, 100 bp)

图 1 改良 CTAB 法与试剂盒法提取的基因型 DNA 样品

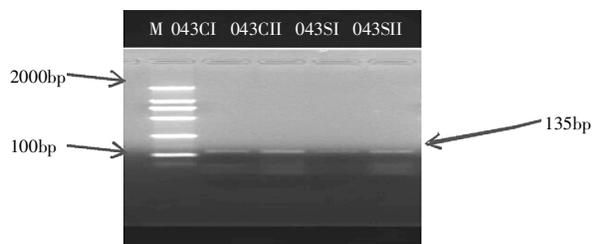
表 1 改良 CTAB 法与试剂盒法提取的 DNA 样品纯度

基因型	CTAB 法				试剂盒法			
	重复	OD ₂₆₀	OD ₂₈₀	OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀	重复	OD ₂₆₀	OD ₂₈₀	OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀
001	I	0.307	0.179	1.72	I	0.113	0.068	1.66
	II	0.317	0.180	1.76	II	0.025	0.014	1.79
010	I	0.271	0.145	1.87	I	0.044	0.026	1.69
	II	0.246	0.129	1.91	II	0.021	0.013	1.62
039	I	0.777	0.404	1.92	I	0.018	0.011	1.64
	II	0.651	0.324	2.01	II	0.011	0.006	1.83
043	I	0.570	0.293	1.95	I	0.019	0.012	1.58
	II	0.036	0.023	1.57	II	0.008	0.005	1.60
052	I	0.324	0.173	1.87	I	0.036	0.021	1.71
	II	0.253	0.135	1.87	II	0.017	0.010	1.70
060	I	0.636	0.317	2.01	I	0.034	0.022	1.55
	II	0.616	0.308	2.00	II	0.021	0.013	1.62
109	I	0.284	0.146	1.95	I	0.031	0.020	1.55
	II	0.259	0.139	1.86	II	0.013	0.008	1.63
111	I	0.869	0.448	1.94	I	0.027	0.017	1.59
	II	1.046	0.544	1.92	II	0.014	0.008	1.75
平均		0.466	0.243	1.89		0.028	0.017	1.66

良 CTAB 法提取的 010I, 039I, 039II, 043I, 060I, 060II, 109I, 111I、111II 等 9 份 DNA 样品吸光值比值大于 1.9, 说明有 RNA 污染, 和图 1 结果相同。试剂盒提取的 043I, 060I, 109I, 111I 等 4 份 DNA 样品吸光值比值小于 1.6, 说明有蛋白质、多糖或酚等杂质。改良 CTAB 法提取的 DNA 样品 OD_{260}/OD_{280} 比值平均值 1.89, 试剂盒提取的 DNA 样品 OD_{260}/OD_{280} 比值平均值 1.66, 2 种方法提取的 DNA 样品均符合质量标准。

2.3 SSR-PCR 检测

由图 2 可以看出, 2 种方法提取的 DNA 样品为模板进行 SSR-PCR 扩增反应, 经琼脂糖凝胶电泳检测, 产物条带清晰, 大小一致, 说明两种方法提取的 DNA 完全满足马铃薯 SSR-PCR 扩增需要。



1. M 为 2000 bp DNA Ladder Marker (6 条带依次为 2 000, 1 000, 750, 500, 250, 100 bp) 2. 043CI, 043CII 和 043SI, 043SII 分别为改良 CTAB 法和试剂盒提取的基因型 043 为模板 DNA 的扩增结果

图 2 不同方法提取的 DNA 样品 PCR 扩增结果

3 小结与讨论

1) CTAB 法作为 DNA 提取的经典方法, 广泛应用于植物基因组 DNA 提取, 具有稳定性好、得率高、成本低等优点^[4], 根据研究对象特点而进行改良后可以提取到高质量的 DNA^[3, 9, 11]。但该方法在配制试剂过程中繁琐耗时, 步骤多, 试剂组成复杂, 易污染, 在使用上收到了一定程度的限制^[1]。从成本来看, 试剂盒法所用药品及耗材都需整套购买, 费用较高, 而 CTAB 法只需配好所需药品, 耗材不多。但试剂盒可用于多样品同时操作, 快速, 准确, 方便, 无需酚、氯仿抽提, 避免了有机溶剂的污染, 逐渐受到重视。从本研究结果来看, 试剂盒法提取的 DNA 质量高、杂质少, DNA 得率略低, CTAB 法提取的 DNA 浓度大、量大, 但杂质多。

2) 本试验选用的材料采自田间马铃薯植株, 较组

培苗叶片含有较多的酚类物质。试验结果表明, 改良 CTAB 法和试剂盒两种方法都可得到满足 SSR-PCR 反应扩增要求的 DNA, 能够进行基于 SSR 标记的马铃薯遗传多样性分析试验, 各实验室可根据实际条件、经费支出、人员配给等具体情况, 选择适合的方法进行马铃薯基因组 DNA 的提取。如果需要样品 DNA 数量不多、质量高, 样本较多时建议选用试剂盒法提取, 因为其操作过程简便。相反, 若是小规模提取、质量要求不是很高、样本较少时建议选用 CTAB 法, 因为其成本低、得率较高。

参考文献:

- [1] 刘塔斯, 林丽美, 龚力民, 等. 分子标记中植物 DNA 提取方法的研究进展[J]. 中南药学, 2006, 3(6): 370-373.
- [2] SAMBROOK J, 萨姆布鲁克, Russell DW, 等. 分子克隆实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 2002.
- [3] 王晓丹, 吕慧颖, 张敬, 等. 以 PCR 为目的的大豆叶片 DNA 提取方法的比较研究[J]. 分子植物育种, 2004, 2(6): 891-894.
- [4] 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.
- [5] 梁玉琴, 李芳东, 傅建敏, 等. 柿属植物基因组 DNA 提取方法比较[J]. 中南林业科技大学学报, 2012, 32(4): 170-173.
- [6] 张平, 夏东升, 蔡亚君, 等. 多种方法提取苧麻组织基因组 DNA 的质量比较[J]. 湖北农业科学, 2014, 53(11): 2 682-2 685.
- [7] CLARK MS. 植物分子生物学: 实验手册[M]. 顾红雅翟礼佳, 译. 北京: 高等教育出版社, 2011.
- [8] GHISLAIN M, NÚÑEZ J, ROSARIO HERRERA M, et al. Robust and highly informative microsatellite-based genetic identity kit for potato[J]. Mol Breeding, 2009, 23(3): 377-388.
- [9] 赵静, 叶欢, 李雪松, 等. 四种改良 CTAB 法提取大叶朴基因组 DNA 比较研究[J]. 北方园艺, 2010(1): 165-168.
- [10] 代翠红, 李杰, 朱延明, 等. 不同 DNA 提取方法对 4 种重要作物 DNA 提取效率的比较[J]. 东北农业大学学报, 2005, 36(3): 329-332.
- [11] 仇建标, 丁文勇, 陈少波. 几种 DNA 提取方法对红树植物秋茄叶片 DNA 提取效果的比较[J]. 浙江海洋学院学报(自然科学版), 2013, 31(5): 402-408.

(本文责编: 陈伟)