

# 亚麻全基因组 DNA 的提取及分析

吴建忠

(黑龙江省农业科学院 经济作物研究所,黑龙江 哈尔滨 150086)

**摘要:**应用改良过的 CTAB 法提取亚麻基因组 DNA,并对其进行了紫外分光光度计和琼脂糖凝胶电泳分析。结果表明:得到的 DNA 结构较完整,杂质较少,浓度较高,可不经纯化直接用于进一步 PCR 和酶切等分子生物学研究,同时探讨了亚麻 DNA 提取过程中的一些技巧及注意事项。

**关键词:**亚麻;DNA;提取方法

**中图分类号:**S563.2

**文献标识码:**A

**文章编号:**1002-2767(2011)07-0018-02

亚麻(*Linum usitatissimum*)为亚麻科亚麻属一年生草本作物,是古老的韧皮纤维作物和油料作物。亚麻起源于近东、地中海沿岸,因其适应性很强,在全世界都有分布。目前,关于亚麻 DNA 提取方面的研究较少,提取方法大多局限于传统的 SDS 法和 CTAB 法,但这两种方法从提取的质量和速度上都略显不足,亚麻组织中果胶含量高,提取过程中液体较粘稠,不利于杂质去除,部分研究中采用高盐低 pH 提取缓冲液<sup>[1]</sup>,促使果胶溶解,同时加入 PVP(聚乙烯吡咯烷酮,简称 PVP)消除色素等杂质,使提取的浓度、纯度都得到一定的提高,但此法步骤繁琐,工作量大,配备的试剂较多,容易出错,现介绍一种更为简单,且 DNA 纯度较高的方法,即采用改良过的 CTAB(十六烷基三甲基溴化铵,简称 CTAB)法进行亚麻基因组总 DNA 的提取。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

选取亚麻茎上端 15 cm 带新鲜叶片,将其装入塑料袋中,置于-70℃冰箱冻存过夜。

### 1.2 方法

(1)在 10 mL 离心管中加入 2 mL 的 2×CTAB(2% CTAB, 100 mmol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl, 20 mmol·L<sup>-1</sup> EDTA, 1.4 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl, 1% PVP, pH8.0),65℃预热。

(2)取约 1.5 g 在-70℃冰箱冻存过夜的幼嫩亚麻幼叶组织材料,放入研钵中,加入液氮研磨至粉末状,用干净的灭菌不锈钢勺转移粉末至 65℃预热的离心管中,使总体积达到约 3.5 mL,混匀后置于 65℃水浴锅中保温 60 min,并不时轻轻转动离心管。

(3)加等体积的氯仿/异戊醇(24:1),轻轻地颠倒混匀,保证样品和氯仿混合均匀,在 4℃下 13 000 r·min<sup>-1</sup>离心 10 min 后,转移上清至另一新管中。

(4)向试管中加入 5 μL 质量浓度为 10 mg·mL<sup>-1</sup>的 RNAase A,37℃保温 30 min。

(5)加 2 倍体积的预冷异丙醇,轻摇混匀后静置 10 min,置于碎冰上约 30 min。

(6)在 4℃下 13 000 r·min<sup>-1</sup>离心 10 min 后,弃上清。

(7)用 70%乙醇清洗沉淀,重复 1 次,在室温下倒置晾干后溶于 200 μL 的灭菌 d<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O 中。

(8)用紫外分光光度计测定 DNA 的浓度并分析纯度。取 60 μL DNA 溶液,稀释 5 倍后,放入石英比色皿中,测定波长分别为 260、280 nm 的 OD 值。DNA 样品质量浓度/μg·mL<sup>-1</sup>=OD<sub>260</sub>×5×50。

(9)将调好的 DNA 样品放入-20℃冰箱保存,备用。

(10)取 5 μL 样品用于 1%琼脂糖凝胶电泳检测,分析 DNA 的完整性。

## 2 结果与分析

### 2.1 DNA 的紫外分光光度计分析

提取的 DNA 用紫外分光光度计测定波长为 260 nm 和 280 nm 的光吸收值,分别计为 OD<sub>260</sub>和 OD<sub>280</sub>。从表 1 可以看出,OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub>为 1.73,说明以亚麻为材料提取的 DNA 具有很高的质量浓度,达到了 0.18 μg·mL<sup>-1</sup>。

表 1 DNA 的紫外分光光度测定结果

OD <sub>260</sub>	OD <sub>280</sub>	OD <sub>260</sub> /OD <sub>280</sub>	DNA 质量浓度/μg·mL <sup>-1</sup>
0.730	0.422	1.73	0.18

### 2.2 DNA 的电泳分析

提取的 DNA 用 1%的琼脂糖凝胶进行电泳分析(见图 1)。从基因组 DNA 的电泳结果可看出,经提取所得到的亚麻基因组 DNA 分子量较大,而

收稿日期:2011-03-17

作者简介:吴建忠(1983-),男,内蒙古自治区乌兰察布市人,硕士,研究实习员,从事亚麻遗传育种研究。E-mail: wujianzhong176@163.com。

且条带清晰、无拖尾、无 RNA 条带。说明 DNA 提取过程中,没有被污染, RNA 除得较干净。

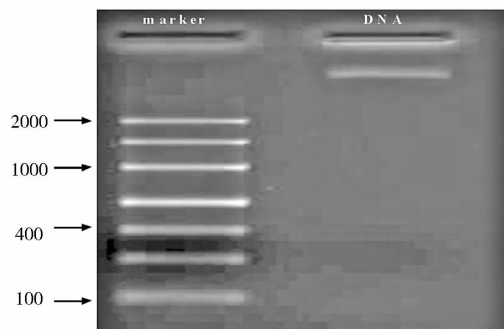


图1 亚麻基因组 DNA 的琼脂糖凝胶电泳

### 3 DNA 提取过程应注意的细节

全基因组 DNA 的提取是进行亚麻遗传学及分子生物学研究的基础技术,现在有多种方法用于 DNA 的提取,但大多数作物因其自身特点,采用常规的方法很难提取出高质量的 DNA,因此必须在常规的方法上进行一些必要的改进和细节规范。

#### 3.1 防止 DNA 变性

亚麻基因组 DNA 的二级结构和双链易受多种因素的影响引起双链解开,即所谓的“变性”,因此抽提时要尽量避免使用如强酸、强碱、加热、低盐浓度、有机溶剂、酰胺类、尿素等可使 DNA 变性的条件,且各环节必须严格添加相应的缓冲液。

#### 3.2 抑制 DNase 的活力

DNase 就如同一把剪刀,能把大分子的 DNA 剪成小段的碎片,必须通过多种途径一起使用来加以杜绝:(1)严格执行低温操作,一般在冰上操作即可;(2)防止皮肤特别是手部接触污染;(3)调节 pH,使偏碱(一般调节到 pH8.0);(4)抽提缓冲液中严格加入表面活性剂,使混合液中的蛋白质成分变性;(5)裂解液中添加螯合剂(一般为 EDTA)除去酶的辅助因子( $Mg^{2+}$ ),使酶丧失活性,从而保护 DNA 免受酶降解。

#### 3.3 防止亚麻 DNA 的理化因素降解

DNA 分子特别大,极易被机械张力拉断,甚

至在细管中稍强点的震动也会使 DNA 断裂,所以在抽提过程中要特别注意这一点,操作过程要尽量简便、轻柔、减少搅拌次数,切勿剧烈摇动;在强酸或强碱的环境下, DNA 都会降解,一般取 pH8.0 左右为宜;温度太高也易使 DNA 失活,应低温( $-20^{\circ}\text{C}$ )保存材料,避免反复冻融,在提取中低温沉淀时,适当延长沉淀时间,保证沉淀完全。

#### 3.4 防止次生代谢物的干扰

尽可能选幼嫩的、代谢旺盛的亚麻新生组织作为提取 DNA 的材料,操作中一般取亚麻新鲜叶片或茎上端 15 cm,这是因为幼嫩的新生组织次生代谢物较少, DNA 含量高,且易于破碎,还应在液氮研磨解冻前加入裂解缓冲液。

### 4 结论与讨论

随着分子生物学研究的不断深入,各种样品提取总 DNA 的方法陆续建立起来,但没有一种方法能适应于所有的样品,每一种样品都需要根据其特有的理化和生物学特性,优化出一种合适的提取 DNA 的方法<sup>[2]</sup>。当前出现的用于亚麻总 DNA 提取的方式也很多,但大多采用 CTAB 法稍加改良。然而,由于亚麻本身的果胶含量较高,提取 DNA 的过程中液体比较粘稠,不利于杂质的去除,因此提取获得的 DNA 通常需要经过试剂盒的纯化才能用于分子生物学实验。而该文提到的细节如能在 CTAB 法改良后提取时得到很好的注意,则最终提取获得的 DNA 结构完整,质量浓度达到  $0.18 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,基本没有杂质,可用于后续进行的 PCR 和酶切操作,不经纯化即可直接用于相继进行的分子生物学实验研究。

#### 参考文献:

- [1] 黄文功. 亚麻 RAPD 的反应体系优化及引物筛选[J]. 黑龙江农业科学, 2009(2): 4-6.
- [2] Bona ti C, Parayre S, Irlinger F. Novel extraction strategy of ribosomal RNA and genomic DNA from cheese for PCR-based investigations[J]. International Journal of Food Microbiology, 2006, 107(2): 171-179.

## Extraction and Analysis of DNA in Flax Genomic

WU Jian-zhong

(Industrial Crops Institute of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin, Heilongjiang 150086)

**Abstract:** The genomic DNA of flax was extracted by improved CTAB method. It was analyzed by ultraviolet spectrophotometer and agarose gel electrophoresis. The results showed that the structure of the obtained DNA was complete with little impurities and high concentration, it could be used for experiments of molecular biology such as PCR and enzyme digestion without purifying. Meanwhile, some techniques and precautions in the process were also discussed.

**Key words:** flax; DNA; extraction method