

改进的 CTAB 法提取黄瓜 DNA^{*}

王宏建¹, 吴越¹, 谷维², 孙晓丹¹, 秦智伟³

(1. 黑龙江大学生命科学学院, 哈尔滨 150080; 2. 黑龙江省农科院作物营养实用技术研究所, 哈尔滨 150086; 3. 东北农业大学园艺学院, 哈尔滨 150030)

摘要: DNA 抽提是对生物体进行基因操作的基础性工作。经多次实验, 我们对 CTAB 法提取黄瓜 DNA 进行了改进, 并对所得 DNA 的质量和浓度进行了检测。结果表明, 这是一种提取植物 DNA 的省时简单而高效的方法。通过很少量的样品即可以提到 DNA。

关键词: DNA 提取; 黄瓜; CTAB 法

中图分类号: S 603.642.2 文献标识码: B 文章编号: 1002-2767(2006)05-0124-02

Extraction of DNA from Cucumber by Improved CTAB Method

WANG Hong jian¹, WU Yue¹, GU Wei², SUN Xiao dan¹, QIN Zhi wei³

(1. Heilongjiang University, Harbin 150080; 2. Crop Nutriion and Practical Technology Institute, Heilongjiang Academy Agricultural Sciences, Harbin 150086; 3. Northeast Agricultural University, Harbin 150030)

Abstract: It is a basic job in doing gene manipulation of creature to extract DNA. After several experimentations, some alterations were found in extracting DNA form cucumber by CTAB method, and we detected the quality and concentration of DNA. The result indicted, this was a simple and high efficiency method to extract DNA of plant. And it also could save time. We could use a few samples to get DNA.

Key words: DNA extraction; cucumber; CTAB method

在分子生物学研究中, 提取 DNA 对于试验成功极其重要。由于植物材料好处理, 其 DNA 更难提取。近年来已经建立了许多简便、经济的方法, 使用这些方法能从少量样品组织中提取高产量的 DNA, CTAB 法是其中之一^[1]。CTAB 法的最大特点是能很好地消除糖类杂质, 所以对于含酚类物质及糖类物质较高的植物材料, 采用 CTAB 法是比较理想的。该方法的另一个特点是在提取的前期能得到高含量的 DNA 与 RNA, 可根据实验的需要, 分别进行纯化, 如只需要 DNA 则可用 RNA 水解酶水解掉 RNA^[2]。本次试验就是在王关林等人的 CTAB 法的基础上^[3~5], 作了适当改进, 提取了多个黄瓜品种中的 DNA, 并对所提取的 DNA 的质量和浓度作了测定。

1 材料与方法

1.1 材料

以黄瓜 649, D0351, 649×翠玉 8 号, C05—126, 翠玉 8 号自交, 649×D0351 六个黄瓜品种为试验材料, 由东北农业大学的园艺分子学实验室提供。

1.2 DNA 提取过程中所用溶液及试剂

(1) CTAB 缓冲液: 1 mmol/L Tris(PH7.5), 0.5 mmol/L EDTA(PH8.0), 5 mmol/L NaCl, 2% CTAB; (2) 氯仿/异戊醇(24:1); (3) 异丙醇; (4) 10 mg/mL Rnase; (5) TE 缓冲液(PH8.0)。

1.3 DNA 提取步骤

(1) 预先在 1.5 mL 离心管中加好 500 μL 的 CTAB 提取缓冲液; (2) 从田间取回幼嫩离心管盖大

* 收稿日期: 2006-06-12

第一作者简介: 王宏建 (1984-), 女, 辽宁省人, 学士, 从事生物技术研究; E-mail: guwei.link@yahoo.com.cn.
2019-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

小新鲜叶片 1~2 片,用自来水、蒸馏水先后冲洗叶面,用吸水纸吸干水分备用。把叶片置于陶瓷研钵中,加入液氮,快速充分研磨。将研磨好的叶片,快速转移到加好 CTAB 缓冲液的离心管中;(3)65℃水浴 1 h(根据作物种类不同适当调整);(4)置于 4℃冰箱或室温冷却至 15℃以下;(5)加入 250 μL 体积比 24:1 氯仿/异戊醇,上下混匀 5 min,保证样品与氯方充分混合;(6)13 000 rpm 离心 10 min;(7)取上清液 200 μL,加入预先加好 200 μL 异丙醇的 1.5 mL 离心管中,轻轻上下颠倒混匀;(8)4℃冰箱静置 30 min 以上;(9)13 000 rpm 离心 10 min,弃上清液;(10)吹干 DNA,让异丙醇挥发干净;(11)加入 100 μL ddH₂O(含 1 μL 10 mg/mL 的 RNase)溶解 DNA;(12)37℃水浴或室温 1 h 去除 RNA。

1.4 DNA 浓度和质量的检测

琼脂糖凝胶电泳法:取 3 μL 提取的 DNA,加入 9 μL TE 染料,0.8%~1.0%的琼脂糖凝胶电泳,溴化乙锭染色后,UV 紫外凝胶成像系统上观察。

1.5 DNA 浓度和纯度

用这种方法提取黄瓜 DNA,浓度通常在 300 ng/mL 左右(见表)。

表 黄瓜 DNA 浓度 300 ng/mL

DNA 编号	浓度(ng/mL)
① 649	231
② D0351	396
③ 649× 翠玉 8 号	363
④ C05 126	297
⑤ 翠玉 8 号自交	330
⑥ 649× D0351	495

用这种方法提取的黄瓜 DNA 已成功用于 RAPD、AFLP 等技术的 PCR 扩增。

2 结果与讨论

2.1 时间的长短对 DNA 提取的影响

在试验步骤的第 8 步中,要求 4℃冰箱静置

30 min 以上。本研究组对此进行了梯度试验,分别静置了 30、35、40 min,发现静置 40 min 所得到的效果较好。

2.2 试剂的量对 DNA 纯度的影响

本研究组采用 CTAB 法对多个黄瓜品种的 DNA 提取情况进行了研究,发现样品中蛋白质含量较多时,适当增加 24:1 的氯仿/异戊醇的量,可使蛋白质沉淀下来,从而提高产物的纯度。我们对此也进行了试验,分别加了 1、2、3 次 250 μL 体积比 24:1 氯仿/异戊醇。发现在样品较多时,氯仿/异戊醇的量对 DNA 提取的影响较大。

2.3 转移材料快慢对 DNA 产量的影响

材料在液氮冷冻条件下研磨破碎,在将研磨好的冻粉材料转入离心管中时,动作要迅速,不够迅速就会导致材料融化,从而没有保护好 DNA。造成 DNA 产量的减少。

3 结论

通过采用 CTAB 法对多个黄瓜品种的 DNA 提取情况研究,本研究组发现 4℃冰箱静置 40 min 以上所得到的效果较好,同时样品中蛋白质含量较多时,适当增加 24:1 的氯仿/异戊醇的量,可使蛋白质沉淀下来,从而提高产物的纯度。这种改进的 CTAB 法是提取植物 DNA 的省时简单而高效的方法。通过很少量的样品即可以提到 DNA。

参考文献:

[1] 曲士松,刘宪华,黄宝勇,等. CTAB 法提取大蒜、白菜基因组 DNA[J]. 山东农业大学学报(自然科学版), 2000, 31(4): 427-429.

[2] 胡芳名,谭晓风,何德,等. CTAB 法抽提香榧种子胚乳 DNA 的改进[J]. 湖南林业科技, 2002, 29(1): 1-5.

[3] 王关林,方宏筠. 植物基因工程[M]. 北京: 科学出版社, 2002.

[4] 陈昆松,李方,徐昌杰,等. 改良 CTAB 法用于多年生植物组织基因组 DNA 的大量提取[J]. 遗传, 2004, 26(4): 529-531.

[5] 刘小勇,田素忠,秦国夫,等. 提取植物和微生物 DNA 的 SDS CTAB 改进法[J]. 北京林业大学学报, 1997, 19(3): 100-103.

