

快速提取籽用南瓜基因组 DNA 方法的研究

赵茜,徐丽珍

(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:为快速高效提取作物基因组 DNA,以南瓜品种为试材,对籽用南瓜基因组 DNA 的快速、高效提取方法进行研究,并对产物进行紫外分光光度计和琼脂糖凝胶电泳分析。结果表明:通过对 CTAB 改良后提取的基因组 DNA 结构较完整,杂质较少,浓度较高,可经纯化直接用于进一步的 PCR 等分子生物学研究。

关键词:籽用南瓜;DNA;提取方法

中图分类号:S642.1

文献标识码:A

文章编号:1002-2767(2011)10-0014-03

籽用南瓜是葫芦科南瓜属中食用种子的栽培品种,以种子作为主要食用器官。其仁肉香酥,不但营养丰富,为炒货中之佳品,而且有多种医疗保健功效。近年来,随着人们生活水平的提高,以及南瓜籽医疗保健功效的研发,南瓜籽出口数量逐年提高,籽用南瓜种植面积不断扩大^[1]。由于国内外市场对南瓜籽的需求量也不断增加,有关科研单位对籽用南瓜的基础研究逐渐开始重视。DNA 的分离提取是进行籽用南瓜分子生物学研究工作的基础,DNA 样品的质量是分子试验成败的关键因素之一^[2]。关于籽用南瓜 DNA 提取方面的研究国内尚未见报道。其它作物的提取方法大多局限于传统的 CTAB 法,但这种方法从提取的质量和速度上都略显不足。该试验通过对传统的 CTAB 法进行改良,研究出快速、高效提取籽用南瓜基因组 DNA 的方法,该方法比传统的 CTAB 法不仅简化了操作步骤,为后续研究节省时间,提高工作效率,也为今后的分子生物学研究奠定了一定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

选取籽用南瓜新鲜叶片若干,装入塑料袋中,置于-70℃冰箱冻存过夜。

1.2 方法

在 50 mL 离心管中,加入 20 mL 的 2×

CTAB (2% CTAB, 100 mmol·L⁻¹ Tris-HCl, 20 mmol·L⁻¹ EDTA, pH8.0),在 65℃预热。取约 5 g 在-70℃冰箱冻存过夜的南瓜叶片,研磨至粉末状,转移至预热的离心管中,混匀置于 65℃水浴锅中保温 60 min,并不时轻轻转动离心管。加 20 mL 氯仿/异戊醇(24:1),4℃下 13 000 r·min⁻¹ 离心 10 min 后,转移上清至另一新管中。加 2 倍体积的预冷异丙醇,混匀后静止 10 min,挑取絮状物于新的离心管。用冰乙醇清洗沉淀,倒置晾干后溶于含 RNAase 的灭菌 d₂H₂O 200 μL 中,-20℃冰箱保存,备用。用紫外分光光度计测定 DNA 的浓度并分析纯度。用 1.5% 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

提取的籽用南瓜 DNA 用紫外分光光度计测定波长为 260 和 280 nm 的光吸收值,分别计为 OD₂₆₀ 和 OD₂₈₀,DNA 样品质量浓度=OD₂₆₀×5×50(μg·mL⁻¹),该研究稀释 5 倍。从表 1 可以看出,OD₂₆₀/OD₂₈₀ 为 1.717,说明所提取的 DNA 具有较高的质量浓度,达到了 0.184 μg·μL⁻¹。

表 1 DNA 的紫外分光光度测定结果

OD ₂₆₀	OD ₂₈₀	OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀	DNA 质量浓度/μg·μL ⁻¹
0.735	0.428	1.717	0.184

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 的电泳结果来看,提取的籽用南瓜基因组 DNA 分子量较大,而且条带较清晰、无 RNA 条带。说明 DNA 提取过程中,几乎没有被污染,RNA 去除干净。

收稿日期:2011-06-16

第一作者简介:赵茜(1982-),女,内蒙古自治区乌兰察布市人,硕士,研究实习员,从事籽用南瓜病害及遗传育种研究。E-mail:zhaoqian0401@sina.com。

通讯作者:徐丽珍(1963-),女,黑龙江省双城市人,副研究员,从事籽用南瓜遗传育种及栽培技术研究。E-mail:jzsxulizhen@163.com。

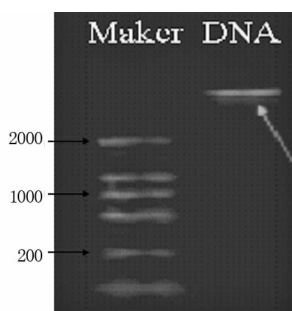


图1 籽用南瓜基因组 DNA 琼脂糖凝胶电泳

3 结论与讨论

该试验研究出快速高效提取籽用南瓜基因组 DNA 的方法,为籽用南瓜进一步的分子生物学研究奠定了基础。此方法在节省时间、提高效率的同时,简化了操作步骤,与传统方法相比,抽提中省去了 β -巯基乙醇、酚两个步骤,一次抽提即可;洗涤中用纯冰乙醇单次洗涤代替 70% 冰乙醇的多次洗涤;溶解缓冲液直接用 $\text{d}_2\text{H}_2\text{O}$,省去了 TE 缓冲液的使用。所提取的基因组 DNA 纯度较高,

杂质较少,完全可以满足进一步进行分子生物学相关研究开展试验的要求。

该研究方法提取的 DNA 对于一些高纯度要求的试验,还需进一步的纯化。同时,在提取过程中应综合考虑提取步骤的具体实施,特别是采样、保存以及提取的环节^[3]。

以嫩叶为材料,其杂质成分少且核酸含量高,在基因组 DNA 提取过程中容易降解,因此在提取时应注意:采样后应尽快地速冻,减少降解。研磨时可直接从低温冰箱中拿出,在冰上进行。尽量利用蛋白酶和 RNA 酶来除去蛋白质和 RNA 杂质。

参考文献:

- [1] 于红茹. 我国籽用南瓜现状及前景分析[J]. 北方园艺, 2001(6):54.
- [2] 谭行之,崔崇士,屈淑平. 南瓜作物分子标记辅助育种研究进展[J]. 中国瓜菜, 2010, 23(3):37-40.
- [3] 刘维侠,曹振木,王秀全. 彩色甜椒基因组 DNA 提取方法的优化[J]. 热带农业科学, 2010, 30(2):19-23.

A Rapid Method for Extraction Genomic DNA from Seed Squash

ZHAO Qian, XU Li-zhen

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

Abstract: In order to extract DNA fast and efficient, the seed squash was taken as materials to study the extraction method. It was analyzed by ultraviolet spectrophotometer and agarose gel electrophoresis. The results showed that structure of DNA was complete but had less impurities, its concentration was high, it could be directly used for the further study of molecular biology (such as PCR).

Key words: seed squash; DNA; extraction method

《经济研究导刊》编辑部征稿简则

《经济研究导刊》是经济类学术刊物,由黑龙江省新闻出版局主管,黑龙江省报刊出版中心主办,国内外公开发行人。第二届北方优秀期刊,经济类核心期刊。国内统一刊号 CN23-1533/F,国际刊号 1673-291X。

主要栏目:专家论坛、热点探讨、经济理论、财政与税务、企业改革与发展、新农村建设、东北老工业基地、新农村建设、金融证券、市场营销、财会研究、劳动经济、企业管理、区域经济、管理天地、经贸探索、经济与法、收入与分配、旅游经济、社会保障研究、产业经济、集团经济、城市经济、循环经济、生态经济、法学探析、人文探索、教育视角等。

根据《中国学术期刊(光盘版)》检索与评价数据规范的要求,来稿需符合以下规定:

1. 在篇首标明作者姓名、论文署名的单位(全称)、及单位所在省市、邮编(附英文)。
2. 稿件须有:摘要 220 字左右(归纳文章的主要内容,切忌使用“本文”如何、“文章”如何这类评价性、解释性、介绍性的词语)、关键词(3~6 个)(附英文摘要、关键词);作者简介:姓名、出生年、性别、民族、籍贯或出生地、工作单位、职务或职称、学位、研究方向。
3. 作者须提供:详细的通信地址、邮政编码、联系电话、电子信箱。
4. 来稿中的注释与参考文献分别排列。注释是对文章篇名、作者及正文中某一特定内容的进一步解释或补充说明,序号用数字加圆圈标注。参考文献是作者写论文时所参考的图书报刊等资料的引文。参考文献条目的编排格式如下:[序号]主要责任者. 文献题名. 刊名或出版地,起止页码. {刘国东. 农村劳动力有序转移的经济意义[J]. 商业经济, 2001(9):10-18.}。
5. 所有来稿,字数以 4 000~8 000 字为宜,来稿以 word 格式发送电子邮件。

电子邮箱: jyjydk2014@163.com jyjydk2002@163.com