

水稻基因组 DNA 提取方法的研究

马文东

(黑龙江省农业科学院 佳木斯水稻研究所, 黑龙江 佳木斯 154026)

摘要:为探索分子标记辅助选择育种中快速有效的 DNA 提取方法,以水稻新鲜叶片、衰老叶片、水稻种子为材料,以 CTAB 法和 SDS 法为提取方法,利用紫外分光光度计和琼脂糖凝胶电泳进行 DNA 纯度检测,对水稻基因组 DNA 提取方法和实验体系进行了优化和摸索。结果表明:新鲜叶片提取效果最好,其次是种子,再次是衰老叶片;CTAB 法和 SDS 法差别不大;为避免酚类物质氧化污染,可在提取液中添加 β -巯基乙醇。

关键词:水稻;基因组 DNA;CTAB 法;SDS 法;分子标记辅助育种

中图分类号:S511.035.3

文献标识码:A

文章编号:1002-2767(2014)01-0007-04

传统的育种主要依靠植株的表现型进行选择,但其选择效率低、育种时间长,而分子标记辅助育种依靠与目的基因紧密连锁的分子标记进行选择,受其它效应和环境因素影响小,能够在早期世代选择,缩短育种年限,提高选择效率。水稻分子标记辅助育种已在实践中广泛应用,关于不同分子标记在水稻中的应用已有大量的研究报道^[1-8]。

水稻基因组 DNA 的提取是分子标记辅助育种过程中基础的实验技术之一,提取基因组 DNA 的质量直接影响到后期分子生物学实验的结果。对于水稻基因组 DNA 的提取已有相关研究报道^[9-16]。水稻叶片和其它组织中含有大量的多糖和多酚等代谢产物,增加了提取高质量 DNA 的困难。因此,优化水稻基因组 DNA 提取方法具有重要意义。

该研究以水稻新鲜叶片、衰老叶片和种子为提取材料,采用 CTAB 法和 SDS 法提取水稻基因组 DNA,利用紫外分光光度计和琼脂糖凝胶电泳进行 DNA 纯度检测。旨在获得最佳提取部位以及最优的提取方法,并提出改进意见,探索出分子标记辅助选择育种中快速有效、高质量的 DNA 提取方法,为水稻分子辅助育种提供有效的技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料

以水稻的种子、新鲜叶片和衰老叶片为供试材料。将水稻种子催芽后放于培养箱中,25℃培养 7 d 获得水稻新鲜叶片。衰老的叶片于 9 月中旬采摘,保存于-80℃的冰箱中。种子为成熟种子,室温保存,水分含量为 14%。

1.2 方法

1.2.1 CTAB 法提取水稻基因组 DNA (1)分别取水稻幼嫩叶片、衰老叶片和种子放入液氮预冷过的研钵中,加入液氮研磨至粉末状,移入到 10 mL 离心管中;(2)将 2% CTAB 提取缓冲液放入 65℃的水浴中预热;(3)向离心管中加入 4 mL CTAB 提取液混匀,65℃水浴 30~60 min,其间每隔 10 min 轻摇;(4)加入 4 mL 的体积比为 24:1 的氯仿:异戊醇溶液于离心管中,置于摇床,70 r·min⁻¹,轻摇 10 min;(5)4℃,10 000 r·min⁻¹离心 10 min,将上清液转入一个新的 10 mL 的离心管中(步骤 4~5 可重复 2~3 次);(6)加入 2 倍体积-20℃预冷的无水乙醇,混匀,-20℃放置 30 min;(7)10 000 r·min⁻¹离心 3 min,弃上清;(8)70%乙醇清洗,吹干;(9)将 DNA 溶于 TE 溶液中;(10)向 DNA 原液中加入 3 μ L Rnase A(10 mg·mL⁻¹),置于 37℃恒温培养箱中消化 1~2 h;(11)-20℃保存待用。

1.2.2 SDS 法提取水稻基因组 DNA (1)分别取水稻幼嫩叶片、衰老叶片和种子放入液氮预冷过的研钵中,加入液氮研磨至粉末状,移入 10 mL 离心管中,加入 65℃预热的 4 mL 的提取液;(2)65℃水浴 30 min,加入 1 mL 5 M 醋酸钾(KAC)

收稿日期:2013-08-21

基金项目:国家“十二五”科技支撑计划资助项目(2011BAD35B02-01-01,2012BAD04B01-01-01)

作者简介:马文东(1980-),男,黑龙江省桦南县人,硕士,助理研究员,从事水稻遗传育种研究。E-mail:sdsmawendong@163.com。

溶液,混匀后冰浴 20~30 min,不时震动以免成团;(3)加入体积比为 24:1 的氯仿:异戊醇 4 mL,充分混匀,室温下,10 000 r·min⁻¹ 离心 5 min;(4)吸取上清液于另一 10 mL 的离心管中,加入-20℃预冷的 0.6~1.0 倍体积的异丙醇,缓慢混匀,使 DNA 成线团状沉淀析出;(5)10 000 r·min⁻¹ 离心 3 min,倒掉上清液,加入 70%乙醇洗涤,吹干;(6)加入适量 TE 缓冲液溶解;(7)加入 1/10 体积的 RNase A(10 mg·mL⁻¹),37℃ 条件下恒温 1 h,除去 RNA;(8)置于-20℃冰箱中保存备用。

1.2.3 β -巯基乙醇抗氧化作用分析 在水稻基因组 DNA 提取的过程中,由于酚类物质的氧化,DNA 污染后会呈现褐色。为改善提取效果,设置 CTAB 提取液中添加 β -巯基乙醇和不添加 2 个处理,以衰老叶片为材料,3 次重复,所得基因组 DNA 利用紫外分光光度计测定 OD₂₃₀、OD₂₆₀ 和 OD₂₈₀。

1.2.4 琼脂糖凝胶电泳检测 采用 1% 的琼脂糖凝胶进行水稻基因组 DNA 的纯度检测。

1.2.5 紫外分光光度计检测 取母液适当稀释,用紫外可见光分光光度计测样品在 230、260 和 280 nm 波长的吸光值,并根据 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 的比值判断 DNA 纯度。蛋白质的最大吸收峰在 280 nm 处,多糖的最大吸收峰在 230 nm 处。纯 DNA 的 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 为 1.7~2.0 或 OD₂₆₀/OD₂₃₀>2.0,OD₂₆₀/OD₂₈₀>2.0 或 OD₂₆₀/OD₂₃₀<2.0 表明有其它物质干扰。对于纯 DNA,OD₂₆₀ 值为 1 时相当于 50 μ g·mL⁻¹ 双链 DNA,故 DNA(双链)含量为 OD₂₆₀×50 μ g·mL⁻¹×比色时的稀释倍数。

1.2.6 PCR 扩增检测 采用水稻 SSR 引物 RM217,序列为上游:5'atc gca gca atg cct cgt 3',下游:5'ggg tgt gaa caa aga cac 3'。PCR 扩增体系为(20 μ L):Mg²⁺(1.0 mmol·L⁻¹ MgCl₂)1.5 μ L,

10×PCR Buffer 2 μ L,0.2 mmol·L⁻¹ dNTP 0.3 μ L,Taq 酶(5 U· μ L⁻¹)0.2 μ L,0.4 μ mmol·L⁻¹ 引物 3 μ L,模板 DNA 3 μ L,dd H₂O 10 μ L。PCR 反应程序为:95℃预变性 5 min,94℃变性 40 s,47℃退火 40 s,72℃延伸 40 s,循环 30 次,72℃延伸 5 min,4℃保存。

2 结果与分析

2.1 不同提取材料效果比较

2.1.1 CTAB 法提取 3 种材料基因组 DNA 纯度比较 从图 1 看出,利用 CTAB 法时新鲜叶片 DNA 的提取效果较好,条带清晰,点样孔处无污染;衰老叶片提取的基因组 DNA 存在降解的现象;种子提取的基因组 DNA 在点样口处较亮,说明存在蛋白质的污染。

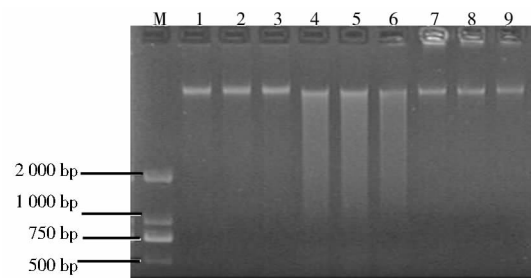


图 1 CTAB 法提取水稻基因组 DNA 琼脂糖凝胶电泳图

M:DL2000 DNA Marker;1,2,3:新鲜叶片基因组 DNA;4,5,6:衰老叶片基因组 DNA;7,8,9:种子基因组 DNA

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of rice genomic DNA by CTAB

M:DL2 000 marker;1,2,3:DNA extracted from fresh leaves of rice;4,5,6:DNA extracted from senescent leaves of rice;7,8,9:DNA extracted from rice seeds

紫外分光光度计所测 9 份基因组 DNA 的 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 值见表 1。从表 1 中可知,新鲜叶片提取的基因组 DNA 纯度较高,其 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 接近 1.8;衰老叶片含有多酚类物质氧化对 DNA 纯

表 1 CTAB 法提取水稻基因组 DNA 紫外分光光度计检测

Table 1 UV spectrophotometer detection of rice genomic DNA by CTAB

基因组 DNA Genomic DNA	1	2	3	4	5	6	7	8	9
OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀	1.72	1.77	1.83	2.13	2.45	2.51	1.34	1.45	1.52

度造成影响, $OD_{260}/OD_{280} > 2.0$; 种子提取的基因组 DNA < 1.7 , 说明含有蛋白质污染。

2.1.2 SDS 法提取 3 种材料基因组 DNA 纯度比较 由图 2 可知, SDS 法中新鲜叶片提取的基因组 DNA 条带清晰且明亮, 质量较高; 衰老叶片提取的 DNA 同样存在不同程度的降解; 种子提取的 DNA 点样孔清楚, 没有蛋白质的污染, 说明该方法较 CTAB 法提取种子基因组 DNA 在蛋白质去除方面效果较好。

表 2 结果表明, 新鲜叶片提取的基因组 DNA 纯度较高, OD_{260}/OD_{280} 值接近 1.8; 衰老叶片中多酚类物质氧化对 DNA 纯度造成影响, $OD_{260}/OD_{280} > 2.0$; 种子提取的基因组 DNA OD_{260}/OD_{280} 接近 1.7, 说明虽然含有蛋白质的少量污染, 但是较 CTAB 法提取的种子基因组 DNA 去除蛋白质的效果好。

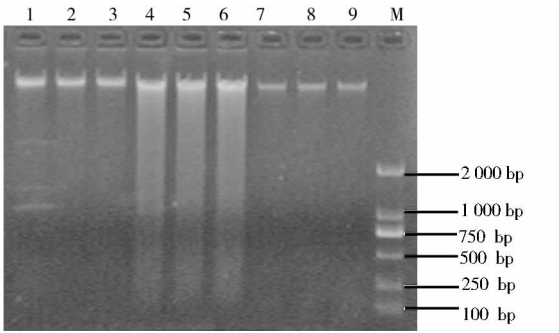


图 2 SDS 提取水稻基因组 DNA 琼脂糖凝胶电泳图
M: DL2 000 DNA Marker; 1、2、3: 种子基因组 DNA; 4、5、6: 衰老叶片基因组 DNA; 7、8、9: 新鲜叶片基因组 DNA

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of rice genomic DNA by SDS
M: DL2 000 marker; 1, 2, 3: DNA extracted from rice seeds of rice; 4, 5, 6: DNA extracted from senescing leaves of rice; 7, 8, 9: DNA extracted from fresh leaves

表 2 SDS 法提取水稻基因组 DNA 紫外分光光度计检测

Table 2 UV spectrophotometer detection of rice genomic DNA by SDS

基因组 DNA Genomic DNA	1	2	3	4	5	6	7	8	9
OD_{260}/OD_{280}	1.7	1.8	1.73	2.12	2.45	2.07	1.68	1.54	1.59

2.2 CTAB 法和 SDS 法提取效果比较

由图 1 和图 2 可以看出, 利用 CTAB 法和 SDS 提取新鲜叶片基因组 DNA 效果差异不大, 均能获得质量较高的基因组 DNA; 衰老叶片中均不同程度存在降解的效果, 但在种子中基因组 DNA 利用 SDS 法提取蛋白质污染较少。

2.3 β -巯基乙醇抗氧化剂的作用

为了减少酚类物质氧化污染基因组 DNA, 在提取液中加入 β -巯基乙醇, 以衰老叶片为材料, 所得基因组 DNA 利用紫外分光光度计测定 OD_{230} 、 OD_{260} 和 OD_{280} , 所得比值见表 3。

表 3 β -巯基乙醇抗氧化剂的作用

Table 3 The antioxidant effect of β -mercaptoethanol

基因组 DNA Genomic DNA	不添加 β -巯基乙醇 Without β -mercaptoethanol			添加 β -巯基乙醇 Added β -mercaptoethanol		
	1	2	3	4	5	6
OD_{260}/OD_{280}	2.42	2.54	2.37	2.3	2.19	2.25
OD_{260}/OD_{230}	1.74	1.81	1.86	1.89	1.93	1.8

由表 3 可以看出, 添加 β -巯基乙醇后基因组 DNA OD_{260}/OD_{280} 较不添加有所降低, 添加 β -巯基乙醇后基因组 DNA OD_{260}/OD_{230} 较不添加有所升高, 添加 β -巯基乙醇后基因组 DNA 中其它物质减少, 表明 β -巯基乙醇能有效减少酚类物质氧化。

2.4 水稻基因组 DNA 的 PCR 扩增

根据试验结果所得优化的水稻基因组 DNA 提取的方法为: 以新鲜叶片为试验材料, 采用 CTAB 法, 并向 CTAB 提取液中添加 β -巯基乙醇提取 DNA, 对所得基因组 DNA 稀释液利用水稻 SSR 引物(RM214)进行 PCR 扩增, 琼脂糖检测结果见图 3。

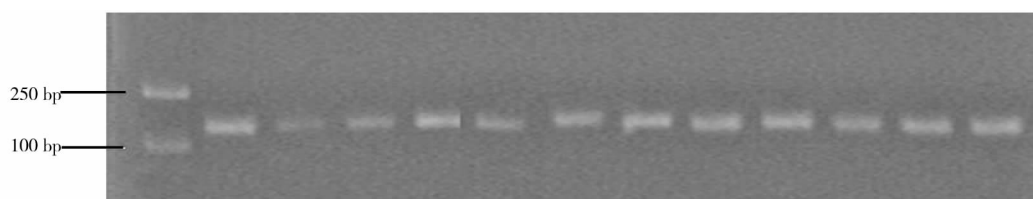


图 3 琼脂糖检测水稻 SSR 引物(RM214)PCR 扩增产物

Fig. 3 Agarose gel electrophoresis detection of PCR products with primer RM214

由图 3 看出,利用优化的水稻基因组 DNA 提取方法获得的 DNA,以水稻 SSR 引物 RM217 进行 PCR 扩增,扩增效果良好,扩增产物均在 100 和 250 bp,符合实验要求。

3 结论与讨论

3.1 不同提取材料对基因组 DNA 的影响

不同提取材料对基因组 DNA 的提取效果也有不同的影响。闫双勇等^[17]的研究表明,以种子为实验材料提取的基因组 DNA 浓度显著低于以叶片为实验材料的基因组 DNA 浓度。该文研究结果表明,新鲜叶片作为提取材料所提取的基因组 DNA 纯度高、杂质污染少,且获得率高。衰老叶片研磨较新鲜叶片困难、得率低,还存在降解的现象。种子作为提取材料,获得容易,但研磨困难,提取的基因组 DNA 存在严重的蛋白质污染现象。

3.2 CTAB 法和 SDS 法对基因组 DNA 提取的影响

袁云香等^[18]研究表明,不同方法提取的 DNA 各有其优点,DNA 纯度和浓度方面,CTAB 法效果较好。该文研究结果表明,两种方法对于以新鲜叶片和衰老叶片作为提取材料差别不大,以种子为提取材料时,SDS 法在去除蛋白质污染上略好。

3.3 水稻基因组 DNA 提取方法的改进

3.3.1 老叶提取时,避免对 PCR 反应的抑制作用 老叶 DNA 提取过程中存在褐化现象,针对这一情况在提取液中加入 β -巯基乙醇或者是 PVP 可以防止酚类氧化,避免对 PCR 反应有抑制作用。

3.3.2 盐离子的去除 加入 1/10 体积的 NaAc(pH5.2,3 mol·L⁻¹),用预冷的乙醇或异丙醇沉淀 RNA 吸附或沉淀后应用 70% 的乙醇洗涤,以除去盐离子等。

3.3.3 溶解 DNA 时使用 TE 缓冲液防止 DNA 酸解 若长期保存建议使用 TE 缓冲液溶解,可

防止 DNA 发生酸解。

参考文献:

- [1] 李雪林,梁华,张泽民,等. 分子标记技术在植物遗传育种中的进展[J]. 河南科技大学学报,2004,24(2):69-72.
- [2] 周锦霞,敖光辉,魏琴,等. 分子标记辅助选择及其在植物抗病育种中的作用[J]. 宜宾学院学报,2005(6):90-92.
- [3] 黄文坤,郭建英,万方浩. AFLP 标记在植物遗传多样性研究中的应用[J]. 农业生物技术科学,2006,22(8):50-54.
- [4] 黄小群. 一份新的水稻黄化突变体的遗传分析及基因定位[D]. 雅安:四川农业大学,2006:27-28.
- [5] 黄龙花,吴清平,杨小兵,等. 基于特定引物 PCR 的 DNA 分子标记技术研究进展[J]. 生物技术通报,2011(2):62-63.
- [6] 张立荣,徐大庆,刘大群. SSR 和 ISSR 分子标记及其在植物遗传育种研究中的应用[J]. 河北农业大学学报,2002,25(1):89-94.
- [7] 刘之熙,陈祖武,朱克永,等. 利用 SSR 分子标记快速鉴定杂交水稻种子纯度技术体系的优化[J]. 杂交水稻,2008,23(1):60-63.
- [8] 雷东阳,陈立云,姜琴. 分子标记辅助选择及其在水稻育种中的应用[J]. 作物研究,2005(5):257-260.
- [9] 孙川. 水稻基因组 DNA 简易制备方法研究以及分子标记辅助选择改良稻米品质[D]. 扬州:扬州大学,2010:21-23.
- [10] 易庆平,罗正荣,张青林. 植物总基因组 DNA 提取纯化方法综述[J]. 安徽农业科学,2007,35(25):7789-7791.
- [11] 张宁,王凤山. DNA 提取方法进展[J]. 中国海洋药物,2004(2):40-46.
- [12] 朱世杨,罗天宽,张小玲,等. 8 种水稻基因组 DNA 提取方法的比较[J]. 安徽农业科学,2009,37(5):1929-1931.
- [13] 王景雪,孙毅,高武军. 一种简便实用的植物总 DNA 提取方法[J]. 山西大学学报,2000,23(3):271.
- [14] 桑贤春,何光华,张毅,等. 水稻 PCR 扩增模板的快速制备[J]. 遗传,2003,25(6):705-707.
- [15] 楼巧君,陈亮,罗利君. 三种水稻基因组 DNA 快速提取方法的比较[J]. 分子植物育种,2005,3(5):749-752.
- [16] John M E. An efficient method for isolation of RNA and DNA from plants containing polyphenolics[J]. Nucleic acids research,1992,20(9):2381.
- [17] 闫双勇,苏京平,王胜军. 一种同时适用于水稻种子和叶片的简单快速 DNA 提取方法[J]. 中国稻米,2011,17(5):11-13.
- [18] 袁云香,李海娟. 水稻基因组 DNA 提取方法的研究进展[J]. 湖北农业科学,2010,49(4):968-971.