

# 燕麦种子基因组 DNA 不同提取方法的比较

郝豆豆<sup>1</sup>, 朱 勇<sup>1</sup>, 雷 鸣<sup>1</sup>, 武俊喜<sup>2</sup>, 拉 多<sup>1</sup>, 张勇群<sup>1,3</sup>

(1. 西藏大学, 西藏 拉萨 850000; 2. 中国科学院 地理科学与资源研究所, 西藏 拉萨 850000; 3. 西藏成办医院, 四川 成都 610000)

**摘要:**为缩短 DNA 提取时间, 省去种子萌发到幼苗培养等一系列过程, 以燕麦种子为材料, 用 5 种方法提取其基因组 DNA, 通过紫外分光光度法检测 DNA 的浓度和纯度, 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的完整性, 以 ITS2 为引物将燕麦种子基因组 DNA 进行 PCR 扩增。结果表明: 5 种方法中除了传统 CTAB 法, 其余方法都可以提取到燕麦种子基因组 DNA, 但不同方法提取到的基因组 DNA 的纯度、浓度存在差异, 试剂盒法提取的 DNA 质量最好, 纯度最高, 但提取的 DNA 量少且成本高, 改良 CTAB 法和高盐低 pH 法提取的 DNA 的纯度相近, 都有少量的蛋白质和糖类的污染, 改良 SDS 法提取的 DNA 纯度最低。

**关键词:**燕麦种子, 提取方法, PCR 扩增

**中图分类号:** S543<sup>+</sup>.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1002-2767(2015)10-0020-04 DOI: 10.11942/j.issn1002-2767.2015.10.0020

燕麦(*Avena sativa* L.)是禾本科燕麦属一年生草本植物, 是世界各地广泛栽培种植的一种重要粮食兼饲草、饲料作物, 燕麦一般分为带稃型(皮燕麦)和裸粒型(裸燕麦)<sup>[1]</sup>, 燕麦具有耐寒、耐旱、耐贫瘠等优良性状和很高的营养及保健价值, 中国种植燕麦历史悠久, 燕麦自古就有“食疗兼备”的功能<sup>[2]</sup>。目前对燕麦的研究报道有很多, 如燕麦物种资源的遗传多样性研究<sup>[3-5]</sup>, 燕麦的营养成分、保健功能的研究<sup>[6]</sup>, 燕麦种子萌发和生长发育的耐盐性研究<sup>[7]</sup>, 伏建国等<sup>[8]</sup>比较了 3 种方法提取法国野燕麦单粒种子 DNA, 本研究以西藏拉萨当雄县采集的野燕麦为材料, 用 5 种提取方法提取燕麦基因组 DNA, 旨在寻找最佳的提取方法, 为燕麦种间分子鉴定、遗传资源评价、分子标记辅助育种等研究领域提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

燕麦种子于 2007 年 9 月 10 日采于西藏拉萨当雄县, 于 4℃ 冰箱干燥保存。

主要试剂有: 无水乙醇、氯仿、异戊醇、异丙醇、CTAB、PVP、DTT、Tris、EDTA、SDS、λ-

marker、marker-D、核苷酸染料、loading buffer、Agarose M、*Taq* 酶、BPB、dNTP、MgCl<sub>2</sub>、10 × *Taq* 酶配套缓冲液(均购自生工生物工程(上海)有限公司); 主要仪器有: Eppendorf 5417R 型高速冷冻离心机、超低温冰箱、水浴锅-CD3192 型恒温控制器、研钵、1.5 mL 离心管、不同量程的移液器及相应的枪头(购自上海生物公司)、核算蛋白测定仪(Eppendorf BioPhotometer plus)、WD-9413B 凝胶成像分析仪(购自北京市六一仪器厂)、电泳槽(购自 BIO-RAD 公司)、PCR-T100(购自 BIO-RAD 公司)。

### 1.2 方法

**1.2.1 传统 CTAB 法** 选择饱满的燕麦种子, 去掉种子外壳, 将种子在研钵中捣碎, 转入 1.5 mL 的离心管中, 加入 600 μL 预热的提取液(0.015 mol·L<sup>-1</sup> EDTA (pH 8.0), 0.075 mol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl (pH 8.0), 1.5% CTAB, 1 mol·L<sup>-1</sup> NaCl), 混匀, 于 65℃ 水浴中保温 30 min, 每隔几分钟颠倒混匀, 使得粉末与提取缓冲液充分接触; 加入 500 μL 氯仿/异戊醇(24:1), 震荡混匀, 4℃ 12 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min, 取上清, 加入等体积的氯仿/异戊醇(24:1), 重复离心, 直至中间无白色物质。取上清, 加 2 倍体积的无水乙醇, 于 -20℃ 静置 30 min; 取出于室温 14 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 17 min, 倒掉上清, 用 70% 乙醇洗涤沉淀 2 次, 室温干燥后溶于 30 μL TE。 -20℃ 下保存备用<sup>[9]</sup>。

**1.2.2 改良 SDS 法** 选择饱满的燕麦种子, 去掉种子外壳, 将种子在研钵中捣碎, 加入 600 μL

收稿日期: 2015-07-19

基金项目: 湖南师范大学蛋白质与发育生物学教育部重点实验室(2014 年)开放课题资助项目(2015DF03); 西藏自治区科技厅自然科学基金资助项目(2015ZR-13-5)

第一作者简介: 郝豆豆(1992-), 女, 山西省吕梁市人, 在读硕士, 从事植物学研究。E-mail: 31724478@qq.com。

通讯作者: 拉多(1968-), 男, 藏族, 博士, 副教授, 硕士生导师, 从事藏药材基因与功能研究。E-mail: lhadoo@hotmail.com。

冰上预冷提取液( $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  Tris-HCl(pH 8.0),  $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  EDTA(pH 8.0), 2% DTT, 3% 可溶性 PVP), 充分混匀后于冰上放置 10 min, 然后  $6\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 10 min; 弃上清, 沉淀加入  $600 \mu\text{L}$   $65^\circ\text{C}$  预热的裂解缓冲液, 混匀后  $65^\circ\text{C}$  水浴 30 min, 不时轻轻颠倒; 取出后稍冷却后, 加入等体积的氯仿/异戊醇(24:1), 震荡至出现乳浊状, 于  $4^\circ\text{C}$ ,  $10\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 10 min, 重复 2 次; 取上清液, 加入  $1/4$  体积乙醇和  $1/3$  体积  $5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  NaAc(pH 4.8), 立即  $10\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 10 min; 取上清, 加入  $-20^\circ\text{C}$  预冷的异丙醇,  $-20^\circ\text{C}$  静置 30 min;  $14\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ ,  $4^\circ\text{C}$  离心 10 min; 弃上清, 并用 70% 乙醇洗涤沉淀 2 次, 风干后溶于  $50 \mu\text{L}$  TE。  $-20^\circ\text{C}$  下保存备用。

**1.2.3 高盐低 pH 法** 选择饱满的燕麦种子, 去掉种子外壳, 将种子在研钵中捣碎, 加入  $500 \mu\text{L}$   $65^\circ\text{C}$  预热提取液( $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  NaAc, 3% 可溶性 PVP, 2% DTT,  $0.025 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  EDTA(pH 8.0), 1.5% SDS), 混匀后  $65^\circ\text{C}$  水浴保温 30 min, 不时颠倒混匀; 稍冷却后于  $4^\circ\text{C}$ ,  $10\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 10 min, 取上清液加  $2/3$  倍体积的  $2.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  NaAc(pH 4.8) 的溶液, 冰浴 15 min;  $10\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ ,  $4^\circ\text{C}$  离心 10 min。取上清液加等体积的氯仿/异戊醇(24:1), 震荡混匀后  $10\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ ,  $4^\circ\text{C}$  离心 10 min; 取上清, 加等体积的异丙醇( $-20^\circ\text{C}$  预冷), 轻轻混匀,  $-20^\circ\text{C}$  静置 30 min;  $14\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ ,  $4^\circ\text{C}$  离心 20 min, 用 70% 乙醇洗涤沉淀 2 次, 风干后溶于  $30 \mu\text{L}$  TE。  $-20^\circ\text{C}$  下保存备用。

**1.2.4 Ezup 柱式试剂盒法** 基因组提取试剂盒购于生工生物工程(上海)有限公司。按照说明书进行操作。

**1.2.5 改良 CTAB** 选择饱满的燕麦种子, 去掉种子外壳, 将种子在研钵中捣碎, 加  $500 \mu\text{L}$   $65^\circ\text{C}$  预热的提取缓冲液( $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  Tris-HCl(pH 8.0),  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  EDTA(pH 8.0),  $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  NaCl, 2% CTAB, 3% PVP, 2% DTT),  $65^\circ\text{C}$  水浴 30 min, 不时颠倒混匀; 稍冷却后,  $4^\circ\text{C}$  离心,  $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ , 10 min; 取上清, 加入等体积的苯酚/氯仿(1:1), 混匀, 然后于  $4^\circ\text{C}$ ,  $10\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ , 离心 10 min; 取上清, 加等体积的氯仿/异戊醇(24:1), 震荡混匀,  $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ ,  $4^\circ\text{C}$ , 10 min; 取上清, 加等体积的异丙醇( $-20^\circ\text{C}$  预冷), 轻轻颠倒混匀,  $-20^\circ\text{C}$  静置 30 min;  $14\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ ,  $4^\circ\text{C}$ , 离心 22 min, 弃上清, 沉淀用 70% 乙醇洗两次, 风干后

溶于  $50 \mu\text{L}$  TE。  $-20^\circ\text{C}$  下保存备用<sup>[10]</sup>。

**1.2.6 紫外分光光度计法** 取  $2 \mu\text{L}$  DNA 提取液用 TE 稀释 50 倍, 以  $100 \mu\text{L}$  TE 作为空白对照, 利用核酸蛋白测定仪测得 DNA 样品的浓度, 以及在波长 260 和 280 nm 处的吸光值, 通过其比率可以判断 DNA 的纯度及提取效果。

**1.2.7 琼脂糖凝胶电泳** 配制 0.8% 的琼脂糖凝胶, 用  $\lambda\text{DNA}$  作为对照, 取  $4 \mu\text{L}$  DNA 原液与  $1 \mu\text{L}$  的核酸染料混合, 点入凝胶点样孔, 在 TAE 缓冲液中以 110 V 的电压电泳 50 min, 并用凝胶成像系统(北京六一仪器)进行拍照并保存。

**1.2.8 PCR 扩增** 以提取的 DNA 为模板, 核糖体基因为引物, 配制  $25 \mu\text{L}$  的反应体系( $\text{ddH}_2\text{O}$ :  $15.8 \mu\text{L}$ , Buffer:  $2 \mu\text{L}$ ,  $\text{MgCl}_2$ :  $2 \mu\text{L}$ , dNTP:  $2 \mu\text{L}$ , ITS2 F(5'-ATGCGATACTTGGTGTGAAT-3'):  $1 \mu\text{L}$ , ITS2 R(5'-GACGCTTCTCCAGACTACAAT-3'):  $1 \mu\text{L}$ , Taq 酶:  $0.2 \mu\text{L}$ , 模板 DNA:  $1 \mu\text{L}$ 。

PCR 反应程序:  $94^\circ\text{C}$  预变性 5 min;  $94^\circ\text{C}$  变性 0.5 min,  $56^\circ\text{C}$  退火 0.5 min,  $72^\circ\text{C}$  延伸 45 s, 共 40 个循环; 最后  $72^\circ\text{C}$  延伸 10 min。将 PCR 扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳(110 V、50 min), 在凝胶电泳成像仪上观察, 并保存图像。

## 2 结果与分析

### 2.1 5 种方法提取的燕麦基因组 DNA 的浓度和纯度比较

由表 1 得出传统 CTAB 法提取 DNA 的效果最差,  $A_{260}/A_{280} < 1.6$ , 说明有大量的蛋白质、多糖、多酚等物质的污染,  $A_{260}/A_{230}$  的值远远小于 2.0, 说明也有大量小分子物质的残留; 改良 SDS 法提取的 DNA 所含的蛋白质、多糖等杂质的量比传统 CTAB 法提取的 DNA 少很多, 但是  $A_{260}/A_{280}$  和  $A_{260}/A_{230}$  的值也是远低于标准值, 说明蛋白质、多糖、小分子物质污染比较严重; 改良 CTAB 法和高盐低 pH 法提取的 DNA 的  $A_{260}/A_{280}$  和  $A_{260}/A_{230}$  的平均值接近, 但还是略低于标准值, 说明也有少量的蛋白质、多糖、盐类等物质的污染; Ezup 柱式试剂盒法提取的 DNA 的  $A_{260}/A_{280}$  和  $A_{260}/A_{230}$  的值都几乎接近标准范围, 说明这种方法提取的燕麦基因组 DNA 的纯度高, 但是此方法提取的 DNA 的浓度比较低。

综合得出, 高盐低 pH 法提取 DNA 的浓度较高, 纯度也较高, 而且高盐低 pH 法步骤比改良 CTAB 法简单, 用到的有机试剂少, 所以高盐低 pH 法为最佳方法。

表 1 5 种方法提取的 DNA 浓度和纯度  
Table 1 Concentration and purity of DNA extracted by five methods

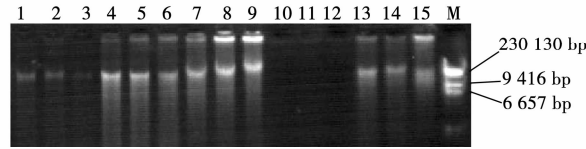
方法 Methods	编号 No.	浓度/ ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) Concentration	$A_{260}/A_{280}$	$A_{260}/A_{230}$
Ezup 柱式试	1	240	1.82	1.95
剂盒法	2	275	1.85	2.16
Ezup kit	3	255	1.90	2.28
method	平均值	257	1.86	2.13
改良 CTAB 法	4	675	1.78	1.85
Improved	5	560	1.70	1.86
CTAB	6	587	1.75	1.81
	平均值	607	1.74	1.84
改良 SDS 法	7	768	1.63	1.71
Improved	8	698	1.70	1.69
SDS	9	745	1.65	1.65
	平均值	737	1.66	1.68
传统 CTAB 法	10	50	1.07	0.39
Traditional	11	40	0.98	0.47
CTAB	12	65	1.43	0.55
	平均值	52	1.16	0.47
高盐低 pH 法	13	673	1.72	1.90
High salt	14	688	1.72	1.84
and low pH	15	740	1.78	1.82
	平均值	700	1.74	1.85

2.2 5 种方法提取的燕麦基因组 DNA 的电泳结果及 PCR 扩增结果

由图 1 可知,传统 CTAB 法提取的 DNA 在 20 000 bp 左右未得到条带,即这种方法未能成功提取到燕麦基因组 DNA;另外 4 种方法都可以得到完整的条带,但改良 CTAB 法、改良 SDS 法、高盐低 pH 法提取的 DNA 的点样孔中都有残留物质,其中改良 SDS 法中的最亮最多,说明 DNA 中有多糖、盐类物质残留,Ezup 柱式试剂盒提取的 DNA 条带颜色最浅,说明 DNA 的浓度很小,其余 3 种方法提取的 DNA 的条带都较亮,但是都略有降解。

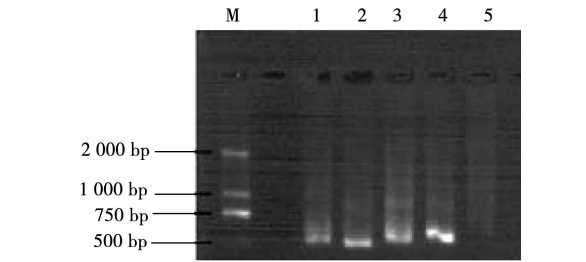
以 5 种方法提取的燕麦种子 DNA 为模板,核糖体基因为引物,进行 PCR 扩增后产物的琼脂糖凝胶电泳见图 2。从中可以看到除了传统 CTAB 法提取的 DNA 无 PCR 扩增产物外,其余

4 种方法提取的 DNA 的 PCR 扩增产物条带都比较清晰,改良 SDS 法提取的 DNA 的 PCR 扩增产物电泳条带发生弯曲,可能是点样孔不整齐造成的。



M:  $\lambda$  DNA; 1~3: Ezup柱式试剂盒法; 4~6: 改良CTAB法; 7~9: 改良SDS法; 10~12: 传统CTAB法; 13~15: 高盐低pH法  
M:  $\lambda$  DNA;1~3:Ezup kit method;4~6:improved CTAB method;7~9:improved SDS method;10~12:traditional CTAB method;13~15:high salt and low pH

图 1 五种方法提取的燕麦基因组 DNA 电泳图谱  
Fig. 1 Electrophoretogram of genomic DNA extracted by five methods from *Avena sativa* L



M: Marker-D; 1: 改良CTAB法; 2: Ezup柱式试剂盒法; 3: 高盐低pH法; 4: 改良SDS法; 5: 传统CTAB法  
M:Marker-D;1:improved CTABmethod;2:Ezup kit method;3:high salt and low pH method;4:improved SDS method;5:traditional CTAB method

图 2 5 种方法提取的燕麦基因组 DNA 的 PCR 扩增电泳图谱  
Fig. 2 PCR amplification electrophoretogram of genomic DNA extracted by five methods from *Avena sativa* L

3 结论与讨论

影响 DNA 提取质量的因素有很多,主要为蛋白质、多酚、多糖、脂质、RNA 等,因此提取纯化植物基因组 DNA 的关键就是去除这些物质<sup>[11]</sup>。本研究以燕麦种子为材料提取基因组 DNA,可以省去种子萌发到幼苗培养等一系列过程,缩短 DNA 提取周期<sup>[12]</sup>,但是燕麦种子富含蛋白质、脂质等 DNA 提取过程中较难除去的物质,DNA 提取要比用叶片为材料困难。模板 DNA 的质量决定了 PCR 反应的成功与否,高质量的模板 DNA 才能满足后续的分子生物实验,所以根据提取的材料来选取合适的提取方法,才能提取到高质量的 DNA。

用紫外分光光度计检测提取的基因组 DNA

纯度的标准是:由  $A_{260}/A_{280}$  和  $A_{260}/A_{230}$  的比值来判断,当  $A_{260}/A_{280}$  接近 1.8 时,DNA 的纯度最高,当  $A_{260}/A_{280} < 1.8$  时,说明有蛋白质等杂质,当  $A_{260}/A_{280}$  接近于 2.0 时,说明 RNA 含量较高,DNA 降解多<sup>[13]</sup>;  $A_{260}/A_{230}$  的值大于 2.0 时,说明样品中基本没有残存盐类物质<sup>[14]</sup>。本研究用 5 种方法提取燕麦种子 DNA,通过紫外分光光度计法检测 DNA 的浓度和纯度,用琼脂糖凝胶电泳和 PCR 扩增检测 DNA 的完整性,结果表明,Ezup 柱式试剂盒提取的 DNA 纯度最高,但浓度较低,并且试剂盒价格昂贵,在实际需要大量提取燕麦种子 DNA 的工作中所需成本太高;改良 SDS 法提取的 DNA 纯度低,杂质较多,而且实验步骤繁多、耗时、耗材;高盐低 pH 法和改良 CTAB 法提取的 DNA 的浓度和纯度都很高,但高盐低 pH 法比改良 CTAB 法操作步骤简单,用到的有机试剂比改良 CTAB 法少,能降低成本,同时减少有毒有机试剂(如酚)对实验人员健康和周围环境的损害。所以,高盐低 pH 法为提取燕麦种子 DNA 的最佳方法。

#### 参考文献:

- [1] 郭本兆. 中国植物志(第九卷第三分册)[M]. 北京:科学出版社,1987.
- [2] 杨海鹏,孙泽民. 中国燕麦[M]. 北京:农业出版社,1989.

- [3] 齐冰洁,刘景辉,张智勇,等. 燕麦种质资源生物学性状的遗传多样性[J]. 麦类作物学报,2008,28(4):594-599.
- [4] 刘欢,慕平,赵桂琴. 燕麦种质资源遗传多样性 ISSR 研究[J]. 草业学报,2012,21(4):116-124.
- [5] 张向前,刘景辉,齐冰洁,等. 燕麦种质资源主要农艺性状的遗传多样性分析[J]. 植物遗传资源学报,2010,11(2):168-174.
- [6] 章海燕,张晖,王立,等. 燕麦研究进展[J]. 粮食与油脂,2009(8):7-9.
- [7] 吴俊英,刘景辉,翟利剑,等. 不同品种燕麦种子萌发和幼苗生长的耐盐性[J]. 生态学杂志,2009,28(10):1960-1965.
- [8] 伏建国,杨静,安榆林. 法国野燕麦单粒种子 DNA 快速提取方法的比较[J]. 植物检疫,2008(3):153-155.
- [9] 汤洁,刘连生,许娜娜,等. 绞股蓝叶片 DNA 提取方法的比较研究[J]. 安徽农业大学学报,2008,35(3):445-448.
- [10] 张勇群,石梦菲,德吉,等. 菊叶香黎(*Chenopodium foetidum*)基因组 DNA 的提取方法研究[J]. 西藏大学学报,2014,29(1):13-15,70.
- [11] 白雪嵩,赵昶灵,陈中坚,等. 5 种提取三七基因组 DNA 方法的比较[J]. 江苏农业科学,2014,42(5):54-56.
- [12] 李静,曾德贤,吴子欢,等. 麻疯树(*Jatropha curcas* L.)种子总 DNA 提取方法的建立和优化[J]. 西南农业学报,2011,24(2):728-731.
- [13] 张丽,黄学琴,吴全忠. 黑核桃叶片基因组 DNA 提取方法比较研究[J]. 中国农学通报,2011,27(28):125-129.
- [14] 候泽菁,常迺涵. 用改良 SDS 法提取适于 PCR 扩增的小麦基因组 DNA[J]. 江苏农业科学,2014,42(5):49-51.

## Comparison of Different Extraction Methods of Genomic DNA from *Avena sativa* L

HAO Dou-dou<sup>1</sup>, ZHU Yong<sup>1</sup>, LEI Ming<sup>1</sup>, WU Jun-xi<sup>2</sup>, LA Duo<sup>1</sup>, ZANG Yong-qun<sup>1,3</sup>

(1. Tibet University, Lhasa, Tibet 850000; 2. Institute of Geographical Sciences, Lhasa, Tibet 850000; 3. Tibetan Hospital in Chengdu Office, Chengdu, Sichuan 610000)

**Abstract:** In order to overlap seeding culture and decrease the experimental time, taking *Avena sativa* L seeds as material, the genomic DNA of *Avena sativa* L were extracted by five kinds of methods. The concentration and purity of DNA were detected by ultraviolet spectrophotometry. And integrity was detected by agarose gel electrophoresis. Based on ITS2 for primers, the DNA was detected through PCR amplification. The results showed that except for traditional CTAB, the other four methods could extract the genomic DNA from *Avena sativa* L seeds, there were obvious difference in extracted purity of genomic DNA with different methods, DNA was extracted with the kit method which had the highest quality and purity, but it was expensive and had less DNA extracted. The difference of DNA purity between improved CTAB method and high salt and low pH method was not very obvious, there was a small number of protein and carbohydrate in DNA. The purity of DNA was the lowest with improved SDS method.

**Keywords:** *Avena sativa* L seed; extraction method; PCR amplification