

一种提取橡胶树叶中总 DNA 的方法

安泽伟 黄华孙*

中国热带农业科学院橡胶研究所, 国家橡胶树育种中心, 农业部热带作物生理学重点实验室, 海南儋州 571737

A Method for Genomic DNA Extraction from Leaves of Rubber Tree (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.)

AN Ze-Wei, HUANG Hua-Sun*

State Center for Rubber Breeding, Key Laboratory of Tropical Crops Physiology of Ministry of Agriculture, Rubber Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Danzhou, Hainan 571737, China

提要 橡胶树叶中富含多糖和多酚类物质, 严重影响高质量基因组DNA的提取, 文章针对这一特点提出了改良的CTAB法。这一方法可用于DNA的大量或小量提取, 小量提取的产量为 $50 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}(\text{FW})$, 大量提取可达到 $400 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}(\text{FW})$; 可从橡胶树古铜期、变色期、稳定期等3个生长时期的叶中提取出高质量DNA, 所得DNA可用于PCR分析和酶切分析等分子生物学研究。

关键词 基因组DNA; CTAB; 橡胶树

橡胶树(*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.)原产于亚马逊河流域, 是目前唯一有商业利用价值的天然橡胶来源。橡胶树体内不仅富含胶乳, 而且大量的多酚及多糖类次生物质。在提取DNA时, 多糖很难与DNA分离^[1], 而酚类物质在研磨时易氧化, 并与蛋白质和核酸发生不可逆的结合, 形成胶状物^[2], 这种含有DNA的胶状物对其进行PCR或酶切分析不利。虽然提取橡胶树中DNA有多种方法^[3~7], 但这些方法均需用氯化铯超速离心, 而且产物经常呈褐色的胶状物。要提取高质量的DNA, 就得克服多酚及多糖类物质的干扰。根据Vrohbi等^[8]和Chaudhry等^[9]的方法, 本文探索出一种适合于提取橡胶树中高质量DNA的方法。此法费用低, 效率高。

材料与方 法

1 植物材料

分别取1 g橡胶树(*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.)古铜期、变色期和稳定期3个不同生长时期的幼叶, 置于15 mL离心管中提取。如要小量提取时则可用0.2 g幼叶于1.5 mL离心管中进行。

2 溶液

提取液配制根据Chaudhry等^[9]的方法进行改良, 包括 $0.45 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 葡萄糖、 $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl (pH 8.0)、 $5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ EDTA (pH 8.0)、2%

(W/V) 聚乙烯吡咯烷酮(PVP)-36、2%(V/V) 巯基乙醇。裂解液的配制根据Vrohbi等^[8]的方法改良而来, 包括2%(W/V) CTAB、2%(W/V) PVP-36、 $1.4 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl、 $20 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ EDTA (pH 8.0)、 $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl (pH 8.0)、2%(V/V) 巯基乙醇。TE缓冲液为: $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl、 $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ EDTA (pH 8.0)。酚: 氯仿: 异戊醇为25:24:1, 氯仿: 异戊醇为24:1, 乙醇为70%、100%, 醋酸钠(pH 5.2)为 $3 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 异丙醇为100%。

3 操作流程

(1)取1 g叶片, 放在液氮中快速研成粉末后转入15 mL的离心管中。(2)在盛有样品的离心管中加入5 mL冰冷的提取缓冲液, 混匀, 冰上放置20 min。样品与缓冲液的比例以1:5~1:7为宜, 缓冲液太少, DNA产量会下降。(3)以 $4\ 020\times g$, 于4℃下离心20 min。(4)弃去上清液, 沉淀中加入65℃预热的5 mL裂解液, 混匀后于65℃水浴中保温40 min。弃去的上清液中含有大量来自细胞质的多糖、多酚及色素类物质, 低速离心可将这些杂质与未释放出的DNA分离。沉淀中加

收稿 2004-12-07 修定 2005-03-20

资助 科技基础性工作研究专项(2003DEB6J075、2003DIB7J066)。

*通讯作者(E-mail: huanghs@scuta.edu.cn, Tel: 0898-23300573)。

入预热的裂解液使核内的DNA释放出来,同时可钝化内源核酸酶的活性,以使释放出的DNA受到保护。(5)加等体积酚:氯仿:异戊醇(25:24:1),翻转混匀约80次,直至有机相溶液浑浊为止。这样,可有效去除蛋白质。(6)以 $11\ 180\times g$,于室温下离心20 min。CTAB溶液在低于 15°C 时会产生沉淀,所以不能在低温下离心。(7)上清液转至另一新管中,加入0.6体积的冰冷的异丙醇,翻转混匀40次后于室温下静置10 min。(8)以 $11\ 180\times g$,于室温下离心10 min,以70%乙醇洗沉淀2次,以除去沉淀中的小分子物质。(9)沉淀风干后,加入500 μL TE,溶于Eppendorf管中。(10)加入2 μL RNase A,于 37°C 下保温30 min。(11)加等体积氯仿:异戊醇(24:1),翻转混匀约80次,于 4°C 以 $11\ 180\times g$ 离心10 min。(12)转移上清液,加入0.1体积的3 mol·L⁻¹醋酸钠,混匀后加入2倍体积的无水乙醇,翻转混匀40次,于 -20°C 中静置30 min,以使DNA得到充分沉淀。(13)以 $11\ 180\times g$ 于 4°C 下离心5 min,用70%乙醇洗沉淀2次,以除去沉淀中的小分子物质。(14)风干后,将沉淀溶于100 μL TE中,于 -20°C 下保存。

4 DNA 质量检测

用紫外分光光度计和琼脂糖凝胶电泳检测DNA质量。

5 限制性酶切和简单序列重复间区(inter-simple sequence repeats, ISSR)分析

酶切反应参照 Ausubel 等^[10]的方法。ISSR-PCR反应在Biometra T1 PCR仪上进行。引物为836(GAGAGAGAGAGAGAGYA)。反应体积为10 μL ,其中包括1 μL 10 \times 缓冲液、2 mmol·L⁻¹ MgCl₂、0.1 mmol·L⁻¹ dNTPs、0.4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 引物、0.5 U Taq酶、DNA 30 ng、ddH₂O 6.64 μL 。反应程序为: 94°C 预变性4 min; 94°C 变性30 s, 50°C 退火30 s, 72°C 延伸70 s,共循环45次; 72°C 下延伸7 min。将扩增产物在2%琼脂糖凝胶(含0.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的溴化乙锭),80 V稳压条件下进行电泳,紫外灯下观察结果并照相。

结果与讨论

针对橡胶树富含次生物质这一特点,我们对

提取方法的改进主要是从抑制次生物质影响DNA提取进行的。以往提取橡胶树总DNA的方法^[3~7]是用裂解液直接处理样品,或是用氯化铯来进行超速离心,改良的CTAB法与这些方法的不同之处在于:(1)在细胞核裂解前用提取缓冲液对样品进行预处理,使细胞质中的大部分多糖和多酚类物质溶解在提取缓冲液中,通过低速离心使之与含有总DNA的样品分离;(2)提取缓冲液中用葡萄糖作稳定剂,以保持渗透性^[11];(3)用高浓度PVP-36结合多酚类物质;(4)用高浓度巯基乙醇作抗氧化剂;(5)裂解液中提供高浓度的氯化钠环境,使CTAB与DNA的复合物能充分溶解。

我们用这一方法已提取了近500个橡胶树样品的DNA,均获得满意的结果, OD_{260}/OD_{280} 在 $1.8\sim 2.0$, OD_{260}/OD_{230} 在 $2.0\sim 2.7$,大量提取DNA的产量最高可达400 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (FW),小量提取的DNA产量在50 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (FW)左右。橡胶树不同生长时期的DNA产量差异较大:稳定期的产量最低,为50 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (FW);变色期的最高,为400 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (FW);古铜期的居中。DNA得率随生长时期不同而有所差异,这可能与不同时期的橡胶树叶片的解剖结构和化学成分有关。稳定期的叶片已完全成熟,角质层较厚,叶脉明显,纤维增多增粗,很难研磨,多糖和多酚类物质也较多;古铜期的叶片尚未成熟,易于研磨,但叶片水分含量较大;变色期的叶片虽接近成熟,但其叶片质地柔软,易于研磨,多糖和多酚类物质并没有明显增多。本统计结果来自大量提取和小量提取,400和50 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (FW)分别是大量提取和小量提取的统计数据。由于样品在直径为6 cm的陶瓷研钵中研磨,样品容易粘在研钵壁上,很难转移干净,使有效样品的量降低,而小量提取中样品量远小于大量提取,同样的样品损失量对小量提取的影响就要大过大量提取,故此统计结果会相差8倍。

为了保证每次实验都有高质、高产的DNA,操作中应注意以下问题:(1)研磨要充分,尽可能选取变色期的材料;(2)研磨后的样品转移要快且干净,以减少样品人为损失及避免DNA降解;(3)样品与缓冲液的比例以1:5~1:7为好,缓冲液太少DNA产量会下降,太多则不易操作,造成试剂浪费;(4) 65°C 水浴中保温时以40 min为

宜, 其间要翻转混匀8~10次; (5) 抽提时要尽可能多地转移上清液, 但要避免吸取中间相; (6) 加入裂解液后的所有操作都要温和, 以防止DNA降解。

采用本方法从不同生长时期橡胶树叶中提取的DNA均为白色沉淀。图1-a为从橡胶树品种RRIM600不同生长时期叶片中所提的总DNA, 3个泳道DNA均无降解, 质量较高(表1)。以此DNA为模本进行的酶切和ISSR反应表明, 所提的DNA很容易酶解, 且能产生清晰的PCR扩增带(图1-b、c)。实验证明, 采用这一方法提取橡胶树DNA是切实可行的, 所得DNA没有蛋白质、酚类及小分子的污染, 适合于分子生物学研究。

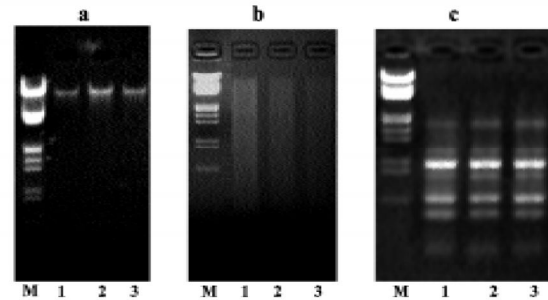


图1 RRIM 600的总DNA分析

a: 从不同时期RRIM 600叶片提取的总DNA; b: TaqI消化后的RRIM 600总DNA; c: ISSR引物836的扩增图谱。M: DNA分子量标准(Lambda DNA/*HindIII*+*EcoRI*); 1: 古铜期叶片; 2: 变色期叶片; 3: 稳定期叶片。

表1 RRIM 600总DNA的质量分析

取样时期	OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀	OD ₂₆₀ /OD ₂₃₀	产量/ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (FW)	沉淀颜色
古铜期	2.0	2.0	217	白色
变色期	1.9	2.1	390	白色
稳定期	2.0	2.6	196	白色

参考文献

- Murray MG, Thompson WF. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res*, 1980, 8: 4321~4325
- Porebski SL, Baily G, Baum RB. Modification of CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. *Plant Mol Biol Rep*, 1997, 12: 8~15
- Bease P, Lebrun P, Seguin M et al. DNA fingerprint in *Hevea brasiliensis* (rubber tree) using human minisatellite probes. *Heredity*, 1993, 70: 237~244
- Bease P, Seguin M, Lebrun P et al. Genetic diversity among wild and cultivated population of *Hevea brasiliensis* assessed by nuclear RFLP analysis. *Theor Appl Genet*, 1994, 88: 199~207
- Lespinasse D, Rodier-Goud M, Grivet L et al. A saturated genetic linkage map of rubber tree (*Hevea* spp.) based on RFLP, AFLP, microsatellite and isozyme markers. *Theor Appl Genet*, 2000, 100: 127~138
- Lekawipat N, Teerawatanasuk K, Rodier-Goud M et al. Genetic diversity analysis of wild germplasm and cultivated clones of *Hevea brasiliensis* Muell. Arg. by using microsatellite markers. *J Rubb Res*, 2003, 6(1): 36~47
- Low FC, Gale MD. Development of molecular markers for *Hevea*. *J Nat Rubb Res*, 1991, 6(3): 152~157
- Vrohbi I, Harvengt L, Chandelier A et al. Improved RAPD amplification of recalcitrant plant DNA by the use of activated charcoal during DNA extraction. *Plant Breed*, 1996, 115: 205~206
- Chaudhry B, Yasmeen A, Husnain T et al. Mini-scale genomic DNA extraction from cotton. *Plant Mol Biol Rep*, 1999, 17: 1~7
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE et al (eds). *Short Protocols in Molecular Biology*. New York: John Wiley and Sons Inc, 1995. 73~76
- Katterman FR, Shattuck VI. An effective method of DNA isolation from the mature leaves of *Gossypium* species that contain large amounts of phenolic terpenoids and tannins. *Prep Biochem*, 1983, 13(4): 347~359