

大量提取羊草基因组方法的优化

石雅丽, 张丽萍, 赵一方, 李榕珊, 兰辉, 孙亚超, 庞中缘, 陈薇薇, 张朋, 任红洋

(内蒙古工业大学化工学院食品与生物工程系, 内蒙古呼和浩特 010051)

摘要 羊草是我国北方草原上广泛分布的一种禾本科牧草, 其对畜牧业及生态环境有着至关重要的作用, 其中, 获得大量完整的羊草基因组是进行羊草分子生物学研究的基础。首先对常用的提取植物基因组 DNA 方法及其原理进行归纳分析, 然后利用常用的吸附柱法、改良 SDS 法和改良 CTAB 法, 分别对羊草基因组进行大量提取。结果发现, 改良的 CTAB 法在大量提取时需要用 50 mL 离心管, 离心转速选取 5 000 r/min 时基因组断裂较少, 同时最终用毛细管将基因组 DNA 挑出来, 既提高了 DNA 的产率又保证了 DNA 的完整性, 同时提高了纯度。

关键词 羊草; 基因组 DNA; CTAB 法; SDS 法

中图分类号 S188 **文献标识码** A

文章编号 0517-6611(2020)06-0080-03

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2020.06.023



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

An Improved Approach for Extracting Genomic DNA from *Leymus chinensis*

SHI Ya-li, ZHANG Li-ping, ZHAO Yi-fang et al (Department of Food and Biological Engineering, School of Chemical Engineering, Inner Mongolia University of Technology, Hohhot, Inner Mongolia 010051)

Abstract *Leymus chinensis* is a grass species that is widely distributed on grasslands in northern China. It plays a vital role in animal husbandry and the ecological environment. Obtaining a large number of complete genomes is the basis for molecular biology research of *L. chinensis*. Firstly, the commonly used methods for extracting plant genomic DNA were summarized and analyzed. Then, the common adsorption column method, improved SDS method and CTAB method in this laboratory were used to extract a large number of *L. chinensis* genomes. The results showed that the improved CTAB method required a 50 mL centrifuge tube for large-scale extraction. The genomic DNA was less broken when the centrifugation speed was selected at 5 000 r/min. At the same time, the genomic DNA was finally picked out with a capillary, which not only improved the DNA yield, but also ensured the integrity of the DNA, and improved the purity.

Key words *Leymus chinensis*; Genomic DNA; CTAB method; SDS method

羊草 [*Leymus chinensis* (Trin.) Tzvel.] 是我国北方草原上广泛分布的一种禾本科牧草, 其耐干旱、耐盐碱且适口性较好, 在畜牧业及生态环境方面都有着重要的经济价值。科学家们已经对羊草开展了基因组测序、亲缘关系分析和抗旱耐盐碱分子机理的研究。其中, 基因组 DNA 的纯度、完整性与产量都直接关系着下游试验结果, 获得大量高质量的羊草基因组 DNA 是进行上述分子生物学研究的重要基础。

植物材料具有坚韧的细胞壁, 且有些植物材料富含多糖类和多酚类等次级衍生物, 这些都会影响基因组 DNA 的质量与产量^[1]。对于不同植物以及同种植物的不同组织, 提取基因组 DNA 的最适方法也不同^[2]。目前, 常用的大量提取植物基因组的方法有 SDS(十二烷基硫酸钠)法^[3-10]、CTAB(十六烷基三甲基溴化铵)法^[11-13]、吸附柱法^[14]、尿素法^[15]以及高盐低 pH 法^[16-18]。

笔者选取去除蛋白和多糖多酚效果较好的 3 种方法对提取羊草基因组 DNA 进行比较, 包括吸附柱法、改良 SDS 法和改良 CTAB 法, 目的是摸索出一种成本低、操作简单、DNA 产量高以及纯度与完整性都较好的提取羊草基因组的方法, 以满足对羊草进行全基因组测序、开发分子标记和亲缘关系鉴定等下游试验的需求。

1 材料与方法

1.1 材料 羊草。

1.2 方法

1.2.1 吸附柱法。取 0.1 g 羊草, 提取步骤参照植物基因组提取试剂盒(高效植物基因组 DNA 提取试剂盒, DP350, 天根生化科技有限公司)说明书。因为商品化试剂盒提取的基因组 DNA 纯度较好, 因此以吸附柱式的商品化试剂盒提取的羊草基因组 DNA 为对照, 分析其他方法的提取效果。

1.2.2 改良 SDS 法。分别取 2 g 羊草置于液氮中研磨, 将羊草叶粉末分别转移到 3 个 60 °C 预热的 15 mL 提取液(50 mmol/L pH 8.0 Tris-HCl, 500 mmol/L NaCl, 50 mmol/L EDTA, 临用前加 2%β-巯基乙醇)中, 此处用 50 mL 离心管, 65 °C 水浴锅中温浴 60 min, 温浴完毕后在离心管中加 7.5 mL 苯酚颠倒混匀, 再加 7.5 mL 氯仿颠倒混匀, 4 °C 10 000 r/min (对 3 批样品此处分别用 3 个转速 10 000、8 000 和 5 000 r/min)离心 30 min, 吸取上清至新的离心管中。在上清液中加入 10 μL RNase A (10 mg/mL), 常温放置 10 min; 用等体积氯仿再抽提 1 次, 吸取上清; 加 2 倍冰预冷的无水乙醇, 缓慢颠倒离心管, 室温静置 10 min, 用毛细管将基因组 DNA 挑出来; 用 70% 的乙醇洗涤 2~3 次; 干燥, 用 500 μL ddH₂O 溶解 DNA。

1.2.3 改良 CTAB 法。步骤同改良 SDS 法, 只是提取液不同, CTAB 提取液为 100 mmol/L pH8.0 Tris-HCl, 1.4 mmol/L NaCl, 20 mmol/L EDTA, 2% CTAB, 1% PVP (MW40 000, W/V, 聚乙烯醇吡咯烷酮), 临用前加 2%β-巯基乙醇。

1.2.4 电泳。分别取 1 μL 基因组 DNA 样品上样, 加入 6×上

基金项目 内蒙古工业大学科学研究项目(ZD201703); 内蒙古自治区创新创业训练计划项目(201910128009); 内蒙古工业大学校级大学生创新实验计划项目(2017059, 2019053010, 2019053008); 内蒙古工业大学大学生科技创新基金项目。

作者简介 石雅丽(1981—), 女, 内蒙古呼和浩特人, 硕士生导师, 博士, 从事生物质资源转化, 基因工程研究。

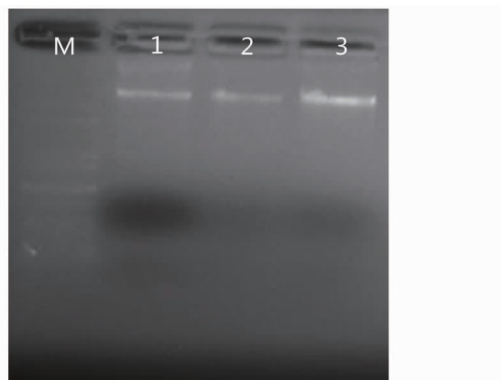
收稿日期 2019-08-21; **修回日期** 2019-10-09

样缓冲液,经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳,电压 100 V,电泳 15 min,溴化乙锭染色,以 D2000 DNA Marker (MD114) (TIANGEN) 为参照,于紫外凝胶成像系统 (BioRad, Gel Doc XR+) 下观察并照相。

1.2.5 紫外分光光度计检测。取 1 μ L DNA 样品,用 Nano-drop 分光光度计 (ND-1000, Thermo Fisher Scientific, USA) 检测 DNA 的浓度和纯度 (OD_{260}/OD_{280})。

2 结果与分析

2.1 利用天根植物基因组提取试剂盒提取羊草基因组 DNA 由图 1 可知,试剂盒提取的 3 个羊草基因组 DNA 平行样的提取结果相对一致,电泳条带比较平整,没有拖尾,说明 DNA 完整性较好,蛋白质和 RNA 残留较少,但 DNA 的量较少。



注: M 为 DNA Marker; 1, 2, 3 为羊草基因组 DNA

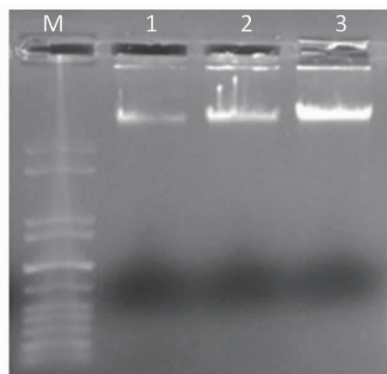
Note: M. DNA Marker; 1, 2, 3 were *L. chinensis* genomic DNA

图 1 利用天根植物基因组提取试剂盒提取羊草基因组 DNA 电泳结果

Fig.1 Electrophoresis result of *L. chinensis* genomic DNA obtained by TIANGEN plant genomic DNA extraction kit

2.2 利用改良 SDS 法提取羊草基因组 DNA 从图 2 可以看出,改良 SDS 法提取的 3 个羊草基因组 DNA 样品分别是离心转速为 10 000、8 000 和 5 000 r/min 的提取结果,10 000、8 000 r/min 提取 DNA 的电泳条带拖尾严重,说明 DNA 断裂严重,5 000 r/min 提取 DNA 的电泳条带有一些拖尾,这是 DNA 浓度较高导致的。完整性稍好;3 个样品的电泳孔中较亮,说明蛋白质残留较多, RNA 残留较少,说明该方法去除蛋白质杂质等效果不好;但相对于试剂盒提取效果,改良 SDS 法提取的 DNA 量较多。

2.3 利用改良 CTAB 法提取羊草基因组 DNA 从图 3 可以看出,改良 CTAB 法提取的 3 个羊草基因组 DNA 样品分别是离心转速为 10 000、8 000 和 5 000 r/min 的提取结果,其中 5 000 r/min 的 DNA 样品出现弯曲的现象,这是由于 DNA 浓度较高导致的,其完整性较好,10 000、8 000 r/min 的 DNA 完整性较差,基因组断裂,说明在大量提取基因组 DNA 时较高转速会导致基因组断裂,应采取低转速;同时,3 个样品的点样孔较干净,没有蛋白残留,而且无 RNA 残留,说明该方法去除蛋白质杂质等效果好。与试剂盒和改良 SDS 法提取效果相比,改良 CTAB 法提取的 DNA 的量非常多。

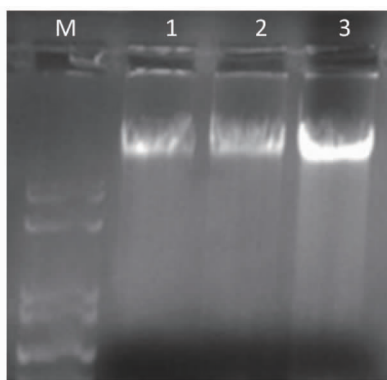


注: M 为 DNA Marker; 1~3 分别是离心转速为 10 000、8 000、5 000 r/min 时的提取样品

Note: M. DNA Marker; 1-3 were extracted samples with centrifugal rotation speeds of 10 000, 8 000, 5 000 r/min, respectively

图 2 利用改良 SDS 法提取羊草基因组 DNA 电泳结果

Fig.2 Electrophoresis result of *L. chinensis* genomic DNA obtained by improved SDS method



注: M 为 DNA Marker; 1~3 分别是离心转速为 10 000、8 000、5 000 r/min 时的提取样品

Note: M. DNA Marker; 1-3 were extracted samples with centrifugal rotation speeds of 10 000, 8 000, 5 000 r/min, respectively

图 3 利用改良 CTAB 法提取羊草基因组 DNA 电泳结果

Fig.3 Electrophoresis result of *L. chinensis* genomic DNA obtained by improved CTAB method

2.4 DNA 浓度及纯度测定——紫外分光光度法 根据紫外分光光度法结果 (表 1) 分析利用这 3 种提取羊草基因组 DNA 的方法,3 个重复样本提取效果较为均一,吸附柱法提取 DNA 的 OD_{260}/OD_{280} 为 1.80~1.93,纯度较好但浓度较低,浓度平均值为 163 ng/mL;改良 SDS 法提取 DNA 的 OD_{260}/OD_{280} 为 1.53~1.79,纯度较差,说明蛋白残留较多,但浓度较高,浓度平均值为 1 750 ng/mL;经过改良 CTAB 法提取的羊草基因组 DNA 纯度和浓度均较好, OD_{260}/OD_{280} 为 1.89~1.94,尤其是浓度非常高,浓度平均值达 3 363 ng/mL。

3 结论与讨论

此次试验所用的 3 种方法中,吸附法操作简单,同时吸附柱吸附 DNA 后不易降解,蛋白质杂质去除效果好,但由于每次上样量不能超过 0.1 g,因此提取量相对较少。与试剂盒相比,利用改良的 SDS 法和 CTAB 法对 2 g 羊草进行大量提取时虽然步骤多,但优点在于完整性较好。提取量明显提

高。同时,离心 10 000、8 000 r/min 时 DNA 断裂严重,离心 5 000 r/min 时基因组断裂较少,所以在提取羊草基因组时转速不能过高,避免基因组断裂;改良 SDS 法中提取液需要现用现配,而且大量提取时蛋白残留较严重。改良的 CTAB 法提取液中加入 PVP 和 β -巯基乙醇,抑制了褐化,而且在大量提取时需要用 50 mL 离心管,离心转速选取 5 000 r/min 时基因组断裂较少,同时最终用毛细管将基因组 DNA 挑出来,既提高了 DNA 的产率又保证了 DNA 的完整性,同时提高了纯度,所以利用该方法提取的 DNA 纯度、产率和完整性都较好。综合考虑,大量提取羊草基因组时利用该试验中的改良 CTAB 法最有效。

表 1 3 种方法提取羊草基因组 DNA 浓度及纯度比较

Table 1 Concentration and purity of *L. chinensis* genomic DNA by different extraction methods

提取方法 Method of extraction	浓度 Concentration ng/mL	OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀
吸附柱法 Adsorption column method	163	1.85
改良 SDS 法 Improved SDS method	1 750	1.66
改良 CTAB 法 Improved CTAB method	3 363	1.91

在此对提取植物 DNA 提供几点建议:①材料研磨后要尽快放到提取液中,否则 DNA 易降解;②加入提取液后 60 °C 温浴时间不要超过 60 min,否则容易褐化;③整个操作过程动作要轻柔,否则基因组易断裂;④在使用酚去除蛋白时,应使用 TRIS 饱和酚,因为使用水饱和酚时 DNA 可溶于有机相,不易分离出 DNA;⑤离心后取各上层液体时,不应吸取过多,以减少杂质;⑥低温的无水乙醇在沉淀 DNA 时效果更好;⑦因为乙醇可抑制酶活性,所以 DNA 干燥时必须将乙醇晾干,否则会影响后续试验结果;⑧苯酚有强腐蚀性;乙醇和

氯仿易着火、易爆炸、易挥发,能刺激神经系统,试验过程中应穿实验服。

参考文献

- [1] AMANI J, KAZEMI R, ABBASI A R, et al. A simple and rapid leaf genomic DNA extraction method for polymerase chain reaction analysis [J]. Iranian journal of biotechnology, 2011, 9(1): 69-71.
- [2] VARMA A, PADH H, SHRIVASTAVA N. Plant genomic DNA isolation: An art or a science [J]. Biotechnology journal, 2007, 2(3): 386-392.
- [3] DELLAPORTA S L, WOOD J, HICKS J B. A plant DNA miniprep: Version II [J]. Plant molecular biology reporter, 1983, 1: 19-21.
- [4] 张英, 柏干荣, 黄明辉, 等. 植物基因组 DNA 提取方法学评析与验证 [J]. 药品评价, 2004, 1(4): 292-297.
- [5] SCOTT O R, BENDICH A J. Extraction of DNA from plant tissue [J]. Plant Mol Biol Manual, 1988, A6: 1-10.
- [6] 王珍, 方宣钧. 植物 DNA 分离 [J]. 分子植物育种, 2003, 1(2): 281-288.
- [7] 赵怀宝, 冯建荣, 蒋迪军, 等. 葡萄 DNA 提取与纯化方法的比较研究 [J]. 石河子大学学报(自然科学版), 2000, 4(2): 117-121.
- [8] 杨清辉, SMITH R L, 谢云莲. RAPD 分子标记在鉴定狼尾草属杂交后代上的应用 [J]. 西南农业学报, 2001, 14(1): 4-7.
- [9] 袁长春, 施苏华, 叶创兴. 从富含酚类的茶类植物叶中提取纯净的总 DNA [J]. 中山大学学报论丛, 2001, 21(3): 1-4.
- [10] 孙璐宏, 鲁周民, 张丽. 植物基因组 DNA 提取与纯化研究进展 [J]. 西北林学院学报, 2010, 25(6): 102-106.
- [11] MURRAY M G, THOMPSON W F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA [J]. Nucleic acids research, 1980, 8: 4321-4325.
- [12] CLARKE J D. Cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB) DNA miniprep for plant DNA isolation [J]. Cold spring harbor protocols, 2009, 4: 5177-5179.
- [13] 陈林杨, 宋敏舒, 查红光, 等. 一种改良的植物基因组 DNA 通用提取方法 [J]. 植物分类与资源学报, 2014, 36(3): 375-380.
- [14] 王艳, 李韶山, 刘颂豪. 植物总 DNA 样品的快速制备 [J]. 激光生物学报, 2000, 9(1): 79-81.
- [15] SUN Y, ZHANG W, LI F L, et al. Identification and genetic mapping of four novel genes that regulate leaf development in *Arabidopsis* [J]. Cell research, 2000, 10(4): 325-335.
- [16] PIERRE G, HAURENCE M D. Isolation of plant DNA: A fast, inexpensive, and reliable method [J]. Plant Mol Biol Rep, 1992, 10: 60-65.
- [17] 徐虹, 郑敏, 章军, 等. 三种樟科植物的细胞总 DNA 提取 [J]. 云南植物研究, 2004, 26(4): 451-457.
- [18] 邹喻苹, 汪小全, 雷一丁, 等. 几种濒危植物及其近缘类群总 DNA 的提取和鉴定 [J]. 植物学报, 1994, 36(7): 528-533.