维普资讯 http://www.cqvip.com

柑桔组织培养材料基因组DNA的快速提取

张 健[1] 夏海武[2] 吕柳新[2] 陈桂信[2] 杨国华[1]

([1]福建农林大学生命科学学院，福建福州 350002；[2]福建农林大学园艺学院)

摘 要 本文介绍了一种适用于柑桔组织培养材料基因组DNA的快速提取方法，获得的柑桔基因组DNA具有较好的质量和较高的纯度，可满足进一步研究的需要。

关键词 柑桔；基因组DNA；快速提取

DNA的提取是分子生物学的基础技术，提取高质量、高纯度的柑桔基因组DNA是进行柑桔分子生物学和基因工程各项研究所必需的条件。本试验在Dellaporta等[1-2]用CTAB法制备植物基因组DNA的基础上进行改进，研究了一种可有效排除细胞内多酚类、多糖等杂质污染的简便、快捷、经济的提取方法，获得的柑桔基因组DNA具有较好的质量和较高的纯度，可满足进一步研究的需要。

1 材料与方法

1.1 材料

柑桔组培材料取自福建农林大学园艺学院果树遗传育种实验室，取愈伤组织、嫩芽及嫩叶部位，分装至干净的1.5ml离心管中，液氮速冻后保存于-70℃低温冰箱备用。试剂有Tris、EDTA、NaCl、NaAc、CTAB、RNase A、氯仿、异戊醇、无水乙醇、异丙醇、冰乙酸、溴化乙锭、琼脂糖等（分析纯），Marker为λDNA/ EcoR Ⅰ + HindⅢ（购于上海生工生物工程技术服务有限公司）。

1.2 方法

1.2.1 柑桔基因组DNA的提取

参照Dellaporta等[1-2]、陈大明等[3]、肖顺元等[4]和程运江等[5]的方法并加以改进：取洁净的1.5ml离心管，加入750μl CTAB抽提液［质量浓度ρ = 2.0% CTAB、0.1 mol/L Tris - HCl (pH8.0)、20 mmol/L EDTA (pH8.0)、1.4 mol/L NaC1］，预热至65℃；取冻存嫩芽或嫩叶于研钵中，加入液氮迅速研磨成细粉末后，取约0.2g粉末迅速转入上述离心管中，充分摇匀，于65℃温育45 min（每10min轻摇1次），取出离心管冷却；加入等体积的氯仿/异戊醇（24:1，以下同）抽提裂解液并颠倒混匀，静置5 min，于4℃、12000g离心15 min，取上相（约600μl）；再用等体积的氯仿/异戊醇重复抽提1次，取上相；加入3/5体积的预冷异丙醇，混匀，于4℃静置20 min，然后于4℃、10000g离心10 min，去上清液，得到DNA粗沉淀；用75%乙醇漂洗两次，晾干；加入400μl高盐的TE缓冲液［10 mmol/L Tris - HCl (pH 8.0)，0.1 mmol/L EDTA (pH 8.0)，1.0mol/L NaC1］溶解沉淀，加入8μl RNase A，轻轻混匀，于37℃保温1h；加入等体积的氯仿/异戊醇并颠倒混匀，于4℃、10000g离心15 min，取上相，重复该步骤1次；加入1/10体积的3M NaAc (pH 5.2)和2倍体积的无水乙醇，混匀，-20℃下静置30 min；于4℃、10000g离心10 min，去上清液；沉淀用75%乙醇洗涤2次，晾干；加入30μl无菌重蒸水溶解沉淀，于-20℃保存。

1.2.2 纯度和浓度的测定

取5μl基因组DNA样品稀释100倍，在Ultrospec 2100 Pro紫外分析仪上测定OD_{260}、OD_{280}，计算检测DNA的纯度（OD_{260}/ OD_{280}）、DNA浓度（μg/μl）。

1.2.3 电泳分析

取10μl DNA样品在1.0%琼脂糖凝胶，电泳缓冲液为1×TAE，电压为90V的条件下电泳30 min，溴化乙锭染色，在凝胶成像仪上观察、拍照。

2 结果与分析

本实验以柑桔的组织培养物为材料，对传统CTAB法加以改进，所得的基因组DNA样品呈白

收稿日期：2006-08-24

作者简介：张健（1972-），女，在读博士，讲师，从事植物细胞生物学研究

维普资讯 http://www.cqvip.com

色、半透明、絮状、不粘稠，质地较好。

对于纯净的DNA样品，OD_{260}/OD_{280}值应为1.8~1.9，当OD_{260}/OD_{280}大于1.9时表明有RNA污染，小于1.6时表明有蛋白质、酚等杂质的污染。紫外分析结果（表1）显示，本方法所提取的柑桔基因组DNA的OD_{260}/OD_{280}为1.82，介于1.8~1.9之间，表明DNA样品较纯净，无蛋白质、酚类物质及RNA污染。

表1 柑桔基因组的DNA纯度和浓度

OD_{260}	OD_{280}	DNA纯度	DNA浓度（μg/μl）
0.069	0.037	1.82	0.345

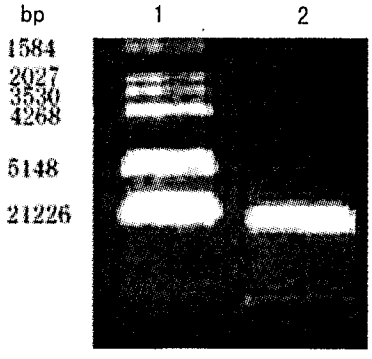

图1 柑桔基因组DNA电泳图

1. λDNA/EcoR Ⅰ + Hind Ⅲ Markers 2. 柑桔基因组DNA样品

电泳检测结果显示（图1），试验得到的柑桔基因组DNA大小在30kb左右，完整性较好，无大量降解情况；电泳条带清晰，没有RNA污染，在基因组DNA条带附近及点样孔周围没有发亮现象，表明样品中的蛋白质、多糖等物质得到较彻底的去除。

综合紫外分析测定和电泳分析的结果，表明本研究中所提取的柑桔基因组DNA样品纯净，结构完整，浓度达到0.345μg/μl，完全可满足如PCR、RAPD分析等后续研究的需要。

3 讨论

提取高质量的DNA是有效开展分子生物学研究的前提。多年生木本果树的细胞中含有多种次生物质，这些物质在DNA提取过程中与DNA共沉淀，形成粘稠的胶状物而难以溶解或产生褐变，不但给实验操作带来不便，还对反应体系中的酶活性产生抑制作用，严重影响分子生物学研究的下游工作[6-8]。因此，去除多酚、多糖等次生物质成为提取和纯化木本果树DNA的关键步骤。多数报道是在提取液中加入抗氧化剂（如β-巯基乙醇）与吸附剂（如PVP或PVPP）[3-5]以达到去除多酚的目的，但在本研究中，由于选用的材料为柑桔组织培养的愈伤组织、嫩芽和嫩叶等，取用量仅0.2g，多酚类次生物质的含量较少，影响不大，因此无需添加β-巯基乙醇与PVP、PVPP即能获得较理想的实验结果。多糖的去除一般是利用高盐缓冲条件下，DNA在乙醇或异丙醇中优先沉淀的特性，以达到分离目的[1,6-7]。本研究在DNA粗提液中加入适量高浓度NaAc和无水乙醇沉淀DNA，可以有效地去除多糖的干扰。

本研究试用的柑桔基因组DNA提取方法所需材料少，无需昂贵的试剂，操作简便，经济快速，一般实验室中均能应用，是一种值得借鉴的方法，尤其在处理材料稀少或处理大量样品时，具有明显优势。

参考文献

[1] Dellaporta S L, et al. A plant DNA minipreparation : version Ⅱ. Plant Molecular Biology Reporter, 1983, 1 (4): 19-21

[2] Ausubel F M, et al. 精编分子生物学实验指南. 北京：科学出版社, 2002 : 37-38

[3] 陈大明，等. 一种木本果树基因组DNA提取方法研究. 浙江农业大学学报, 1997, 23 (6): 621-624

[4] 肖顺元，等. RAPD分析——鉴定柑桔体细胞杂种的快速方法. 遗传, 1995, 17 (4): 40-42

[5] 程运江，等. 几种木本果树DNA的有效提取. 华中农业大学学报, 2001, 20 (5): 481-483

[6] Fang G, et al. A quick and inexpensive method for removing polysaccharides from plant genomic DNA. Biofeedback, 1992, 13 (1): 52-54

[7] Proberki S L, et al. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plant containing high polysaccharide and polyphenol components. Plant Mol Rep, 1997 (12): 8-15

[8] 丁晓东，等. 从顽拗植物荔枝中提取基因组DNA技术的研究. 应用与环境生物学报, 2000, 6 (2): 142-145

福清市大力引进推广台湾优质水果

今年以来，福清市采取优惠政策，大力推进台湾农民创业园建设，积极引进台湾先进的栽培技术和优质品种，截止目前，全市已推广台湾番石榴、芒果、火龙果、杨桃、毛叶枣等优质水果20多种，面积达5000多亩。

（信息来源：福州市农业局）