

荒漠植物中总脱氧核糖核酸分子的提取方法

赵 昕,张继伟,陈国雄,李玉霖

(中国科学院 西北生态环境资源研究院 甘肃省寒区旱区逆境生理与生态重点实验室,甘肃 兰州 730000)

摘要:建立了荒漠植物总脱氧核糖核酸分子(DNA)的提取方法.荒漠植物叶片加少量交联聚乙烯吡咯烷酮(PVPP粉末)研磨三次以上,得到样品超细粉末.样品粉末迅速加入前处理缓冲液,混匀后低速离心,弃上清留下沉淀物,在沉淀物中加入等体积预热的提取裂解液,混匀后 60~70℃温浴 1 h.高速离心提取上清液加入纯化液混匀、抽提、离心.再次提取混合液上清,加入预冷的异丙醇,-18℃沉淀 DNA 0.5 h 以上,异丙醇溶液高速离心,取沉淀用 75%乙醇清洗两遍,晾干,加入超纯水溶解.方法具有操作简单和耗时少等优点,操作过程大约 2~3 h. DNA 损失少,产量高于 500 ng/μL.方法提取主要荒漠植物叶片 DNA 纯度高、完整性好,具有广泛适用性.

关键词:荒漠植物;总脱氧核糖核酸分子;提取

中图分类号:O657.31 文献标志码:B 文章编号:1006-3757(2020)01-0037-05
DOI:10.16495/j.1006-3757.2020.01.007

Extraction Method of Total Deoxyribo Nucleic Acid from Desert Plants

ZHAO Xin, ZHANG Ji-wei, CHEN Guo-xun, LI Yu-lin

(Northwest Institute of Eco-Environment and Resources, CAS, Key Laboratory of Stress Physiology and Ecology, Gansu Province, Lanzhou 730000, China)

Abstract: An extraction method of total deoxyribo nucleic acid(DNA) from desert plants has been established. The steps of the method are as follows: add a small amount of PVPP powder to the leaves of desert plants and grind them for more than three times to get the ultra-fine powder of the sample, immediately add the pre-treatment buffer solution to the sample powder, mix them evenly and centrifuge them at low speed, then discard the supernatant and leave the precipitate, add an equal volume of preheated extraction cracking solution to the precipitate, mix them evenly on a warm bath at 60~70℃ for one hour, extract the supernatant using high-speed centrifugation. And then add the purified mixture to the solution and mix, extract and centrifuge, extract the supernatant of the mixture again, add the precooled isopropanol and precipitate DNA at -18℃ for more than half an hour, after that, centrifuge the isopropanol solution in high-speed, wash the precipitate twice with 70% ethanol, air dry and to dissolve the precipitate with ultra-pure water. The advantages of the technology are simple operation and less time-consuming, and the operation process is about 2~3 h. The yield of DNA was higher than 500 ng/μL. This method has the advantages of high purity, good integrity and wide applicability.

Key words: desert plant; DNA; extraction

为研究植物核酸分子在生命活动中的作用,常常需要从不同的生物材料中提取核酸.核酸的主要组分为核糖核酸分子(RNA)和脱氧核糖核酸

(DNA),其纯品呈白色粉末或结晶.

由于荒漠植物体内含有大量的多糖、多酚、单宁酸和其它次级代谢物,因此荒漠植物具有强抗逆性.

现代分子生物学技术的运用对揭示荒漠植物强抵抗逆境的机制及其遗传种质资源的保护具有重要的作用,检测不同环境胁迫下基因表达水平的变化为理解植物的抗逆性提供一些必要的基础数据,高质量 DNA 的提取是进行分子生物学基因表达研究的必要前提。

DNA 提取方法有 CTAB 法^[1]、高盐低 pH 法^[2]、SDS 法^[3]、蛋白质变性和苯酚抽提法^[4]等。然而,已有文献都反映出分离高质足量的 DNA 存在不同困难,主要表现在植物组织细胞破碎后,释放出大量的多酚、多糖以及其它次级代谢物而干扰 DNA 的提取。多酚易氧化成多醌而与核酸结合,多糖在低离子浓度缓冲溶液中与 DNA 结合产生共沉淀,这些都导致 DNA 产量降低。不同植物组织中多糖、多酚以及其它次级代谢物含量的不同,显著地影响着核酸的抽提及纯化过程,因此研究荒漠植物抗逆机制及 DNA 提取方法是科技工作者必须解决的一个技术难题。

目前分子生物学实验室常用的经典方法以及各种生物公司出售的提取试剂盒,在针对模式植物拟南芥和水稻等的核酸提取时,效果较好。因为模式植物材料幼嫩、次生代谢产物少,能够保证提取出高品质高产量的核酸产物。但是荒漠高寒植物含有较多的多糖、蛋白质、酚类、萜类等次生代谢产物,采用常规方法提取核酸时,匀浆过程中会释放酚类物质,氧化后与核酸稳定的结合,形成难溶的胶状物。同时萜类化合物和 RNase 会分别造成核酸的化学降解和酶解。

本文综合各种已知方法的优点,经过改良,确保能够提取到荒漠植物中高品质 DNA。本方法不仅能从常见荒漠植物中提取出高质量的 DNA,同时也适合于其它富含多糖、多酚以及大量次级代谢物植物 DNA 的高效提取,如提取水果果实、百合鳞茎中的 DNA,具有广泛的应用价值。此方法已经获得发明专利授权^[5]。

1 试验部分

1.1 仪器

凝胶电泳系统,琼脂糖水平电泳槽 DYCP-31DN 型(北京六一仪器厂);全自动数码凝胶成像系统 380C 型(上海培清生物技术有限公司);微量紫外分光光度计 Nanodrop2000C 型(Thermo-Fisher Scientific 公司)。

1.2 试剂

十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)、三羟甲基氨基甲烷(Tris)、四乙酸乙二胺(EDTA)、 β -巯基乙醇、聚乙烯吡咯烷酮(PVPP 6755)购自美国 Sigma 公司,琼脂糖(Agarose)等购自兰州鹏程生物科技有限公司,其他试剂均为国产化学级产品。

1.3 样品

挑选腾格里沙漠南缘沙坡头地区的常见荒漠植物沙米、红砂、珍珠猪毛菜、柠条、沙冬青、油蒿、沙拐枣、沙木蓼、文冠果、花棒、蒙古莠和霸王等植株,取其叶片立即冻存于液氮,贮存在 -80°C 冰箱备用。

1.4 DNA 提取准备工作

提取试剂配制所用容器、提取所用研钵、药匙和研杵等用高温灭菌。制备 DNA 的离心管、枪头等于 120°C 高压蒸汽灭菌 20 min 后烘干备用。电泳槽和梳子的处理:用去污剂清洗后,用水冲洗并用乙醇干燥,然后装满 3%的 H_2O_2 溶液,室温下处理 10 min。操作过程中,带手套口罩,无菌超净工作台上提取,研磨迅速,避免 DNA 受到污染。

1.5 溶液配置

交联聚乙烯吡咯烷酮(PVPP 粉末):购自 Sigma 公司;高压灭菌锅 120°C 20 min 灭菌后,密封低温保存;前处理缓冲液:200 mmol/L Tris-HCl+50 mmol EDTA+250 mmol/L NaCl +0.5~2% β -巯基乙醇(V/V);提取裂解液:2% CTAB(W/V)+1.4 mol/L NaCl+0.02 mol/L EDTA+0.1 mol/L Tris-HCl+0.2~0.5% β -巯基乙醇(V/V);pH 8.0;有机溶剂有纯化液、异丙醇和乙醇。纯化液组成为酚:氯仿:异戊醇(体积比为 25:24:1,化学级,市售有机溶剂);异丙醇为 100%纯度,分析化学级,市售有机溶剂;75%乙醇(V/V),分析化学级;所有溶液都用高压灭菌处理的超纯水配置。

普通植物 DNA 提取试剂盒采用离心柱型普通 DNA 提取试剂盒(货号 DP305,北京天根公司)。

2 荒漠植物叶片 DNA 提取

2.1 材料研磨

取荒漠植物叶片大约 0.2~0.5 g,置于研钵中,在研钵中直接加上 PVPP 粉末,加入量为荒漠植物叶片质量的 0.5%~2%,充分研磨(可加入液氮),至少研磨三次以上,将样品粉末装入 2 mL 微量灭菌离心管。

2.2 溶解除糖

加入前处理缓冲溶液,溶解多糖类物质.在研磨好的样品粉末中迅速加入前处理缓冲液 500~1 000 μL ,涡旋仪上高速混匀,离心机上低速 900 r/min 离心 5 min,弃上清,取沉淀物.

2.3 萃取抽提

在沉淀物中加入 500~1 000 μL 的 CTAB 提取裂解液(经 60~70 $^{\circ}\text{C}$ 预热),涡旋仪上充分混匀,恒温水浴锅 60~70 $^{\circ}\text{C}$ 温浴 1 h,充分震荡混匀后高速离心机 12 000 r/min 离心 10 min.抽提 DNA 清除多糖类产物.

CTAB 提取液含有较高浓度的 CTAB(2%)、NaCl(1.4 mol/L)、 β -巯基乙醇(0.2%~0.5%)以及 25 mmol/L EDTA 和 100 mmol/L Tris-HCl(pH 值 8.0).CTAB 是一种阳离子去污剂,能溶解细胞膜,对植物细胞具有较好的裂解作用,而且与 β -巯基乙醇共同具有对蛋白质的强烈变性作用,使核酸从蛋白-核酸复合物中彻底释放出来.在高离子浓度的 NaCl 溶液中($\text{NaCl}>0.7$ mol/L),释放出来的核酸与较高浓度的 CTAB(2%, W/V)形成可溶性的复合物,而变性蛋白质与 CTAB 形成不溶性的复合物,随着氯仿的抽提,蛋白质被去除.同时 β -巯基乙醇不但可以作为强还原剂防止多酚氧化,提供 pH 值为 8.0 的缓冲环境,还能有效降低多酚物质在酸性条件下被氧化的几率.

2.4 纯化萃取漂洗

取上清液,加入新的 2 mL 微量离心管,加等体积(800 μL)纯化液混匀,抽提一次,室温下,高速离心机 12 000 r/min 离心 5 min.

取上清液,加入新的 2 mL 微量离心管,加入 1/2 体积、预冷的异丙醇放入冰箱冷冻室, -20 $^{\circ}\text{C}$ 沉淀 DNA 30~60 min.

取出 2 mL 微量离心管,在 4 $^{\circ}\text{C}$ 12 000 r/min 转速离心 5~10 min,弃去液体部分,取沉淀用 75% 乙醇清洗两遍.

2.5 溶解保存

放入通风厨吹干至乙醇充分挥发,加入 40~100 μL 超纯水溶解,贴标签放入 -18 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱冷冻室冻存盒保存.

3 结果与讨论

3.1 总 DNA 完整性检测

每个样品中取 3 μL 总 DNA 溶液通过凝胶电泳

检测其完整性,其它 DNA 样品保存在 -18 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中.将 1 μL 缓冲液和 3 μL 总 DNA 溶液室温混合,然后进样到 1% 琼脂糖凝胶(已加 2 μL 溴化乙锭 EB)样孔中,在 100 V 电泳槽中电泳 30 min,用全自动数码凝胶成像系统 380C 拍照记录,结果如图 1 所示,从左到右依次为柠条、沙米、红砂、珍珠猪毛菜、霸王、油蒿、沙木蓼、沙冬青、蒙古莠、沙拐枣、文冠果和花棒所提取的 DNA 电泳结果.由图 1 可以看出,12 种荒漠植物提取的 DNA 完整性良好.



图 1 12 种荒漠植物提取的 DNA 电泳结果

Fig. 1 DNA electrophoresis results of 12 desert plants

3.2 总 DNA 产量和纯度检测

取 1 μL 提取获得的 DNA 溶液,用微量紫外分光光度计(Nanodrop 2000C)测定 OD_{260} 、 OD_{280} 和 OD_{230} 处的吸光值(以超纯水为空白液调零),计算 DNA 产量及纯度.总 DNA 产量计算根据式(1)^[6]:

$$\text{DNA 产量} = 50 \times \text{OD}_{260} \times \text{样品的体积}(\mu\text{L}) / \text{材料重}(\text{mg}) \quad (1)$$

其中,DNA、蛋白质和多糖、多酚分别在 OD_{260} 、 OD_{280} 和 OD_{230} 具有最大吸光值,常用 $\text{A}_{260}/\text{A}_{230}$ 、 $\text{A}_{260}/\text{A}_{280}$ 的比值来表示 DNA 的纯度. $\text{A}_{260}/\text{A}_{280}$ 的值在 1.6~2.2 之间,表示 DNA 具有较高的纯度. $\text{A}_{260}/\text{A}_{230}$ 低于 1.8,说明 DNA 被多糖和多酚污染, $\text{A}_{260}/\text{A}_{280}$ 低于 1.8,说明 DNA 被蛋白质污染.

采用本论文改进的试剂配方提取的 12 种荒漠植物 DNA 结果如表 1 所列.由表 1 可见,总 DNA 质量浓度超过 500 ng/ μL , $\text{A}_{260}/\text{A}_{230}$ 高于 1.8, $\text{A}_{260}/\text{A}_{280}$ 在 1.6~2.2 之间,表明所提取的 DNA 产量和纯度均高.

采用市售普通植物 DNA 提取试剂盒提取 12 种荒漠植物 DNA 结果如表 2 所列.由表 2 可见,总 DNA 质量浓度低于 100 ng/ μL , $\text{A}_{260}/\text{A}_{230}$ 低于 1.8,除了第一个样品,其他样品的 $\text{A}_{260}/\text{A}_{280}$ 均低于 1.6,表明所提取的 DNA 浓度低,纯度差.

从表 1、2 的结果比较可以看出,采用研磨过程中直接加入 PVPP 粉的方法,显著提高了荒漠植物的 DNA 浓度.PVPP 粉作为多酚化合物的螯合剂,

具有很强的结合酚能力. 在此试验中特别提高了 PVPP 粉和前处理缓冲液中 β -巯基乙醇的含量,使其质量分数均达到 0.5%~2%, β -巯基乙醇提供还原条件,二者协同作用,使得多酚类物质不易被氧化,而与 PVPP 充分结合形成螯合物. 再通过后续的步骤抽提除去,有效抑制了酚类物质对 DNA 提取的影响.

表 1 改良法 12 种荒漠植物 DNA 产量和纯度测定结果

Table 1 Determination of DNA amount and purity of 12 desert plants by improved CTAB method							
序号	样品名称	DNA 质量浓度/(ng/ μ L)	A260	A280	A230	A260/280	A260/230
1	柠条	535.70	10.71	5.47	5.64	1.96	1.90
2	沙米	1325.05	26.50	12.93	14.73	2.05	1.80
3	红砂	766.20	15.32	7.23	8.76	2.12	1.75
4	珍珠猪毛菜	908.10	18.16	8.26	10.03	2.20	1.81
5	霸王	523.60	10.47	5.19	4.99	2.02	2.10
6	油蒿	1437.10	28.74	20.24	14.23	1.42	2.02
7	沙木蓼	1094.70	21.89	9.94	12.10	2.20	1.81
8	沙冬青	465.20	9.31	4.53	4.61	2.06	2.02
9	蒙古莠	521.90	10.44	3.95	4.90	2.64	2.13
10	沙拐枣	1251.50	25.03	11.82	11.81	2.12	2.12
11	文冠果	635.40	12.71	7.65	6.02	1.66	2.11
12	花棒	1640.30	32.81	15.50	16.16	2.12	2.03

表 2 普通植物 DNA 提取试剂盒 12 种荒漠植物 DNA 产量和纯度测定结果

Table 2 Determination of DNA amount and purity of 12 desert plants by normal extract DNA kit							
序号	样品名称	DNA 质量浓度/(ng/ μ L)	A260	A280	A230	A260/280	A260/230
1	柠条	15.00	0.299	0.166	0.47	1.81	0.63
2	沙米	12.40	0.248	0.303	0.64	0.82	0.39
3	红砂	14.70	0.294	0.372	0.74	0.79	0.4
4	珍珠猪毛菜	49.60	0.991	0.793	1.19	1.25	0.83
5	霸王	43.70	0.874	0.755	1.14	1.16	0.77
6	油蒿	29.90	0.599	0.487	2.85	1.23	0.21
7	沙木蓼	17.70	0.354	0.312	2.72	1.13	0.13
8	沙冬青	14.20	0.284	0.213	0.75	1.33	0.38
9	蒙古莠	39.80	0.795	0.69	3.98	1.15	0.2
10	沙拐枣	40.60	0.813	0.713	4.28	1.14	0.19
11	文冠果	15.60	0.311	0.202	0.49	1.54	0.64
12	花棒	65.90	1.318	0.858	1.71	1.54	0.77

对照试验中采用的试剂盒没有加入 PVPP 粉,因此导致 DNA 提取浓度低的原因是其采用聚乙烯吡咯烷酮(PVP). PVP 水溶性好,可溶于各种有机溶剂,而 PVPP 是交联聚乙烯吡咯烷酮,是聚乙烯吡咯烷酮的交联聚合物,几乎不溶于任何溶剂. 不溶性 PVPP 替代可溶性的 PVP,可溶性 PVP 与酚的抽

提不兼容而干扰 DNA 沉淀. 不溶性 PVPP 在提取第一步的研磨时立即结合多酚,从而阻止核酸与多酚结合,可以避免 DNA 产量减少. 而且 PVPP 不影响萃取纯化过程,因此提高了 DNA 的产量和纯度.

4 结论

本方法操作简单,耗时少,操作过程大约 2~3 h. DNA 损失少,产量高, DNA 质量浓度大于 500 ng/ μ L.

本方法提取的荒漠植物 DNA 纯度高.荒漠植物富含多酚、多糖、蛋白质等次级代谢物,为了使提取的 DNA 纯度高,操作过程中首先在材料研磨时使用 PVPP 粉充分结合多酚进而通过氯仿/异戊醇抽提彻底去除多酚. 通过使用高盐的前处理缓冲液去除大部分多糖.

本方法提取的荒漠植物 DNA 完整性好. 由于改良 CTAB 法能彻底去除多糖、多酚、蛋白质、RNA 及其它污染物,所提的 DNA 适合分子生物学的下游试验,如反转录及基因扩增等,所以改良 CTAB 法是提取荒漠植物总 DNA 的最理想方法,为后续开展荒漠植物分子克隆和基因表达分析等分子生物学试验奠定了基础.

本技术不仅能从常见荒漠植物中提取出高质量的 DNA,同时也适合于其它富含多糖、多酚以及大量次级代谢物的植物 DNA 的高效提取,如提取水果果实、百合鳞茎中 DNA,具有广泛的应用价值.

参考文献:

- [1] 李荣华,夏岩石,刘顺枝,孙莉丽,郭培国,缪绅裕,陈健辉. 改进的 CTAB 提取植物 DNA 方法[J]. 实验室研究与探索, 2009, 28 (9) :14-16. [Li R H, Xia Y S, Liu S Z, Sun L L, Guo P G, Miao S Y, Chen J H. CTAB-improved method of DNA extraction in plant [J]. Res Exploration Laboratory, 2009, 28 (9) :14-16.]
- [2] 许理文,王风格,赵久然,易红梅. 高盐低 p H 值法提取玉米基因组 DNA 的研究[J]. 玉米科学, 2009, 17 (1) :59-61. [Xu L W, Wang F G, Zhao J R, Yi H M, Studies on genomic DNA extraction of maize with high salt, low p H method[J]. J Maize Sci, 2009, 17 (1) :59-61]
- [3] 梁雪莲,郑奕雄,陈晓玲,曾锦姬. 花生 DNA 提取方法比较[J]. 生物技术, 2007, 17 (1) :41-44. [. Liang X L, Zheng Y X, Chen X L, Zeng J J. Comparison of different methods of DNA extraction of peanut leave[J]. Biotechnology, 2007, 17 (1) :41-44]
- [4] 王小华,肖洪浪,赵昕. 荒漠植物红砂的 DNA 高效提取方法. 植物遗传多样性研究[M].
- [5] 赵昕,张继伟,陈国雄. 一种荒漠植物总 DNA 的提取方法:中国,201610231035.5[P].
- [6] Chase M W, Hills H H. Silica gel: an ideal material for field preservation of leaf samples for DNA studies[J]. Taxon, 1991, 40(2) : 215-220.