

食用仙人掌肉质茎总 DNA 的提取

王铁固¹, 黄群策^{1*}, 陈秋芳¹, 郭群召²

(1. 郑州大学离子束生物工程省重点实验室, 河南 郑州 450052; 2. 四川省凉山州烟草公司, 四川 西昌 615000)

摘要: 以食用仙人掌的幼嫩肉质茎和紫糯玉米的幼嫩叶片为试验材料, 采用 CTAB 法提取 DNA, 用紫外分光光度计检测 DNA 的浓度和琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的质量。结果表明, 采用 CTAB 法可以从食用仙人掌中提取到一定质量和浓度的 DNA, 但是在操作过程中利用 Tris—饱和酚对其进行纯化处理是非常必要的。

关键词: 食用仙人掌; 肉质茎; DNA 提取; CTAB 法

中图分类号: S682.33 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004—3268(2006)01—0084—03

Extraction of DNA of Fleshy Stem of *Opuntia Ficus-indica*

WANG Tie-gu¹, HUANG Qun-ce^{1*}, CHEN Qiu-fang¹, GUO Qun-zhao²

(1. Henan Provincial Key Laboratory of Ion Beam Bio-engineering, Zhengzhou 450052, China;

2. Tobacco Corporation Liang-shan State Si-chuan Province, Xichang 615000, China)

Abstract: DNA of Tender fleshy stem of *Opuntia Ficus-indica* and tender leaf of purple glutinous maize was extracted by method of CTAB. Concentration of DNA was measured by UV spectrophotometer, and quality of DNA was examined by agarose gel. Result suggested that better DNA of *Opuntia Ficus-indica* was gotten by method of CTAB, but it is necessary to purify by used Tris-Phenol.

Key words: *Opuntia*; *Ficus-indica*; DNA extraction; CTAB method

随着社会的进步, 人类食品安全问题越来越引人注目。利用现代生物技术完成植物物种间遗传物质的交流, 由此创造农作物优良基因型, 这将使农作物遗传改良迈上新台阶。食用仙人掌作为一种蔬菜具有丰富的营养价值, 由于其主要进行营养生殖, 所以关于食用仙人掌的遗传特性的研究鲜有报道, 但其可能蕴藏巨大的遗传学价值。众所周知, 它具有很好的抗逆性, 比如抗旱、抗盐、抗寒等。许多学者对其感兴趣的问题是能否将其优良的基因转移到对人类关系更密切的农作物之中。随着现代科学技术, 特别是分子遗传学的飞速发展, 植物的转基因技术也得到了不断革新。水稻上外源 DNA 的转化也经历了几次变革, 1978 年, 安徽省农科院的周光宇

提出了以花粉管通道法将外源 DNA 导入有花植物中, 并从理论上提出了外源 DNA 导入的可能性。近年来, 国内外广泛开展了通过花粉管导入外源 DNA 的研究, 还发展了 DNA 浸泡种子和幼苗、孕穗注射、离子轰击和电击法等转移外源 DNA 的方法, 并在棉花、水稻、小麦、玉米、大豆等作物上获得外源 DNA 转化的变异后代, 培育出一些新品系。同时应用花粉管通道法, 把 *Bt* 基因、*Gus* 基因等导入棉花、玉米、小麦中, 获得了良好的转化效果。可见, 外源 DNA (基因) 直接导入法是完全可行的。1991 年, 中国科学院等离子体物理研究所余增亮研究员首次提出低能离子束处理植物细胞能协助外源 DNA 导入细胞的设想, 这一设想已得到不同实验小

收稿日期: 2005—08—12

基金项目: 国家“十五”科技攻关项目(2001BA302B)

作者简介: 王铁固(1971—), 男, 河南伊川人, 在读博士, 主要从事作物遗传育种研究。

通讯作者: 黄群策(1958—), 男, 广西全州人, 教授, 博士生导师, 主要从事细胞发育生物学研究。

组研究成果的证实。笔者拟利用低能离子束介导将仙人掌的 DNA 导入水稻,以期达到对水稻的遗传改良。而仙人掌 DNA 提取是一个重要的前提,目前还没见到有关仙人掌 DNA 提取方法的报道,而 CTAB 法较适合于幼嫩组织 DNA 的提取,因此,尝试采用 CTAB 法来进行食用仙人掌肉质茎总 DNA 的提取,并对其加以改进。

1 材料与方法

1.1 试验材料

以市售的食用仙人掌盆栽培养,摘取鲜嫩组织称量 50 g 备用;糯玉米盆栽,待其生长到 5~6 片叶时取其叶片称量 50 g 备用。DNA 的提取采用 CTAB 法。

1.2 试剂配制

试剂配制参照文献[9]。A.液氮;B.CTAB 提取缓冲液:50mmol/L Tris-HCl, pH=8.0, 0.7mol/L NaCl, 10mmol/L EDTA, pH=8.0, 1.1%CTAB, 2% V/V β -巯基乙醇用时加入;C.氯仿:异戊醇=24:1;D.Tris-饱和酚;E.异丙醇;F.76%的醋酸氨乙醇溶液;G.70%乙醇;H.TE 缓冲液:10 mol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA, pH=8.0。其中,CTAB、 β -巯基乙醇、Tris、Tris-饱和酚、EDTA 均购自上海生物化工试剂有限公司,其他药品均为分析纯药品。

1.3 仪器设备

上海安亭科学仪器厂产 TDL-5-A 型离心机;上海跃进医疗器械厂制造的 HHS21-4 型电热恒温水浴锅;日本进口的日立牌 U-2000 型紫外分光光度计;北京市六一仪器厂制造的 DYY-6B 型稳压稳流电泳仪。

1.4 DNA 提取

①将刚摘取称量好的仙人掌的幼嫩组织用刀快速切成小薄片,放入研钵中,立即加入液氮研磨;玉米叶片可直接加入液氮研磨。研磨越充分,提取效果越好。

②CTAB 萃取液最好即用即配,然后加热使其充分溶解,不能沸腾,可不待冷却,量取 250 ml 加入 2 个三角瓶中,直接放入水温 65℃的水浴锅中冷却至 65℃。将研磨好的材料倒入三角瓶中,各加入 1 000 μ l β -巯基乙醇,水浴 60 min。

③取出室温冷却加入等体积的氯仿异戊醇(24:1),慢慢摇动使其充分混匀,待氯仿异戊醇变成墨绿色为止,约 30~60 min。

④静置一段时间,将上部液体倒入离心管中,配平离心,5 000 r/min 离心 20 min。

⑤将上清液用 5 ml 的微量转移液枪吸出加入到-20℃预冷的异丙醇中,缓慢摇动,DNA 呈絮状沉淀析出,可置于 4℃冰箱静置一段时间。

⑥用玻璃勾将沉淀勾出放入 76%醋酸氨乙醇溶液中,冰水浴 10 min。

⑦将 76%醋酸氨乙醇溶液倒掉,加入 70%的酒精静置 30 min。

⑧将酒精倒掉干燥 30 min,加入 5 ml 的 10 倍 TE 溶解,可水浴加热助溶。

1.5 DNA 的纯化

1.5.1 RNA 酶处理 为了去除提取液中的 RNA,需要进行 RNA 酶处理。一般是加入 1 mg/ml 的 RNA 酶,使 RNA 酶的质量浓度达到 60 μ g/ml,在 15 ml 的仙人掌 DNA 提取液中加入配制好的 RNA 酶溶液 0.9 ml,在 37℃恒温箱内保温 30 min。

1.5.2 饱和酚处理 由于仙人掌的组织中含有大量的糖蛋白,需要进行 Tris-饱和酚的进一步纯化。在 RNA 酶处理后的溶液中加入 Tris-饱和酚和氯仿异戊醇(24:1)的混合液,充分混合摇匀 10 min,然后 5 000 r/min 离心 10 min,收集上层水溶液。在收集到的溶液中加入 1/25 体积的 5 mol/L 的 NaCl 溶液,再加入预冷的 2 倍体积的无水乙醇,至出现白色沉淀,沉淀物即为纯化的 DNA。此纯化过程可重复进行,试验中由于一次处理后仙人掌 DNA 提取液的粘稠度仍较大,故将此纯化过程重复 1 次。

2 结果与分析

2.1 分光光度计检测结果

将分光光度计打开预热 20 min,在第 1 个比色皿中加入 10 倍的 TE 缓冲液 2 ml 做空白对照,在另一个比色皿中加入 2 μ l 待测样品,用 10 倍的 TE 缓冲液稀释到 2 ml。将比色皿放入分光光度计用 0~400 nm 的全波长光进行扫描,待测样品均在波长 260 nm 的地方出现了最高吸光值,将仙人掌 DNA 提取液粗提后、RNA 酶处理后及 Tris-饱和酚处理后的溶液的吸光值均进行了检测,并做以对比,其检测结果列入表 1。在 260 nm 处,仙人掌 DNA 3 次检测的吸光值 A_{260} 分别为 0.172, 0.247, 0.297, 玉米 DNA 的吸光值 A_{260} 为 0.126;而在 280 nm 处仙人掌 DNA 3 次检测的吸光值 A_{280} 分别为 0.088, 0.165, 0.168, 玉米 DNA 的吸光值 A_{280} 为 0.075;仙人掌 DNA 3 次检测结果的 A_{260}/A_{280} 分别为 1.95, 1.50,

表 1 分光光度计的检测结果

材料名称	260nm 处吸光值 A_{260}	280nm 处吸光值 A_{280}	A_{260}/A_{280}
仙人掌粗提后	0.172	0.088	1.95
仙人掌 RNA 酶处理后	0.247	0.165	1.50
仙人掌饱和酚处理后	0.297	0.168	1.77
玉米未纯化处理	0.126	0.075	1.68

1.77, 玉米 DNA 的 A_{260}/A_{280} 为 1.68。

2.2 琼脂糖凝胶电泳检测结果

用 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳检测所提取的 DNA 的质量。DNA 的 Marker 使用 λ Hind III, 上样时 λ Hind III 未加热。上样时 λ Hind III 和样品 DNA 均按如下比例混合, DNA 加 3 μ l, 重蒸水 17 μ l, 6 \times Loading buffer 加 5 μ l。电泳时稳压 100 V 电泳 90 min, 电泳前未加入溴化乙锭, 电泳后放入 5 μ g/ml 的溴化乙锭溶液中染色 15 min, 用凝胶成像系统观测电泳结果。电泳结果如图 1。

由图 1 可知, 纯化后的仙人掌 DNA 和玉米 DNA 均在 23 130 bp 附近有一条清晰的带。



1 糯玉米 DNA; 2 仙人掌 DNA

图 1 电泳检测结果

3 结论

试验中, 纯化后的仙人掌 DNA 和玉米 DNA 的 A_{260}/A_{280} 分别为 1.77 和 1.68, 二者都比较接近于 1.8, 说明其均有一定的纯度。仙人掌 DNA 的 A_{260}/A_{280} 值 1.77, 更接近于 1.8, 可能是由于其进行了 Tris-饱和酚的纯化处理, 而玉米的 DNA 没有进行 Tris-饱和酚的纯化处理, 其里面含有较多的蛋白所致。在对仙人掌 DNA 的纯化过程中, 其 A_{260}/A_{280} 值均发生了明显的变化, 用 RNA 酶处理后其 A_{260}/A_{280} 值由 1.95 变到 1.50, 由此可见, 其提取液中含有大量的糖蛋白, 直观的可看到其提取液的粘稠度较玉米提取液要大得多, 后经 Tris-饱和酚 2

次的纯化处理后, 其 A_{260}/A_{280} 值由 1.50 提高到 1.77, 说明 Tris-饱和酚的纯化过程的效果是非常明显的, 对于仙人掌肉质茎的 DNA 的提取也是非常必要的。由电泳结果可知, 所提取到的仙人掌 DNA 和玉米 DNA 均有一条明亮清晰的条带, 脱尾不明显, 说明提取到的 DNA 基本没有降解, 含有一定的大片段全基因组 DNA。由此可知, 食用仙人掌采用 CTAB 法可以提取到一定浓度和质量 DNA, 但 Tris-饱和酚的纯化过程是非常必要的。我们已经将利用此方法提取的糯玉米 DNA, 借助离子束介导向小麦基因组中转化并取得一定的成绩, 因此, 以此方法提取的仙人掌 DNA 亦足可用于进行外源 DNA 的转化和离子束介导的外源 DNA 转化。

参考文献:

[1] Clark MS. 植物分子生物学—实验手册[M]. 顾红雅译. 北京: 高等教育出版社, 1998.

[2] 陈昆松, 李方, 徐昌杰, 等. 改良 CTAB 法用于多年生植物组织基因组 DNA 的大量提取[J]. 遗传, 2004, 26(4): 529—531.

[3] 杨前进, 张德文, 朱启升, 等. 蚕豆整体 DNA 导入冬小麦的细胞遗传学研究初报[J]. 安徽农业科学, 2002, 30(6): 836.

[4] 包劲松, 李载龙. 花粉管通道导入外源 DNA 技术[J]. 浙江农业科学, 1996(1): 47—50.

[5] 柏峰, 刘植义, 沈银柱, 等. 玉米 DNA 导入小麦获得矮秆优质和早熟 2 个新品系[J]. 作物学报, 1999, 25(2): 261—264.

[6] 杨剑波, 吴李君, 吴家道, 等. 应用低能离子束介导法获得水稻转基因植株[J]. 科学通报, 1994, 39(16): 1530—1534.

[7] 程备久, 田秋元, 李展, 等. 离子注入法导入外源 DNA 引起陆地棉性状变异的研究[J]. 核农学报, 1996, 10(3): 150—154.

[8] Ohta S. Construction and expression in tobacco of a β -glucuronidase(GUS) reporter gene containing an intron with in the coding sequence[J]. Plant Cell Physiol, 1990, 31: 805—813.

[9] 黄培堂译. 分子克隆实验指南(第 3 版)[M]. 北京: 科学出版社, 2002.

[10] 孙耀中, 赵冬梅, 毕金河. 植物组织 DNA 的提取及纯化方法的研究[J]. 河北职业技术师范学院学报, 1999, 13(3): 11—14.