

烤后烟叶基因组 DNA 提取条件优化

马林¹, 王广超¹, 罗昭标², 寇晓腾¹, 张文龙¹

(1. 郑州轻工业学院 烟草科学与工程学院, 河南 郑州 450001;

2. 抚州市烟草公司资溪县分公司 烟叶管理部, 江西 抚州 335300)

摘要:为解决烤后烟叶基因组 DNA 提取稳定性差的问题,以烤后烟叶为材料,对 CTAB 法提取基因组 DNA 进一步改良优化:对 CTAB 沉淀缓冲液使用量、裂解时间、Tris 平衡酚的处理次数和 RNase 处理时间 4 个影响因素进行单因素优化. 实验结果表明:CTAB 沉淀缓冲液使用 DNA 溶液体积的 1.5 倍、裂解时间 40 min、Tris 平衡酚抽提 1 次和 RNase(10 mg/mL, 1 μ L) 处理 10 min,能得到主带清晰的烤后烟叶基因组 DNA. 该方法提取得到的烤后烟叶基因组 DNA OD_{260}/OD_{280} 为 1.7 ~ 1.9, $OD_{260}/OD_{230} > 2.0$, 35 ng 左右基因组 DNA 即能得到清晰的 RAPD 和 SCAR 图谱,适用于以 PCR 为基础的分子生物学实验.

关键词:烤后烟叶;基因组 DNA;DNA 提取;PCR

中图分类号:S572 **文献标志码:**A **DOI:**10.3969/j.issn.2095-476X.2013.02.014

The optimization of conditions for the extraction of genomic DNA in flue-cured tobacco

MA Lin¹, WANG Guang-chao¹, LUO Zhao-biao², KOU Xiao-teng¹, ZHANG Wen-long¹

(1. College of Tobacco Science and Engineering, Zhengzhou University of Light Industry, Zhengzhou 450001, China;

2. Tobacco Management Department, Zixi Branch Fuzhou Tobacco Company, Fuzhou 335300, China)

Abstract: The experimental method which improves the CTAB for extracting the genomic DNA in flue-cured tobacco was presented in order to stabilize the extraction of the genomic DNA. Each of the four influencing factors in the CATB, namely, the usage amount of precipitate buffer solution, pyrolysis time, number of processing the Tris phenol and the processing time for RNase were optimized respectively. The results showed that after using CATB precipitate buffer solution with the volume 1.5 times larger than that of the DNA solution with pyrolysis time for 40 min, one-time extraction of the Tris phenol and 10 min processing the Rnase(10 mg/mL, 1 μ L), a clear main band of the genomic DNA in the flue-cured tobacco could be obtained. The extracted genomic DNA OD_{260}/OD_{280} was between 1.7 and 1.9. OD_{260}/OD_{230} was greater than 2.0. In this case, with 35 ng genomic DNA, clear RAPD and SCAR maps could be obtained. The extracted genomic DNA can be applied to the molecular biological experiments.

Key words: flue-cured tobacco; genomic DNA; extraction of DNA; PCR

0 引言

植物基因组 DNA 提取方法较多,如高盐低 pH 值法、改良 SDS 法、改良 CTAB 法和苯酚法等^[1],目前常用改良 CTAB 法,但是不同植物基因组 DNA 的提取步骤不尽相同^[2].烟草属于含多酚、多糖、色素和蛋白质等较高的植物,基因组 DNA 提取过程中容易受这些物质的干扰,影响基因组 DNA 的质量和产量^[3].因此烟草基因组 DNA 提取常采用的是增加了聚乙烯吡咯烷酮(PVP)和 β -巯基乙醇的改良 CTAB 法^[3-6].郭兆奎等^[5]对烤后烟叶基因组 DNA 提取方法进行了对比,确定了改良 CTAB 法作为烤后烟叶基因组 DNA 提取的基本方法.

烤后烟叶基因组 DNA 在经过烘烤高温(68℃左右)之后严重降解,烟叶中高分子化合物转化为低分子化合物,加大了基因组 DNA 分离纯化难度.F. Gadani 等^[7]建立的改良 CTAB 法提取烤后烟叶基因组 DNA.但检测结果波动较大,特别是对于保存时间较长的烤后烟叶,上述方法很难提取得到主带单一的基因组 DNA.因此,本文拟通过对改良 CTAB 法中 CTAB 沉淀缓冲液使用量、裂解时间、Tris 平衡酚的处理次数和 RNase 处理时间等主要影响因素进行单因素优化,并通过 PCR 检测基因组 DNA 的可用性,建立稳定的适合 PCR 分析的烤后烟叶基因组 DNA 提取技术,以期对烟草转基因检测和病原检测等工作中烤后烟叶基因组 DNA 提取提供新的实用方法.

1 实验

1.1 材料

烤后烟叶红花大金元, K326, NC102, NC297, 云烟 85, 云烟 87 和云烟 97, 均为 2009 年产, 由红云红河烟草(集团)有限责任公司提供.

Tris、EDTA、EDTA2Na、NaCl、CTAB、PVP、 β -巯基乙醇、三氯甲烷、异戊醇、无水乙醇、溴化乙锭、琼脂糖等试剂为分析纯, 天津大茂化学试剂厂产; Tris 平衡酚和 RNase, 上海生工生物工程技术有限公司产; Taq 酶和 250 bp DNA ladder marker, 宝生物工程(大连)有限公司产; dNTP, 美国 Promega 公司产.

RAPD 引物 L34: CCACAGCAGT; SCAR 引物 S-1: CCACAGCAGTAACAGCAGGA/S-2: CCACAGCAGTCTGATATTGGATG, 扩增产物大小为 313 bp,

均由上海生工生物工程技术有限公司合成.

0.75 × CTAB 提取缓冲液: pH = 8.0, 含 7.5 g/L CTAB, 1.4 mol/L NaCl, 0.1 mol/L Tris, 0.02 mmol/L EDTA2Na, 2% PVP 和 2% β -巯基乙醇; CTAB 沉淀缓冲液: pH = 8.0, 含 5 g/L CTAB, 0.01 mol/L EDTA, 0.5 mol/L Tris, 0.04 mol/L NaCl.

1.2 仪器

PCR 仪, Vetiti 型, Applied Biosystems 公司产; 离心机, MicroCL17 型, Thermo Electron Corporation 公司产; 紫外分光光度计, T6 新世纪, 北京普析通用有限责任公司产; 凝胶成像分析系统, Mini Bis Pro 型, 以色列 DNR 凝胶成像系统有限公司产.

1.3 实验方法

1.3.1 烤后烟叶基因组 DNA 提取方法 CTAB 法步骤: 1) 向盛有样品(0.15 g)的 1.5 mL 离心管中, 加 700 μ L 0.75 × CTAB 提取缓冲液, 混匀, 65℃ 温浴 10 min 以上; 2) 加入 700 μ L 三氯甲烷/异戊醇(24:1), 混匀, 12 000 r/min 离心 5 min; 3) 取上清, 加 1/10 体积 10% CTAB 提取缓冲液, 再加入等体积三氯甲烷/异戊醇(24:1), 混匀, 12 000 r/min 离心 5 min; 4) 取上清, 加 1.0 倍体积的 CTAB 沉淀缓冲液, 混匀, 12 000 r/min 离心 15 min; 5) 弃上清, 加 100 μ L 高盐 TE, 65℃ 温浴 10 min; 6) 加入 2.0 倍体积冷的无水乙醇, -20℃ 下静置 30 min; 7) 12 000 r/min 离心 15 min, 沉淀溶于 50 μ L 超纯水中, 4℃ 保存备用.

改进并优化方法: 选用烤后烟叶 K326(2009)为材料, 增加 RNase 处理和 Tris 平衡酚处理步骤. 针对 CTAB 沉淀缓冲液使用量、样品裂解(65℃ 温浴)时间、Tris 平衡酚处理次数和 RNase 处理时间 4 个因素进行单因素优化.

1) 在上述方法的基础上, 对 CTAB 沉淀缓冲液使用量设 3 个梯度, 分别是 DNA 溶液体积的 1.0 倍, 1.5 倍, 2.0 倍, 其他条件不变.

2) 在上述方法的基础上, 对样品 65℃ 温浴时间设 20 min, 30 min, 40 min, 50 min 4 个梯度, 采用优化后的 CTAB 沉淀缓冲液使用量, 其他条件不变.

3) 在上述方法步骤后增加等体积 Tris 平衡酚抽提步骤, 分别抽提 0 次, 1 次, 2 次, 3 次. 采用优化后的 CTAB 沉淀缓冲液使用量和样品裂解时间, 并在 Tris 平衡酚抽提后再用等体积三氯甲烷/异戊醇(24:1)抽提 1 次除去痕量酚, 其他条件不变.

4) 在等体积 Tris 平衡酚抽提后增加 RNase 水

解步骤,加入 1 μL RNase(10 mg/mL),在 37 $^{\circ}\text{C}$ 分别处理 0 min,10 min,20 min,30 min,40 min,采用优化后的 CTAB 沉淀缓冲液使用量、样品裂解时间和等体积 Tris 平衡酚抽提次数,其他条件不变。

1.3.2 基因组 DNA 紫外与电泳分析 基因组 DNA 纯度和浓度检测:样品稀释 50 倍后在紫外分光光度计上测定 OD_{230} , OD_{260} , OD_{280} , 计算 $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$, $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{230}$ 和 DNA 浓度。

琼脂糖凝胶检测:点样量 7 μL ,1% 琼脂糖凝胶,在 1 \times TAE 缓冲液中,90 V 条件下电泳 30 min,EB 染色后在凝胶成像仪上成像,并分析基因组 DNA 完整性。

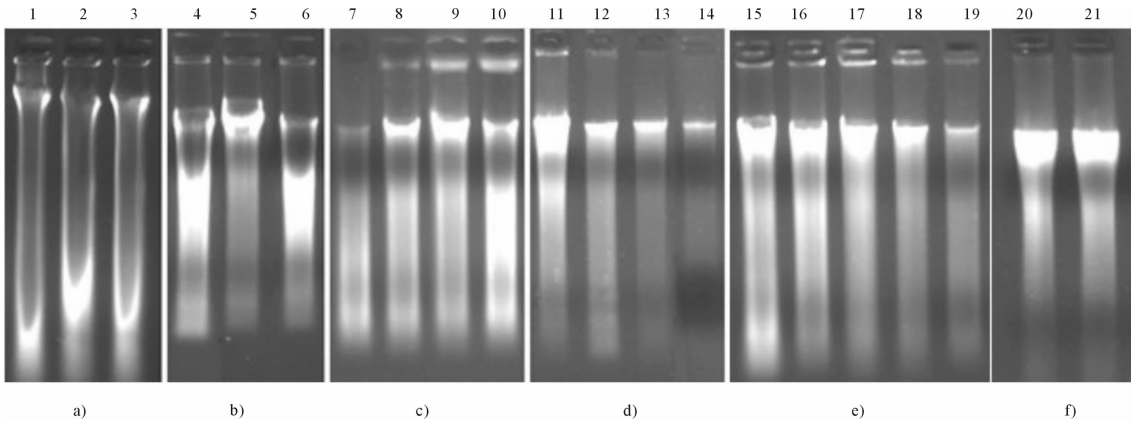
1.3.3 基因组 DNA PCR 分析 RAPD-PCR 分析采用文献[8]中所述方法。SCAR-PCR 分析采用 20 μL 反应体系,包括 50 ng/ μL DNA 模板 0.7 μL ,

10 \times PCR Buffer 2 μL , 25 mmol/L MgCl_2 1.6 μL , 10 mmol/L dNTP 1 μL , 10 $\mu\text{mol/L}$ 上下游各 0.5 μL , 5 U/ μL Taq 0.5 μL , ddH₂O 13.2 μL 。反应程序为:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 6 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 50 s,58 $^{\circ}\text{C}$ 退火 20 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s,反应 35 个循环;然后于 72 $^{\circ}\text{C}$ 下延伸 6 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 保温。扩增产物用 1 \times TAE,2.0% 的琼脂糖凝胶,在 100 V 稳定电压下电泳 40 min,凝胶成像系统,拍照分析。

2 结果与讨论

2.1 烤后烟叶基因组 DNA 提取条件优化结果分析

图 1 为烤后烟叶基因组 DNA 电泳检测图。表 1 为不同提取方法对烤后烟叶基因组 DNA 纯度和产量的影响。



a) 为优化前提取烤后烟叶基因组 DNA 效果,1—3 为 3 次重复实验;b) 为 CTAB 沉淀缓冲液使用量优化结果,4—6 为 CTAB 沉淀缓冲液使用量分别为 DNA 溶液量的 1.0 倍,1.5 倍,2.0 倍;c) 为样品裂解时间优化结果,7—10 为裂解时间,分别为 20 min,30 min,40 min,50 min;d) 为酚处理次数优化结果,11—14 为酚处理次数分别为 0 次,1 次,2 次,3 次;e) 为 RNase 处理时间优化结果,15—19 为 RNase 处理时间分别为 0 min,10 min,20 min,30 min,40 min;f) 为优化后提取烤后烟叶基因组 DNA 效果,20—21 为 2 次重复实验。

图 1 烤后烟叶基因组 DNA 电泳检测

表 1 不同提取方法对烤后烟叶基因组 DNA 纯度和产量的影响

提取方法	OD_{280}	OD_{260}	OD_{230}	$\text{OD}_{260}/\text{OD}_{230}$	$\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}/(\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1})$	DNA 浓度
优化前	0.150	0.287	0.156	1.840	1.916	718.333
优化后	0.081	0.153	0.073	2.096	1.897	382.500

由图 1a) 可看出,优化前 CTAB 法提取得到的烤后烟叶基因组 DNA 主带不清晰,拖尾严重,点样孔不干净,并且存在弥散现象。分析其纯度(见表 1), $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280} > 1.9$, $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{230} < 2.0$,说明含有大量的 RNA、多糖、蛋白质和盐类等物质。因此,为了得到主带清晰的烤后烟叶基因组 DNA,还需要对改良 CTAB 法进行优化,以除去 RNA 和蛋白质、多

糖等杂质。

由图 1b) 可看出,当 CTAB 沉淀缓冲液使用量为 DNA 溶液体积的 1.5 倍时,基因组 DNA 主带清晰,但仍存在拖尾和弥散现象,点样孔仍有残留,还需进行进一步纯化。而当 CTAB 沉淀缓冲液使用量为 DNA 溶液体积的 1.0 倍和 2.0 倍时,基因组 DNA 完整性较差,与优化前 CTAB 法效果一致。因此,对于烤后烟叶基因组 DNA 的提取,CTAB 沉淀缓冲液使用量以 DNA 溶液体积的 1.5 倍为宜。

由图 1c) 可看出,当裂解时间在 20 ~ 40 min 内增加时,提取得到的基因组 DNA 主带亮度增加;当裂解时间为 50 min 时,小片段 DNA 浓度增加,主带含量减少。且随着裂解时间增加,点样孔残留物增

加,说明随着裂解时间的增加,细胞裂解程度加大,但是进入 DNA 溶液中的杂质含量也随之增加.因此,裂解时间以 40 min 为宜.

由图 1d)可知,在使用等体积 Tris 平衡酚抽提 1 次后蛋白质去除效果明显,点样孔基本无残留,但拖尾现象仍然严重.而随着等体积 Tris 平衡酚抽提次数的增加,拖尾现象有所减轻,但是基因组 DNA 主带亮度也明显减弱.这说明随着处理步骤的增加,DNA 损失量也在增加,拖尾物质为 RNA 和 DNA 碎片.因此,等体积 Tris 平衡酚抽提次数以 1 次为宜.

由图 1e)可知,用 RNase 在 37 °C 处理 10 min 之后,RNA 降解完全,拖尾现象得到有效解决;而随着处理时间的增加,基因组 DNA 主带亮度也明显减弱.因此,RNase 在 37 °C 处理以 10 min 为宜.

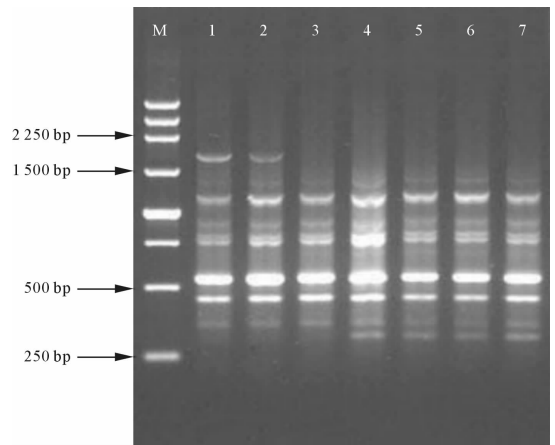
由图 1f)和表 1 可知,优化后的 CTAB 法提取烤后烟叶基因组 DNA 主带清晰, OD_{260}/OD_{280} 为 1.7 ~ 1.9, $OD_{260}/OD_{230} > 2.0$,说明纯度较好,且浓度达到 382.500 ng/ μ L.

2.2 烤后烟叶基因组 DNA,PCR 结果分析

为考察优化后用 CTAB 法提取的烤后烟叶基因组 DNA 的可用性,采用 RAPD 引物 L34 和 SCAR 引物 S-1/S-2 进行 PCR 扩增.图 2 为烤后烟叶基因组 DNA RAPD-PCR 扩增结果.由图 2 可知,RAPD 引物 L34 在 7 个烤后烟叶品种基因组 DNA 中扩增条带大小在 250 ~ 2 000 bp 之间,并且有 2 条特异性条带,1 800 bp 左右条带只在红花大金元和 K326 中有扩增,300 bp 左右条带在红花大金元、K326 和 NC102 中没有扩增. SCAR 引物 S-1/S-2 是根据 RAPD 引物扩增的 300 bp 左右条带序列而设计的.图 3 为烤后烟叶基因组 DNA SCAR-PCR 扩增结果.由图 3 可知,SCAR 引物 S-1/S-2 在烤后烟叶 NC297,云烟 85,云烟 87 和云烟 97 基因组 DNA 中扩增出清晰的 313 bp 条带.因此,优化后 CTAB 法得到的烤后烟叶基因组 DNA 可直接用于 PCR 扩增,DNA 用量仅为 35 ng 左右,在合适的反应体系中,可满足 RAPD 和 SCAR 标记对模板 DNA 的要求.

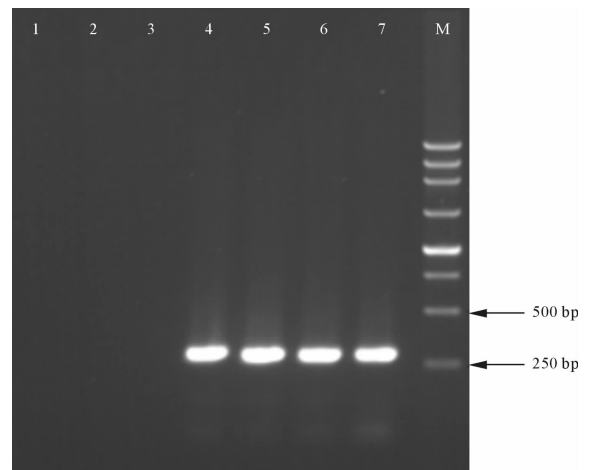
2.3 基因组 DNA 的浓度及纯度影响因子分析

基因组 DNA 的浓度(DNA 产量)在很大程度上取决于烟叶细胞的破碎程度.本研究发现,样品在 65 °C 水浴裂解细胞时,裂解时间太长会导致部分 DNA 降解.在 DNA 提取过程中,蛋白质的去除十分关键.由于苯酚能破坏蛋白质的二级结构,使蛋白质



1. 红花大金元;2. K326;3. NC102;4. NC297;5. 云烟 85;6. 云烟 87;7. 云烟 97;M, M, 250 bp DNA ladder marker

图 2 烤后烟叶基因组 DNA RAPD-PCR 扩增结果



1. 红花大金元;2. K326;3. NC102;4. NC297;5. 云烟 85;6. 云烟 87;7. 云烟 97;M, M, 250 bp DNA ladder marker

图 3 烤后烟叶基因组 DNA SCAR-PCR 扩增结果

变性并从溶液中沉淀出来^[9],但是苯酚会对后续实验产生影响,因此本方法中增加了三氯甲烷/异戊醇(24:1)抽提步骤,利用三氯甲烷萃取 DNA 中的痕量酚.有文献报道在使用 RNase 消化 RNA 之后,用异丙醇等沉淀 DNA 会破坏 RNase 的活性^[10],而本研究通过电泳观察发现,1 μ L RNase(10 mg/mL)的存在对 TE 中的 DNA 基本无影响,这与黄萱等^[11]的报道一致. GB/T 24310—2009^[12]改良 CTAB 法中建议 CTAB 沉淀缓冲液使用量为 DNA 溶液体积的 1.0 倍,而 F. Gadani 等^[7]建议 CTAB 沉淀缓冲液使用量为 DNA 溶液体积的 1.0 倍或者 1.5 倍,本研究通过单因素实验发现 1.0 倍或者 2.0 倍都容易沉淀出小片段 DNA,而 1.5 倍最适宜,提取 DNA 的主带最清晰.

3 结论

通过对改良 CTAB 法的 CTAB 沉淀缓冲液使用量、裂解时间、Tris 平衡酚的处理次数和 RNase 处理时间 4 个主要影响因素进行单因素优化. 实验结果表明: CTAB 沉淀缓冲液使用 DNA 溶液体积的 1.5 倍、裂解时间 40 min、Tris 平衡酚的抽提 1 次和 RNase(10 mg/mL, 1 μ L) 处理 10 min, 能得到主带清晰、纯度良好并适合用于 PCR 分析的烤后烟叶基因组 DNA.

参考文献:

- [1] 张英, 柏干荣, 黄明辉, 等. 植物基因组 DNA 提取方法的评析与验证[J]. 药品评价, 2004, 1(4): 292.
- [2] 魏志刚, 王艳敏, 杨传平. 松科植物基因组总 DNA 提取方法的比较[J]. 生物技术通讯, 2007, 18(2): 263.
- [3] 邓力超, 邱道寿, 屠乃美, 等. PVP 对烟草基因组 DNA 提取的影响[J]. 广东农业科学, 2009(5): 37.
- [4] 梁景霞, 祁建民, 吴为人, 等. 烟草 DNA 的提取与 SRAP 反应体系的建立[J]. 中国烟草学报, 2005, 11(4): 33.

- [5] 郭兆奎, 万秀清, 魏继承, 等. 适于 PCR 分析的烤后烟叶 DNA 提取方法的研究[J]. 中国烟草科学, 1999(4): 5.
- [6] Sarala K, Rao R V S. Genetic diversity in Indian FCV and burley tobacco cultivars [J]. J of Genetics, 2008, 87(2): 159.
- [7] Gadani F, Ward M, Guo Z K, et al. Report of the COREST task force genetically modified tobacco: detection methods [J]. Coresta Bulletin, 1999(4): 77.
- [8] 马林, 毛华, 李元实, 等. 烤后烟叶 RAPD 反应体系优化研究[J]. 郑州轻工业学院学报: 自然科学版, 2010, 25(1): 1.
- [9] 王齐红, 黄骥, 张红生. 一种快速微量提取植物叶片 DNA 的方法[J]. 生物技术通讯, 2004, 15(5): 479.
- [10] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程[M]. 北京: 科学出版社, 2002: 742-744.
- [11] 黄莹, 高丽美, 张永彦, 等. 一种优化的植物总 DNA 提取方法[J]. 西北作物学报, 2004, 24(6): 1103.
- [12] GB/T 24310—2009, 烟草及烟草制品转基因检测方法[S].

(上接第 58 页)

- [2] Bertrand H, Poly F, Van V T, et al. High molecular weight DNA recovery from soils prerequisite for biotechnological metagenomic library construction[J]. Journal of Microbiological Methods, 2005(62): 1.
- [3] Thakuria D, Schmidt O, Siurtaim M M. Importance of DNA quality in comparative soil microbial community structure analyses [J]. Soil Biology & Biochemistry, 2008(40): 1390.
- [4] 吴敏娜, 张惠文, 李新宇, 等. 提取北方土壤真菌 DNA 的一种方法[J]. 生态学杂志, 2007, 26(4): 611.
- [5] Kirk J L, Beaudette L A, Hart M, et al. Methods of studying soil microbial diversity [J]. Journal of Microbiological Methods, 2004(58): 169.
- [6] Sessitsch, Hackl E, Wenzl P, et al. Diagnostic microbial microarrays in soil ecology [J]. New Phytologist, 2006(171): 719.
- [7] Cao C, Yang M, Xu X J, et al. Technologies of extraction and purification of microbial total DNA from a meadow soil [C]//Remote Sensing Environment and Transportation Engineering (RSETE), Nanjing: IEEE, 2011: 7215-7218.
- [8] Smalla K, Cresswell N, Mendonca Hagler L C, et al. Rapid DNA extraction protocol from soil for polymerase chain reaction mediated amplification [J]. J Appl Microbiol, 1993, 74(1): 78.
- [9] Miller D N, Bryant J E, Madsen E L, et al. Evaluation and

optimization of DNA extraction and purification procedures for soil and sediment samples [J]. Appl Environ Microbiol, 1999, 65(47): 15.

- [10] Volossiorik T, Jane Robb E, Nazar Ross N. Direct DNA extraction for PCR-mediated assays of soil organisms [J]. Appl Environ Microbiol, 1995, 61(11): 3972.
- [11] Agnelli A, Ascher J, Corti G, et al. Distribution of microbial communities in a forest soil profile investigated by microbial biomass soil respiration and DGGE of total and extracellular DNA [J]. Soil Biology & Biochemistry, 2004, 36: 859.
- [12] Hawksworth D L, Rossman A Y. Where are all the undescribed fungi? [J]. Phytopathology, 1997(87): 888.
- [13] Lamontagne M G, Michel Jr F C. Evaluation of extraction and purification methods for obtaining PCR-amplifiable DNA from compost for microbial community analysis [J]. Journal of Microbiological Methods, 2002, 49: 255.
- [14] Zhang Z, Zhang J, Wang Y, et al. Molecular detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* and *Mycosphaerella melonis* in infected plant tissues and soil [J]. FEMS Microbiology Letters, 2005, 249: 39.
- [15] 张瑞福, 曹慧, 崔中利, 等. 土壤微生物总 DNA 的提取和纯化 [J]. 微生物学报, 2003, 43(2): 276.
- [16] Zhou J, Bruns M A, Tiedie J M. DNA recovery from soils of diverse composition [J]. Appl Environ Microbiol, 1996, 62(4): 326.