

一种简单、极快的植物叶片 DNA 提取方法

陈晓军¹, 王敬东¹, 宋海丽², 李树华¹, 樊云芳³

(1.宁夏农林科学院 农业生物技术研究中心, 宁夏 银川 750002;

2.北方民族大学 生物科学与工程学院, 宁夏 银川 750021;

3.宁夏农林科学院 枸杞工程技术研究所, 宁夏 银川 750002)

摘 要:为了满足分子标记辅助育种中基因型鉴定、基因克隆、测序的需要,本研究借用棉签等具吸附功能材料代替移液器,依次直接在 2 种 DNA 提取液中操作,建立了一种简单、快速、环保的水稻叶片 DNA 提取方法。结果表明,提取溶液通过 PCR 扩增,满足基因扩增对模板的要求;同时,对其进行了灵敏度测试,稀释 10^7 倍仍然能够扩增出目标片段;最后通过 PCR、克隆载体连接等分子生物学手段,验证此方法也满足测序的需要。本方法能够在 90 s 内完成植物叶片 DNA 的提取,解决了目前植物基因组 DNA 提取方法需要离心机等昂贵特殊设备、提取步骤繁琐、提取过程中刺激味大、提取时间长等问题,有利于大规模开展分子标记辅助育种中材料基因型的鉴定,具有简单、快速、廉价、环保等优点。

关键词: 简单; 极快; DNA 提取; 水稻

DOI 编码: 10.16590/j.cnki.1001-4705.2018.11.026

中图分类号: S184 文献标志码: A 文章编号: 1001-4705(2018)11-0026-05

A Simple and Rapid Method of DNA Extraction From Plant Leaf

CHEN Xiaojun¹, WANG Jingdong¹, SONG Haili², LI Shuhua¹, FAN Yunfang³

(1.Agricultural Biotechnology Research Center, Ningxia Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Yinchuan Ningxia 750002, China;

2.College of Biological Science and Engineering, North Minzu University, Yinchuan Ningxia 750021, China;

3.Wolfberry Engineering and Technological Institution, Ningxia Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Yinchuan Ningxia 750002, China)

Abstract: In order to meet the needs of genotype identification, gene cloning and sequencing in molecular marker assisted breeding, this study used absorptive function materials such as cotton swabs to replace the pipette and directly operated in two kinds of DNA extraction solution in turn, and established a simple, rapid and environmentally friendly method for DNA extraction in rice leaves. The results showed that the extracted solution could meet the requirement of the template by PCR amplification. At the same time, a sensitivity test was carried out and it showed that the target fragment can be amplified with DNA extraction solution diluted 10^7 times. Finally, molecular biological operations such as PCR and clone vector connection were performed to verify that this method also met the need of sequencing. This method can complete the extraction of plant leaf DNA in 90 seconds, it solves these questions that current plant genomic DNA extraction methods require expensive special equipment such as centrifuges, and extraction steps are tedious, big pungent taste in the process of extraction and long extraction time in the extraction process. It is beneficial to the identification of material genotype in molecular marker assisted breeding on a large scale, it has the advantages of simple, fast, cheap, environmental protection.

Key words: simple; rapid; DNA extraction; rice

收稿日期: 2018-05-08

基金项目: 国家自然科学基金(31460338); 宁夏农林科学院科技创新先导资金项目(NKYJ-17-27); 宁夏农业育种专项(2013 NYYZ 03)。

作者简介: 陈晓军(1977—), 男, 江苏靖江人; 博士, 副研究员, 研究方向: 植物分子生物学; E-mail: smallgene@126.com。

通讯作者: 樊云芳(1981—), 女, 甘肃天水人; 硕士, 副研究员, 研究方向: 枸杞分子生物学; E-mail: majoriefyf@163.com。

DNA 是分子生物学研究的主要对象之一,在植物分子生物学和遗传育种中,基因组 DNA 的质量好坏是影响其成败的关键因素。人们经常需要提取高质量的植物 DNA,用于构建基因文库、基因组 Southern 分析、酶切、克隆和测序等分子生物学实验。根据植物的研究对象、研究目的和研究成本等不同,提取基因组 DNA 所应用的方法也不同。其中,随着作物分子辅助育种的广泛应用与推广,基因型鉴定是最主要的工作,基因组 DNA 的提取则是最繁重、最耗时的工作之一。目前提取基因组 DNA 的方法有:1) CTAB 提取法。此方法多用于禾本科植物基因组 DNA 的提取,是 1987 年 Doyle 最先应用^[1],后来应用改进的 CTAB 法,用特定吸附作用的螯合树脂在特定条件下,吸附、纯化 DNA;2) PVP 提取法。此方法主要应用于林木类植物 DNA 的提取,1997 年 Kim 最先应用此方法提取果树和针叶类林木中高质量的 DNA^[2];3) SDS 提取法。此方法适用于多种植物 DNA 的提取。4) 尿素提取法。此方法适用于一般植物和真核微生物 DNA 的提取,1990 年 Dudler 最先应用此方法^[3-5]。这些方法均用到离心机、提取步骤繁杂、配制化学试剂种类众多、提取过程刺激味大,缺乏高效的、快速、环保的提取植物基因 DNA 的方法。

本研究针对以上基因组 DNA 提取方法存在的不足进行改进,用时大约 90 s 即可完成植物叶片基因组 DNA 的提取,且完全可以满足 PCR 反应的基因型鉴定^[6]、基因克隆和测序等需要。

1 材料与方法

1.1 植物材料

选取 4 mg 水稻新鲜、幼嫩叶片为试验材料。

1.2 主要试剂

植物细胞裂解液(裂解液中 SDS 质量百分比浓度为 0.06%、EDTA 的浓度为 25 mmol/L、NaCl 的浓度为 250 mmol/L、Tris-base 200 mmol/L, pH=8.0); DNA 漂洗液(Tris-base 的浓度为 10 mmol/L、Tween-20 质量百分比浓度为 0.15%); 2×Mixture PCR 扩增试剂盒购自北京擎天生物科技有限公司; DNA Marker DL 2000, 质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒、DH 5 α 感受态均为北京天根生化科技有限公司产品; Peasy-T 载体为北京全式金生物公司产品,其它试剂为分析纯;测序工作由北京擎天生物科技有限公司用 ABI 3730 测序仪完成。

1.3 引物序列与合成

针对水稻 *Actin* 基因设计上下游引物 Actin_ FPrimer, Actin_RPrimer, 预计扩增大小为 459 bp。

针对水稻 *BADH2* 第三外显子片段,扩增片段预计大小为 431 bp。

Actin_FPrimer: TGCTATGTACGTCGCCATC-CA,

Actin_RPrimer: AATGAGTAACCACGCTC-CGTC,

E 3_FP: GGCATATGCGAGCATTTTAT,

E 3_RP: TAGTACCATGCTTGGGTC。

以上引物由上海捷瑞生物公司合成,用去离子水将各引物稀释到 10 μ M 工作浓度。

1.4 植物叶片 DNA 提取

植物叶片 DNA 按以下步骤提取。

1) 水稻叶片提取材料 4 mg, 装入圆底 EP 管中, 加 1 粒直径 4 mm 的钢珠, 将管子浸入液氮中冷却, 待彻底冷却后(2~3 min), 快速用振荡研磨仪(频率 25 次/s, 时间 30 s)将植物组织打碎。

2) 加入植物细胞裂解液 300 μ L, 上下颠倒 5~6 次, 溶液变浑浊, 室温下放置待用, 即得到植物材料 DNA 的粗提液。若无液氮, 可先用小剪刀将叶片尽可能剪碎装入 1.5 mL 尖底 EP 管中, 然后加入 500 μ L 植物细胞裂解液振荡破碎组织。

3) 将干净脱脂棉签浸入步骤二中的 DNA 的粗提液 3 s, 将浸润的棉签迅速在 DNA 漂洗液中轻轻漂洗 3 次, 然后再将其在 100 μ L 去离子水(ddH₂O)或 TE 彻底洗脱 3~5 次, 洗脱过的 ddH₂O 即 DNA 溶液, 可用于下游的分子生物学实验。

1.5 PCR 检测

为了验证所提 DNA 是否满足 PCR 扩增, 选取水稻肌动蛋白基因 *Actin* 设计的上述引物, 预计扩增大小为 459 bp。按照以下 PCR 反应体系配置反应液 20 μ L: 2×Mixture, 10 μ L; Actin-FPrimer, 1 μ L; Actin-BPrimer, 1 μ L; 上述 DNA 溶液 2 μ L; ddH₂O 6 μ L。反应程序为: 预变性 95 $^{\circ}$ C, 5 min; 循环 30 个, 95 $^{\circ}$ C, 30 s; 55 $^{\circ}$ C, 30 s; 72 $^{\circ}$ C, 30 s; 最后延伸 72 $^{\circ}$ C, 10 min。PCR 产物上样量为 10 μ L, 电压 120 V, 4 CM/V; 恒压电泳 30~50 min。

1.6 DNA 灵敏度检测

为了检测其灵敏度, 对所提 DNA 溶液进行了梯度稀释。首先吸取 2 μ L DNA 溶液至 8 μ L 去离子水中, 再从稀释溶液中吸取 2~8 μ L 去离子水, 依次稀释到 10⁷。以上述依次稀释溶液为模板进行 PCR 扩增。

1.7 DNA 测序验证

为了检测此方法所提 DNA 是否满足克隆、测序的需要, 用 E 3_FP, E 3_RP 引物对水稻 *OsBADH2* 基

因的片段进行扩增,预计扩增大小为 431 bp,用胶回收试剂盒将其回收,然后连接 Peasy-T 载体,转化DH 5 α 感受态大肠杆菌,挑取阳性克隆进行测序分析。胶回收步骤、连接体系、转化方法和质粒提取均按试剂盒说明书进行。

2 结果与分析

2.1 植物叶片 DNA 提取

依据以上的提取方法,得到 DNA 粗提液效果见图 1。圆底 EP 管中,溶液呈翠绿色,植物组匀浆彻底,表明使用液氮效果较好。所得 DNA 溶液为 I。无液氮提取效果见图 2。此方法得到的 DNA 粗提溶液较前法较淡,一些叶片组织明显未被破碎。但通过延长破碎时间改善组织破碎效果。所得到 DNA 溶液为 II。

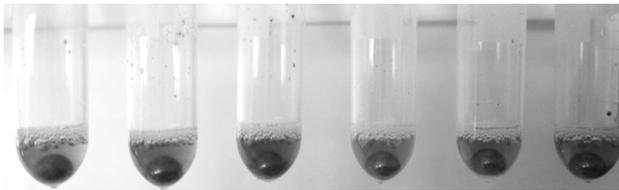


图 1 液氮研磨效果

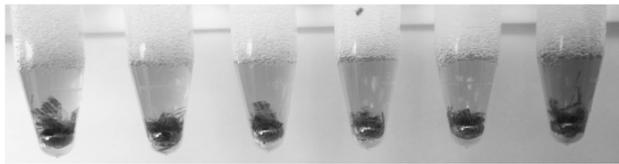


图 2 无液氮研磨效果

2.2 PCR 产物凝胶电泳结果

液氮研磨法和无液氮研磨法 2 种提取方法,分别用水稻 *Actin* 基因的上述引物进行了 PCR,其产物的凝胶电泳分别见图 3 和图 4。两图中均有 459 bp 条带扩增,说明 2 种方法所提 DNA 溶液满足基因扩增的需要。

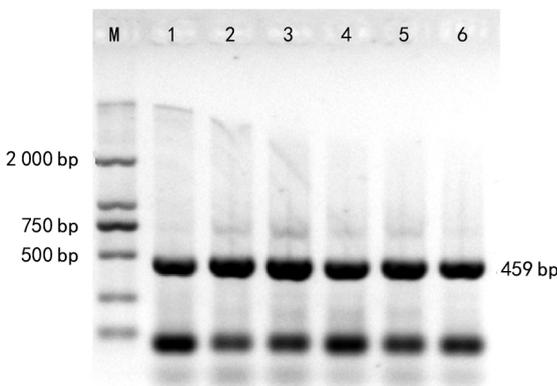


图 3 液氮研磨法 PCR 扩增

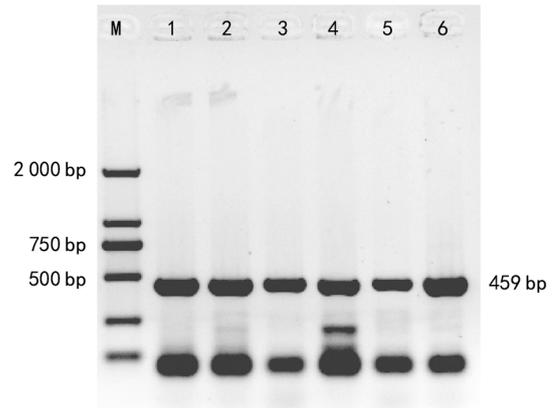


图 4 无液氮研磨法 PCR 扩增

2.3 DNA 溶液的灵敏度检测

以液氮方法提取的 DNA 溶液梯度稀释后作为模板,以水稻 *Actin* 基因设计的引物进行扩增,PCR 产物凝胶电泳见图 5,从左到右稀释倍数依次递增。图中结果表明,此方法提取的 DNA 溶液 1 000 万倍稀释,依然可以进行目的基因的 PCR 扩增。

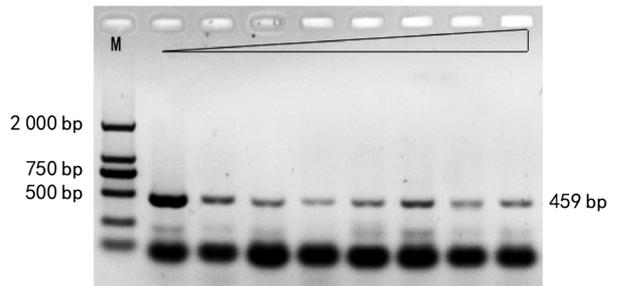


图 5 DNA 溶液灵敏度验证

2.4 目标基因的测序分析

以 E 3_FP, E 3_RP 引物对水稻 *OsBADH2* 基因的片段扩增结果见图 6,扩增片段大小为 431 bp;阳性克隆质粒的测序结果见图 7。测序峰图清晰,经比对完全与参考序列一致,此方法所提 DNA 完全满足基因克隆、测序的需要。

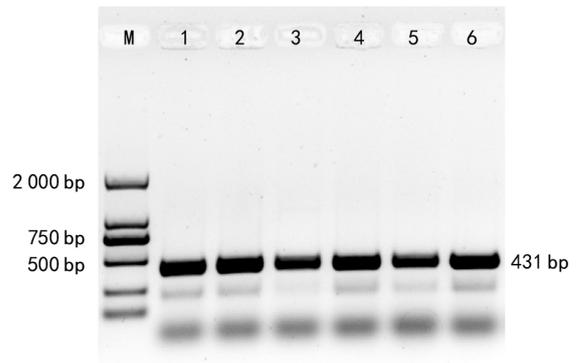


图 6 *OsBADH2* PCR 扩增

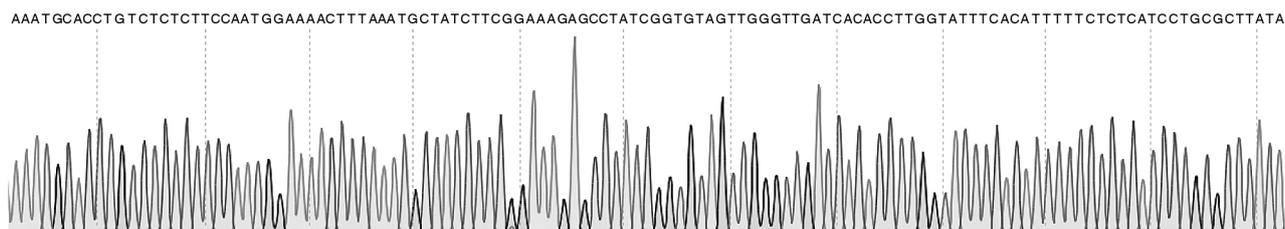


图7 BADH2 测序图

3 结论

本研究以水稻幼苗叶片为试验材料,通过棉签等吸附材料直接提取 DNA,建立了一种简便、快速的 DNA 提取方法,大大加快了分子标记辅助育种中基因型鉴定等繁琐工作。同时,该方法对其它植物,如花生^[28]、铁皮石斛^[29]、青稞^[30]、燕麦^[31]、南瓜^[32]等叶片 DNA 提取有参考价值。

4 讨论

由于植物特有的细胞壁及胞内物质,很难轻易从植物中分离高产量和高质量的 DNA^[6]。在选取材料时,应尽可能的挑取处于生长旺盛期的幼嫩组织。这时组织中蛋白质、多糖及酚类化合物都很少,并且由于细胞多数处于分裂旺盛期,DNA 的产量也会很高,几乎所有的实验手册都推荐以幼嫩组织作为提取基因组 DNA 的首选材料^[8-10]。叶片是十分理想的材料,叶片中维管组织含量少,提取效果较好。本试验中,选用 4 mg 新鲜、幼嫩水稻叶片为材料。通过组织破碎,发现叶片量不是越多越好,材料量适合,组织破碎均匀。圆底 EP 管较尖底 EP 管效果好,钢珠在破碎仪作用下,更能够在狭小的空间中将叶片组织破碎。漂洗液中 Tween 20 的作用主要是清洗杂质。SDS 是离子型表面活性剂,能溶解细胞膜上的脂质与蛋白质,从而破坏细胞膜结构;且能解聚细胞中的核蛋白,使蛋白质变性而沉淀下来。增大提取缓冲液中 SDS 的含量,有助于去除糖类和酚类物质^[11-14]。本实验中,没有使用 RNAase I 去除 DNA 溶液中的 RNA,这对基于 PCR 的基因型鉴定没有影响。本试验中的棉签可以用滤纸等具有吸附作用的材料代替,作者用少量 Whatman G/A 玻璃纤维滤纸固定在牙签头上,使用本方法提取步骤同样获得可以直接用于 PCR 扩增的 DNA。对于提取其他植物叶片组织或者其它组织 DNA 及其下游基因克隆等分子生物学操作,同样可以借鉴本方法^[15-27]。

参考文献:

[1]Doyle,J.J.;Doyle,J.L.A rapid DNA isolation procedure for

small quantities of fresh leaf tissue[J].Phytochem Bull., 1987,19:11-15.

[2]Kim CS, Lee CH, Shin JS, Chung YS, Hyung NI A simple and rapid method for isolation of high quality genomic DNA from fruit trees and conifers using PVP.Nucl Acids Res, 1997,25:1 085-1 086.

[3]思彬彬,张超,徐如宏,等.小麦基因组 DNA 改良提取方法的探讨[J].山地农业生物学报,2005,24(2):142-145.

[4]韩玉杰,贾炜珑,王自霞,等.几种提取植物 DNA 方法的比较[J].山西农业科学,2008,36(7):17-19.

[5]卢振宇,李明顺,谢传晓,等.玉米叶片 DNA 快速提取方法改进研究[J].玉米科学,2008,16(2):50-53,55.

[6]SM Xalxo, RR Saxena, V Pali, et al.A Rapid and Low Cost Method of Dna Isolation for Marker Assisted Selection in Rice[J].Agricultural Research,2014,3(1):83-86.

[7]J Sudan, M Raina, R Singh, et al.A Modified Protocol for High-quality Dna Extraction From Seeds Rich in Secondary Compounds[J].Journal of Crop Improvement,2017,31(5):637-647.

[8]戴剑,洪德林,张大栋,等.一种快速高效的 DNA 提取方法研究[J].麦类作物学报,2011,31(3):437-442.

[9]孙林静,马忠友,苏京平,等.一种简单快速的 DNA 提取方法在水稻上的应用[J].天津农学院学报,2007,14(3):1-4.

[10]黄莹,高丽美,张永彦,等.一种优化的植物总 DNA 提取方法[J].西北植物学报,2004,24(6):1 103-1 106.

[11]杜金子,陈丽梅,黄荣韶,等.改良 SDS 法提取石韦基因组 DNA 的研究[J].西南农业学报,2009,22(3):754-758.

[12]郝会海,李燕玲,杜志军,等.利用简化的 SDS 法提取杨树基因组 DNA[J].河北林果研究,2006,21(4):363-366.

[13]刘龙洲,曲延英,姚源松,等.三种玉米 DNA 提取方法探究[J].新疆农业大学学报,2003,26(1):31-33.

[14]王景雪,孙毅,高武军.一种简便实用的植物总 DNA 提取方法[J].山西大学学报(自然科学版),2000,23(3):271-272.

[15]肖婷婷,朱艳,叶波平,等.鸢尾属药用植物总 DNA 提取方法的比较研究[J].中国野生植物资源,2010,29(3):46-50.

[16]姜玲,蔡礼鸿.一种提取银杏中 DNA 的方法[J].植物生理学通讯,2000,36(4):340-342.

[17]乔玉山,章镇,沈志军.中国李基因组 DNA 提取方法的优化[J].上海交通大学学报(农业科学版),2004,22(2):138-142.

(下转第 34 页)

- class[J].Seed Science Research,2005,15(4):357-360.
- [6]青格乐,王玉芝,张琼琳,等.植物种子休眠及破除方法研究进展[J].安徽农业科学,2013,41(11):4 715-4 716,4 719.
- [7]王正亮.破除植物种子休眠方法研究进展[J].中国农资,2014(8):172.
- [8]李旭.种子休眠类型及其破除方法[J].现代农业科技,2016(22):57.
- [9]宣景宏,张春艳,孟宪军,等.悬钩子属植物种质资源开发利用研究进展[J].北方园艺,2006(5):61-63.
- [10]韩加,刘继文.悬钩子属植物生物学作用研究进展[J].中国野生植物资源,2009,28(2):1-4.
- [11]陈炳华,刘剑秋.食品添加剂和金属离子对高粱泡红色素稳定性的影响[J].亚热带植物科学,2001,30(3):16-21.
- [12]李海燕,王小敏,李维林,等.高粱泡组织培养技术[J].经济林研究,2010,28(1):51-55.
- [13]李维林,贺善安,顾烟.中国悬钩子属植物的利用价值概述[J].武汉植物学研究,2000,18(3):237-243,246.
- [14]闫翠香,丁新泉,宋闪闪,等.悬钩子属植物种子休眠及其解除方法探讨[J].种子,2014,33(3):55-58.
- [15]MARBACH I, MAYER A M. Permeability of seed coats to water as related to drying conditions and metabolism of phenolics[J]. Plant Physiology, 1974, 54(6): 817-820.
- [16]段修安,王仕玉,朱映安.不同化学药剂处理对树莓种子发芽率和幼苗株高的影响[J].云南农业大学学报(自然科学版),2007,22(3):456-458.
- [17]WADA S, REED B M. Standardizing germination protocols for diverse raspberry and blackberry species [J]. Scientia Horticulturae, 2011, 132(4): 42-49.
- [18]张春红,闫连飞,吴文龙,等.药剂处理对悬钩子类种子萌发的影响[J].中国南方果树,2015,44(1):66-68.
- [19]张春红,胡淑英,吴文龙,等.不同处理方式对黑莓‘Kiowa’种子发芽的影响[J].林业科技开发,2012,26(3):29-33.
- [20]龚娜,魏永祥,杨凤英,等.酸处理对黑莓、‘早红’树莓种子发芽的影响[J].北方果树,2008(5):10-11.
- [21]王学勇,张均营.树莓和黑莓的研究进展[J].安徽农业科学,2010,38(10):5 070-5 073.
- [22]NIKOLAEVA M G. Factors controlling the seed dormancy pattern. In KHAN, A A. (Ed.) The physiology and biochemistry of seed dormancy and germination. Amsterdam, North-Holland, 1977: 51-74.
- [23]NIKOLAEVA M G, RASUMOVA M V, GLADKOVA V N. Reference book on dormant seed germination. DANILOVA M F. (Ed.). Leningrad, ‘Nauka’ Publishers (in Russian), 1985.
- [24]GUBLER F, MILLAR A A, JACOBSEN J V. Dormancy release, ABA and pre-harvest sprouting [J]. Current Opinion in Plant Biology, 2005, 8(2): 183-187.
- [25]DENG Z J, CHENG H Y, SONG S Q. Effects of temperature, scarification, dry storage, stratification, phytohormone and light on dormancy-breaking and germination of *Cotinus coggygria* var. *cinerea* (Anacardiaceae) seeds [J]. Seed Science and Technology, 2010, 38(3): 572-584.

~~~~~  
(上接第 29 页)

- [18]徐宝利,毛娟,丁永胜,等.核果类果树基因组 DNA 提取方法的研究[J].甘肃农业大学学报,2006,41(6):49-54.
- [19]H Liang, Y Deng, C Wang, et al. A high-throughput DNA extraction method from rice seeds [J]. Biotechnology & Biotechnological Equipment, 2016, 30(1): 32-35.
- [20]姜丽媛,臧德奎,李文清,等.野生玫瑰基因组 DNA 提取及 CDDP 引物筛选[J].山东农业科学,2016,48(11):13-17.
- [21]王钰婷,李瑞雪,王伟,等.安徽桑树品种全基因组 DNA 提取方法研究[J].农学学报,2016,6(11):64-66.
- [22]陈芸,高原青,王继莲,等.不同保存方法对石榴成熟叶片基因组 DNA 提取效果的影响[J].北方园艺,2016(8):100-103.
- [23]张道微,张超凡,董芳,等.甘薯薯块 DNA 提取方法研究[J].湖南农业科学,2016(4):5-7.
- [24]周海兰,李绍鹏,李卫亮,等.油梨基因组 DNA 提取、SSR-PCR 反应体系优化及引物筛选[J].生物技术通报,2016,32(4):143-150.
- [25]王占军,李娇娇,张家效,等.黄山木兰叶片基因组 DNA 提取方法的比较研究[J].分子植物育种,2016,14(3):660-666.
- [26]何克勤,李艳阳,胡能兵,等.基于分子标记稳定性的甜叶菊组培苗 DNA 提取方法优化[J].分子植物育种,2016,14(2):396-402.
- [27]程文,夏正俊,冯献忠,等.一种快速、无损大豆种子 DNA 提取方法的建立和应用[J].植物学报,2016,51(1):68-73.
- [28]王亮,杨鑫雷,GETAHUN Addisu,等.栽培种花生 AFLP 标记体系的优化及多态性引物筛选[J].核农学报,2017,31(11):2 087-2 095.
- [29]付涛,胡仲义,何月秋,等.铁皮石斛 EST-SSR 分子标记的开发[J].核农学报,2017,31(4):663-670.
- [30]张鹏飞,牟利,李鹏,等.青稞 *OMT1* 基因克隆及原核表达分析[J].核农学报,2017,31(12):2 314-2 322.
- [31]张胜博,刘景辉,赵宝平.燕麦 *AsKUP1* 的克隆与功能分析[J].核农学报,2017,31(6):1 061-1 069.
- [32]陈学进,郭卫丽,姜立娜,等.南瓜 DNA 提取方法比较分析[J].中国瓜菜,2018,31(1):17-19.