文章编号: 1008-1542(2008)01-0027-03

高质量冬青卫矛 DNA 提取方法

张春晓, 张 莹

(河北科技大学生物科学与工程学院, 河北石家庄 050018)

摘 要: 为了从富含多酚和多糖的冬青卫矛叶片中分离高质量基因组 DNA, 比较了 SDS 法、CTAB 法、高盐低 pH 值法及改良的 CTAB 法等提取 DNA 的方法, 获得了一种以 CTAB 法为基础的分离高质量完整 DNA 的简便、快速方法。结果表明, 使用该方法从冬青卫矛叶片中分离得到高纯度、高产量的 DNA, A_{260}/A_{280} 为 1.84, 1 g 鲜叶的 DNA 产量为 213.5 μg, 表明该方法可有效地从富含多酚和多糖的药用植物组织中提取高质量 DNA。

关键词: 冬青卫矛; DNA 提取; 改良 CTAB 法

中图分类号: Q783.1 文献标识码: A

Isolation method for high quality genomic DNA of *Euonymus japonica* Thunb

ZHANG Chun-xiao, ZHANG Ying

(College of Bioscience and Bioengineering, Hebei University of Science and Technology, Shijiazhuang Hebei 050018, China)

Abstract: To obtain high quality genomic DNA from *Euonymus japonica* Thunb, different DNA isolation methods were studied. A modified CTAB DNA extraction method was got by comparing different methods, such as SDS method, CTAB method, high salt low pH method and modified CTAB method. The results show that isolated DNA possesses the characters of high purity (A_{260}/A_{280} is 1.84) and high yield (213.5 μg/g fresh leaves). So the method can isolate DNA effectively from hydroxybenzene and sugar abundant medicinal materials.

Key words: *Euonymus japonica* Thunb; DNA issolation; modified CTAB method

冬青卫矛(*Euonymus japonica* Thunb)又称大叶黄杨, 是卫矛科 (*Celastraceae*) 卫矛属(*Euonymus Linn*) 常绿灌木和小乔木树种, 常用于园林绿化[1]。卫矛属植物含有黄酮类、生物碱类、萜类等化学成分, 具有抗肿瘤、抗炎、免疫调节、降血糖等多种药理活性, 而且还有耐缺氧、杀虫、预防和治疗性传播疾病等功效, 在运动医学、保健医学和植物保护等方面都具有十分重要的意义[2], 因此通过提取其基因组 DNA 用以克隆黄酮类、生物碱类合成的关键酶基因已成为科学研究中的常用方法。植物 DNA 提取方法很多, 如 CTAB 法、SDS 法、氯化苄法、高盐低 pH 值法、果胶酶法等[3], 但不同植物材料的组分各异, 一些模式植物的 DNA 提取方法并不适用于所有植物。冬青卫矛叶片含有较厚的角质层, 细胞内含有大量的多糖、多酚等次生代谢物, 影响 DNA 的产量及质量。笔者以冬青卫矛为研究材料, 采用多种 DNA 提取方法并进行适当的改进, 探索适宜提取冬青卫矛 DNA 的方法, 为取得适于分子遗传分析和分子生物学研究的高质量冬青卫矛基因组 DNA 奠定基础。

收稿日期: 2007-05-30; 修回日期: 2007-10-18; 责任编辑: 李 穆

基金项目: 河北科技大学校立基金资助项目(QD200416, XL2006053)

作者简介: 张春晓(1971-), 女, 河北安国人, 副教授, 博士, 主要从事植物分子生物学方面的研究。

1 材料与方法

1.1 实验材料

冬青卫矛幼嫩叶片, 采自河北科技大学校园内。

乙二胺四乙酸钠(EDTA·Na2)、三羟甲基氨基甲烷(Tris)、硼酸、十二烷基磺酸钠(SDS)、十六烷基三乙基溴化铵(CTAB)、氯仿、异戊醇、Tris 饱和酚等, 均为国内厂家生产。DNA 标准分子质量和 *Eco*R iv酶为 Takara 产品。

1.2 DNA 提取方法

采用 5 种 DNA 提取方法提取冬青卫矛叶片基因组 DNA, 分别是 SDS 法[4]、CTAB 法[5]、高盐低 pH 值法[6]、CTAB-A 处理法和 CTAB-B 处理法。CTAB-A 处理法是在 CTAB 法的基础上, 改变细胞提取液中 β-巯基乙醇的质量分数, 设为 3 个水平, 分别为 2%, 4% 和 6%。CTAB-B 处理法是当细胞提取液中 β-巯基乙醇质量分数为 4% 时, 将 65 ℃恒温水浴时间设为 3 个水平, 分别是 40, 60, 80 min, 其他操作程序同 CTAB 法, 即 12 000 r/min, 离心 10 min; 取上清液加入等体积的氯仿/异戊醇(24/1, 体积比), 12 000 r/min 离心 10 min; 取上清液加入等体积 0 ℃异丙醇, 12 000 r/min 离心 10 min, 沉淀用无菌水溶解。

1.3 DNA 检测方法

琼脂糖凝胶电泳检测法, 将提取的 DNA 样品点样于 0.8%(质量分数) 琼脂糖凝胶上, 在 5 V/cm 的电压下, 采用 DYY-6B 稳压稳流电泳仪进行电泳, 电泳时间为 1.5 h, 电泳结束后在 AITM-26(Alpha 公司) 凝胶成像仪上观察和拍照。

紫外分光光度计法, 将提取的 DNA 稀释 10^3~ 10^4 倍, 在 UV-2000 型紫外分光光度计上分别测定 260 nm 和 280 nm 下的光吸收值(A), 计算 A_{260}/A_{280} 的比值以判断 DNA 提取质量[7]。

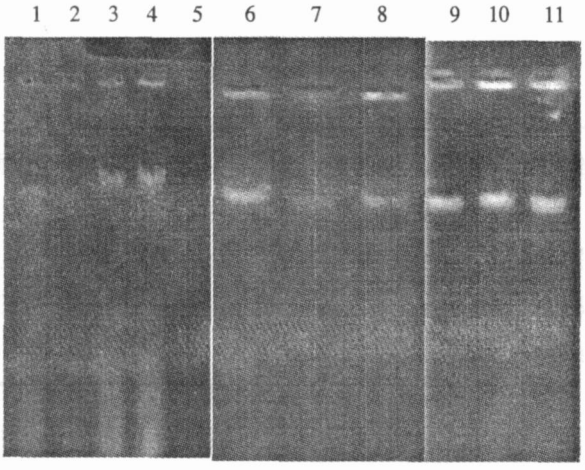
1.4 限制性内切酶酶切分析方法

将 10 μg 基因组 DNA 样品在 50 μL 反应体系中, 1 μg *Eco*R iv用 5 U 于 37 ℃进行过夜酶切, 酶切产物用 0.8% (质量分数) 琼脂糖凝胶电泳(电压为 1 V/cm) 分离, 并在 AITM-26 凝胶成像仪上观察和拍照。

2 结果与分析

2.1 凝胶电泳检测结果

采用 5 种 DNA 提取方法获得的冬青卫矛总 DNA 结果见图 1。从图 1 中可看出, 高盐低 pH 值法(泳道 5) 不适于冬青卫矛 DNA 提取, 肉眼未分辨出 DNA 电泳条带。SDS 法(泳道 1-2) 提取得到的 DNA 所含杂质较少, 但 DNA 产量很低, DNA 条带稍稍能看清。而 CTAB 法获得的 DNA 产量较高, 但点样孔中有残留杂质. 获得的 DNA 呈浅褐色. 说明多酚类等物质去除不完全(泳道 3—4)。CTAB-A 处理法(泳道 6—8) 结



泳道 1—泳道 2—SDS 法;泳道 3—泳道 4—CTAB 法;泳道 5—高盐低 pH 值法;泳道 6—泳道 8—CTAB-A 处理法(β-巯基乙醇质量分数分别为 2%,4%和 6%);泳道 9—泳道 11—改良 CTAB-B 处理方法(保温时间分别为 40,60 和 80 min)

图 1 不同方法提取冬青卫矛基因组 DNA 的电泳图

Fig. 1 DNA electrophoresis of different DNA extraction methods

果表明,细胞提取液中 β-巯基乙醇质量分数为 2% (泳道 6)时,杂质去除不彻底;当 β-巯基乙醇质量分数达到 4%(泳道 7—8)时,能有效地避免细胞中多酚类物质的干扰,获得的 DNA 颜色透明,纯度高。CTAB-B 处理法(泳道 9- 11)结果表明,保温时间为 40 min 时(泳道 9),获得的 DNA 纯度高,DNA 条带亮度高。当延长保温时间至 60 min 和 80 min(泳道 10 和泳道 11),获得的 DNA 产量虽有所增加,但点样孔中有杂质滞留,使其纯度略有下降。

2.2　紫外吸收检测结果

DNA 的紫外分光光度计测定分析结果见表 1,其与凝胶电泳检测结果一致。高盐低 pH 值法(序号 5)未能得到其 A_{260}/A_{280} 值,进一步说明该方法不适于冬青卫矛 DNA 的提取。SDS 法(序号 1- 2)提取得到的 DNA 所含杂质较少,A_{260}/A_{280} 在 1.7~ 1.8 之间,但 DNA 产量低,平均 1 g 鲜叶中为 106.81 μg。而 CTAB 法获得的 DNA 产量较高,平均 1 g 鲜叶中为 181.69 μg,但所含杂质较多,A_{260}/A_{280} 低于 1.7,获得的 DNA 呈浅褐色,说明多酚类等物质去除不完全。

CTAB-A 处理法结果表明(泳道 6- 8),细胞提取液中 β-巯基乙醇质量分数为 2% (序号 6)时,杂质去除不彻底,A_{260}/A_{280} 值为 1.70(见表 1);当 β-巯基乙醇质量分数达到 4% 时,能有效地避免细胞中多酚类物质的干扰,获得的 DNA 颜色透明,纯度高;A_{260}/A_{280} 值约为 1.82,说明杂质去除完全,DNA 产量也较高,1 g 鲜叶中 DNA 产量约为 200 μg。CTAB-B 处理法结果表明,保温时间为 40 min(序号 9)时,获得的 DNA 纯度高,A_{260}/A_{280} 值为 1.81(见表 1),产量高,1 g 鲜叶中 DNA 产量为 217.50 μg。当延长保温时间至 60 min 和 80 min(序号 10 和序号 11),获得的 DNA 产量虽有所增加,但纯度略有下降。

表 1　不同方法提取冬青卫矛基因组 DNA 的 A_{260}/A_{280} 值和 DNA 产量

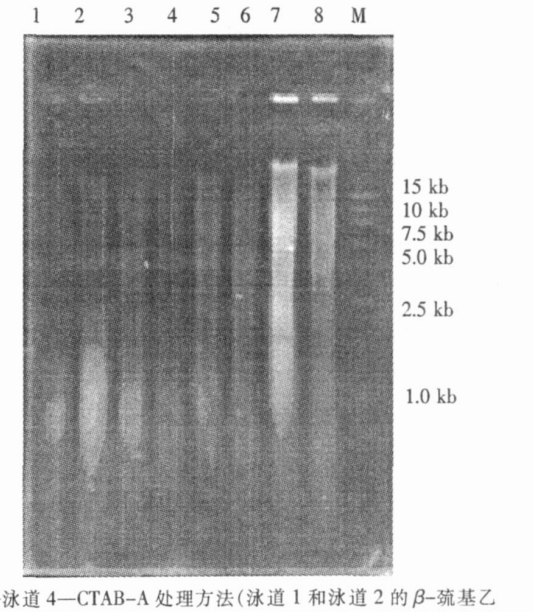
Tab. 1　A_{260}/A_{280} value and DNA yield by different DNA extraction methods

序号	A_{260}/A_{280}	1 g 鲜叶中 DNA 产量/μg
1	1.71	102.37
2	1.77	111.25
3	1.68	180.88
4	1.65	182.50
5	-	-
6	1.70	198.13
7	1.82	201.88
8	1.84	203.13
9	1.81	217.50
10	1.76	211.88
11	1.76	211.25

注:序号 1- 11 与图 1 中的泳道序号一致

2.3　限制性内切酶酶切分析

以改良的 CTAB 法提取冬青卫矛基因组 DNA 为模板,用限制性内切酶 *Eco*R iv 酶切(见图 2)。酶切产物均一,说明酶切反应彻底。由此说明该方法提取的 DNA 质量较好,可以用于 Southern blot 分析。



泳道 1—泳道 4—CTAB-A 处理方法(泳道 1 和泳道 2 的 β-巯基乙醇质量分数为 4%,泳道 3 和泳道 4 的 β-巯基乙醇质量分数为 6%);泳道 5—泳道 8—CTAB-B 处理方法(泳道 5 和泳道 6 保温时间为 40 min,泳道 7 和泳道 8 保温时间为 80 min)

图 2　DNA 酶切电泳图

Fig. 2　DNA digested by *Eco*R iv

3　讨　论

许多学者对植物中多酚类化合物和多糖物质对于 DNA 质量的影响进行过研究[8,9],CTAB 法既可裂解细胞,又能有效地沉淀多糖,是最常采用的植物 DNA 提取方法[9],一般对于新鲜的植物材料采用加入 β-巯基乙醇防止多酚类物质的氧化[10],但是浓度过高,上清液黏度太大,导致转移上清液时困难。因此,在能够防止酚类物质氧化的前提下,应使用最低浓度。本研究结果表明,β-巯基乙醇质量分数为 4% 时即有较好的结果,获得的 DNA 颜色透明,纯度高(A_{260}/A_{280} 值约为 1.82),产量高(1 g 鲜叶中约含 200 μg)。当加入的抗氧化剂含量

(下转第 43 页)

```
hDevice = CreateFile ("\\\\.\\Oneusb", GENERIC_READ | GENERIC_WRITE ,
    FILE_SHARE_READ | FILE_SHARE_WRITE , NULL , OPEN_EXIST2ING,
    FILE_ATTRIBUTENORMAL, NULL) ;
```

DeviceIoControl() 函数用来读写设备控制, 应用程序以不同的参数调用该函数来控制设备, 以完成应用程序和驱动程序之间数据交换的功能。

CloseHandle() 是通过设备句柄关闭设备, 请求完成之后一定要记得关闭设备。

本应用程序中用到的设备控制请求代码(dwIoControlCode) 如下:

1) IOCTL_EZUSB_GET_PIPE_INFO(获取端点信息);
2) IOCTL_EZUSB_GET_DEVICE_DESCRIPTOR(获取设备描述符);
3) IOCTL_EZUSB_ANCHOR_DOWNLOAD(固件下载请求);
4) IOCTL_ EZUSB_VENDOR_REQUEST(供应商自定义请求代码);
5) IOCTL_EZUSB_BULK_READ(块读取)。

4 结　语

在简单介绍了高速数据采集卡硬件组成的基础上, 结合实际应用, 着重介绍了数据采集系统中核心器件 CY7C68013A 固件程序的设计方法和固件程序的实现。实践证明, 笔者所设计的高速数据采集卡采样精度高、传输速度快、可靠性能好, 同时还具有 USB 设备体积小、使用方便等特点。

参考文献:

[1] 张　弘. USB 接口设计[M]. 西安: 西安电子科技大学出版社, 2002.
[2] 王金英, 王震洲, 刘教民. 决策树算法在智能断路器中的应用[J]. 河北科技大学学报, 2006, 27(4): 302-305.

(上接第 **29** 页)

足以抑制酚类物质氧化时, 随着保温时间的延长, 细胞破裂更为彻底, 所获得的 DNA 质量有所增加[5], 但时间太长, 随之还产生了更多的糖和蛋白, 使更多的 DNA 降解, 可见保温时间并不是越长越好。

参考文献:

[1] 刘秋元, 赵　杰, 刘文元. 冬青卫矛的研究[J]. 河南林业科技, 2003, 23(2): 6-7.
[2] 刘　露, 罗杰英. 卫矛属植物化学成分及药理活性的研究概况[J]. 中南药学, 2005, 3(3): 170-172.
[3] 张　宁, 王凤山. DNA 提取方法进展[J]. 中国海洋药物, 2004, (2): 40-46.
[4] 魏　群. 分子生物学实验指导[M]. 北京: 北京高等教育出版社, 1999.
[5] 王传堂, 黄　粤, 杨新道, 等. 改良 CTAB 法和高盐低 pH 值法提取花生 DNA 的效果[J]. 花生学报, 2002, 31(3): 20-23.
[6] 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.
[7] SAMBROOK J, FRITSCH E F, MANIATIS T. Molecular Cloning: A Labortory Manual [M]. 2nd ed. London: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
[8] GREEN M J, THOMPSON D A, MACKENZIE D J. Easy and efficient DNA extraction from woody plants for the detection of phytoplasmas by polymerase chain reaction [J]. Plant Disease, 1999, 83: 482-485.
[9] KIM C S, LEE C H, SHIN J S, et al. A simple and rapid method for isolation of high quality genomic DNA from fruit trees and conifers using PVP [J]. Nucleic Acids Res, 1997, 25: 1 085-1 086.
[10] 李晓波, 冯　波, 张朝晖, 等. 植物药材总 DNA 提取[J]. 中草药, 2002, 33(7): 652-654.

《河北科技大学学报》期刊五年影响因子达 0.476

根据《2007 年版中国期刊高被引指数》所给出的统计数据显示,《河北科技大学学报》的期刊五年影响因子已达 0.476, 位居河北省高校主办期刊第二。影响因子是世界上普遍公认的期刊评价的客观指标, 该指标越高, 一般来说, 则反映期刊的社会影响力也就越大。

(本刊编辑部)