

# 一种改良的转基因甘蔗基因组 DNA 提取方法

姚伟\* 耿广良\*\* 余爱丽 张木清 陈如凯\*

(福建农林大学, 农业部甘蔗生理生态与遗传改良重点开放实验室, 福建福州 350002)

**摘要:** 用改良的转基因甘蔗基因组 DNA 提取方法可从少量的转基因甘蔗叶片中简便快速地提取高质量的 DNA, 有效地去除甘蔗叶片中的多糖、多酚类和 RNA 等物质。经核酸蛋白测定仪及凝胶电泳分析表明, 该改良方法提取的 DNA 具有典型的 DNA 分子标准紫外吸收光谱特点, 其  $A_{260}/A_{280}$  为 1.7-1.9,  $A_{260}/A_{230}$  为 1.8-2.0, 叶片的 DNA 产量为  $45-60 \mu\text{g} (100 \text{mg})^{-1}$ , 适用于对转基因甘蔗进行 PCR、酶切和 Southern 杂交检测分析。

**关键词:** 转基因; 甘蔗; DNA 提取

中图分类号: Q781

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2004)03-0257-04

## An Improved Method for Isolation of Transgenic Sugarcane Genomic DNA

YAO Wei\* GENG Guang-liang YU Ai-li ZHANG Mu-qing CHEN Ru-kai\*

(Key Lab of Eco-physiology & Genetic Improvement for Sugarcane, Ministry of Agriculture, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

**Abstract:** The improved method for isolation of transgenic sugarcane genomic DNA could rapidly and simply extract high quality DNA from a few leaves of transgenic sugarcane. The isolated DNA is essentially free of polysaccharides, polyphenols, RNA and other major contaminants. Ultraviolet absorbance spectrum analysis and gel electrophoresis results showed that DNA samples obtained by the method possessed the standard ultraviolet absorbance spectrum of pure DNA, with 1.7-1.9  $A_{260}/A_{280}$  and 1.8-2.0  $A_{260}/A_{230}$ . The yield was about  $45-60 \mu\text{g}$  DNA per 100 mg young leaves. The total DNA prepared by this procedure could be used for PCR, restriction enzyme digestion and southern blotting.

**Key words:** Transgene; Sugarcane; DNA extraction

提取高质量的 DNA 是进行植物基因组研究的基础, 也是对植物遗传转化后代进行分子鉴定的前提。目前国内外关于提取 DNA 的方法很多<sup>[1-9]</sup>, 但因研究的对象和目的不同而有所差异。由于甘蔗含有大量的多酚类和多糖等有机物质<sup>[1]</sup>, 按照常规方法提取基因组 DNA 所需时间长、产量小、纯度低。本研究在前人研究的基础上<sup>[13]</sup>, 对所用药品及技术进行改进, 摸索出一套快速、简便且可获得高质量基因组 DNA 的改良方法。该方法约需 1 h 即可完成甘蔗基因组 DNA 的提取, 一个人每天可以提取 100 份, 样

品用量仅为 100 mg, 产量可达  $45-60 \mu\text{g} (100 \text{mg})^{-1}$ , 适用于进行甘蔗大量遗传转化后代的分子鉴定和甘蔗基因组的分析。

### 1 材料和方法

**材料** 供试材料为本实验室的果蔗 Badila (*Saccharum officinarum* L.) 抗性转化幼苗, 取其中 5 个株系的幼嫩叶片, 用脱脂棉沾取 70% 无水乙醇擦去表面灰尘, 放置保鲜袋中, 黑暗处理 24 h 后备用。

收稿日期: 2003-12-15 接受日期: 2004-03-15

基金项目: 国家“863”计划课题糖料新品种选育(2001AA241191)资助

\* 通讯作者 Corresponding author

\*\* 现单位: 山东省金乡县第三中学生物学教研室

**基因组 DNA 提取** 称取稍嫩的叶片 100 mg, 剪碎后放入 2.0 ml 的 Eppendorf 管中, 在液氮处理下, 用洁净的玻璃棒迅速研成粉末状。加入 800  $\mu$ l 65 $^{\circ}$ C 预热的 CTAB 提取缓冲液 [100 mmol/L Tris-HCl, 20 mmol/L 乙二胺四乙酸 (EDTA, Ethylene diamine tetraacetic acid), 1.5 mol/L NaCl, 3% 十六烷基三甲基溴化铵 (CTAB, Hexadecyltrimethylammonium bromide), 0.1% 亚硫酸钠, pH8.0], 翻转离心管, 使叶片粉末与提取缓冲液充分混匀后, 依次加入 200  $\mu$ l 18% 聚乙烯吡咯烷酮 (PVP, Polyvinylpyrrolidone), 200  $\mu$ l 6% 月桂酰肌氨酸钠, 200  $\mu$ l 10% CTAB, 100  $\mu$ l 无水乙醇, 翻转数次, 充分混匀后, 置于 65 $^{\circ}$ C 恒温水浴中, 每隔 5 min 翻转离心管数次, 20 min 后取出离心管自然冷却至室温。6 000 $\times$ g 离心 2 min, 吸取上层清液, 加入等体积的酚: 氯仿: 异戊醇 (25: 24: 1) 混匀, 在室温下 8 000 $\times$ g 离心 5 min, 转移上层清液至另一新的 Eppendorf 管中, 加入等体积冰预冷的异丙醇, 轻轻混匀。-20 $^{\circ}$ C 下放置 10 min, 使 DNA 充分缠绕成团。在室温下 4 000 $\times$ g 离心 2 min, 尽弃上层液, 后用 70% 的乙醇洗涤二次, 在真空浓缩仪中将 DNA 沉淀抽干。最后加入 100  $\mu$ l TE 缓冲液 (10 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA, pH 8.0) 充分溶解 DNA 沉淀, -20 $^{\circ}$ C 下贮存备用。生化试剂均购自上海生工生物工程有限公司。

**分光光度法** 采用 Pharmacia Biotech 公司的 Ultrospec 2100 分光光度计, 以灭菌无离子水为对照, 测定 DNA 样品的吸光值  $A_{230}$ 、 $A_{260}$  和  $A_{280}$  和 DNA 浓度。用  $A_{260}/A_{280}$ 、 $A_{260}/A_{230}$  比值分析 DNA 质量。

**琼脂糖电泳** 取 3  $\mu$ l 基因组 DNA, 以 Lambda DNA/*EcoR* I+*Hind* III 为 Marker, 在 0.8% 琼脂糖凝胶上以 5 V  $\text{cm}^{-1}$  的电压电泳 30 min。然后在法国 VL 公司的 BIO-PROFIL 凝胶成像系统上紫外照相, 根据条带亮度粗略判定 DNA 的浓度, 同时

判别 RNA 和蛋白质是否除尽。

**PCR 分析** 反应体系 25  $\mu$ l: 10 $\times$ PCR 缓冲液 2.5  $\mu$ l, 25 mmol/L  $\text{Mg}^{2+}$  2.0  $\mu$ l, 10 mmol/L dNTPs 0.5  $\mu$ l, 50 ng  $\mu$ l $^{-1}$  DNA 模板 1  $\mu$ l, 10  $\mu$ mol/L 的上、下游引物各 0.5  $\mu$ l, 5 U  $\mu$ l $^{-1}$  Taq 聚合酶 0.5  $\mu$ l, 加水定容至 25  $\mu$ l。反应循环程序: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 58 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 90 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min; 保持在 4 $^{\circ}$ C。PCR 产物在 2% 琼脂糖凝胶上以 5 V  $\text{cm}^{-1}$  的电压电泳 40 min。

**酶切和 Southern 杂交** 用 *EcoR* I 和 *Pst* I 对甘蔗基因组 DNA 进行酶切, 37 $^{\circ}$ C 下过夜反应。同时以目的基因酶切片断制作探针, 按照 DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I 说明书对 PCR 检测呈阳性的植株进行 Southern 杂交检测。

## 2 结果和分析

### 2.1 转基因甘蔗基因组 DNA 质量及含量分析

用该方法提取的转化甘蔗植株基因组 DNA 质量及含量见表 1。在 DNA 提取过程中, 主要的污染物为 RNA、蛋白质和多糖等,  $A_{260}/A_{280}$  比值可以反映出所提取的 DNA 样品的纯度, 纯净的 DNA 的  $A_{260}/A_{280}$  为 1.8, 如果样品中含有蛋白质等其他成分, 会使  $A_{260}/A_{280}$  比值下降。从表 1 的分析结果来看, 该方法提取的 DNA 纯度和产量都比较高。经 DNA 电泳分析, 该方法提取的 DNA 比较完整、无降解、RNA 污染少 (图 1、图 2)。

### 2.2 PCR 和 Southern 杂交分析

以改良方法提取的转化甘蔗基因组 DNA 经稀释后作为模板进行 PCR, 设立阳性对照 (转化基因质粒载体) 和阴性对照 (未转化的甘蔗植株基因组 DNA), 可以获得清晰的目标基因扩增片段, 结果稳定、无杂带 (图 3)。经限制性内切酶消化后, 可获得较好的酶切结果 (图 4)。同时用 PCR 检测阳性的

表 1 改良方法所制备的甘蔗基因组 DNA 质量及含量

Table 1 The quality and quantity of sugarcane genomic DNA extracted by improved method

样品 Sample	$A_{230}$	$A_{260}$	$A_{280}$	$A_{260}/A_{230}$	$A_{260}/A_{280}$	DNA 浓度 ( $\mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$ ) DNA concentration	DNA 产量 ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) Yield of DNA
1	0.054	0.107	0.059	1.981	1.813	0.527	527
2	0.081	0.156	0.083	1.921	1.879	0.547	547
3	0.063	0.125	0.069	1.989	1.789	0.521	521
4	0.051	0.097	0.056	1.893	1.714	0.495	495
5	0.065	0.118	0.064	1.813	1.832	0.533	533

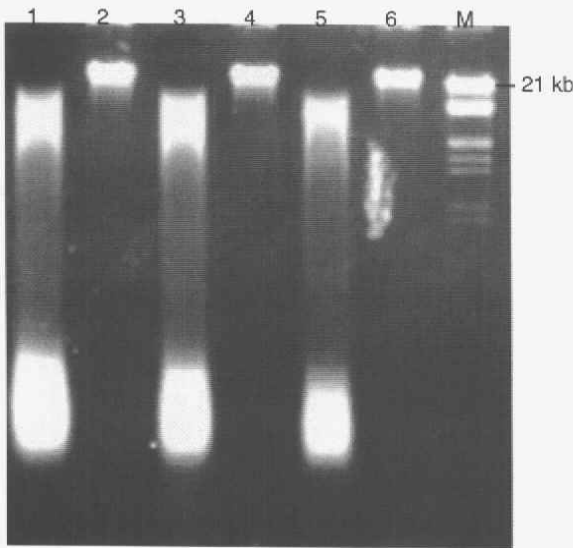


图 1 不同方法提取的甘蔗基因组 DNA

Fig. 1 The DNA extracted by different methods

M; Lambda DNA/*EcoRI*+*HindIII*; 1,3,5: 改良方法提取 DNA extracted by improved method; 2,4,6: 常规方法提取 DNA extracted by common method

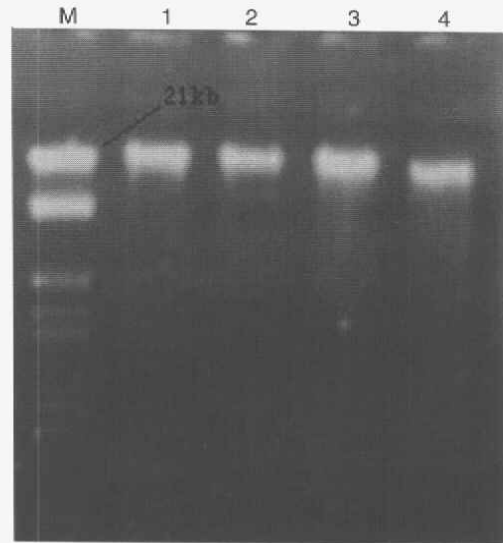


图 2 改良方法提取的甘蔗基因组 DNA

Fig. 2 Sugarcane genomic DNA extracted by improved method

M; Lambda DNA/*EcoRI*+*HindIII*; 1-4: 部分转化甘蔗基因组 DNA Part genome DNA of transgenic sugarcane

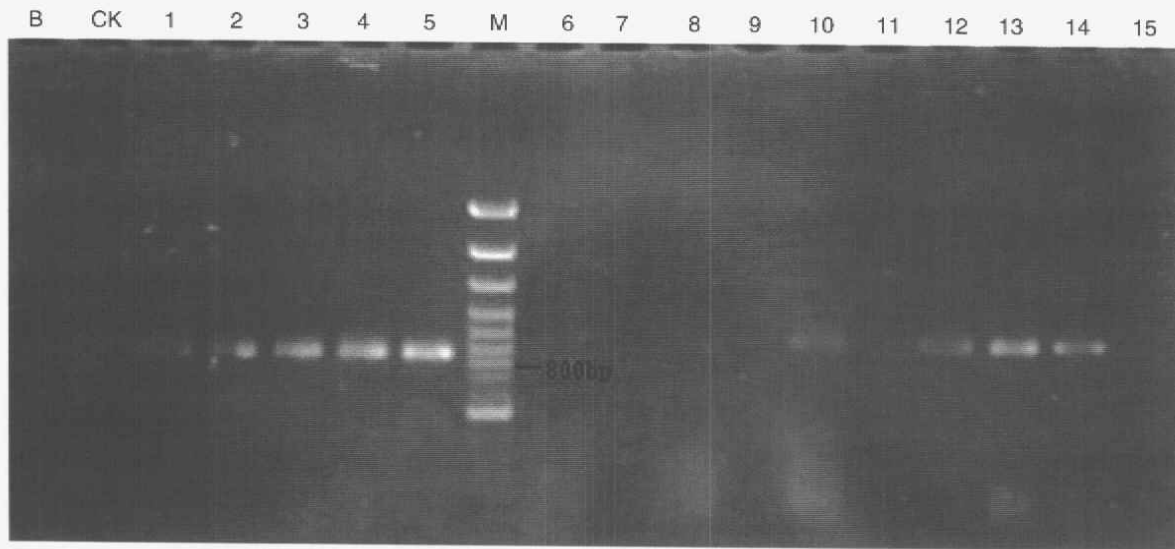


图 3 *ScMV-CP* 基因片段的 PCR 扩增

Fig. 3 PCR amplification of *ScMV-CP* gene fragment

B: 空白对照 Blank control; CK: 未转化植株(阴性对照) Untransformed sugarcane (negative control); M: Generuler™ 100 bp DNA ladder plus; 5: 质粒 DNA(阳性对照) Plasmid DNA (Positive control); 1-4, 6-15: 转化甘蔗植株(其中 6, 7, 8, 9, 11, 15 为阴性) Transformsants

转基因甘蔗进行 Southern 杂交, 出现良好的杂交结果(图 5)。

### 3 讨论

基因组 DNA 的提取技术是分子生物学研究中的基本技术, DNA 样品的质量对于实验的成败至关重要。甘蔗叶片中含较多的多酚类物质, 在基因组 DNA 提取过程中易氧化而使 DNA 呈褐色, 影响

DNA 质量<sup>[1]</sup>。本实验中增加了酚类物质的结合剂 PVP 和起抗氧化作用的亚硫酸钠, 有效防止了多酚物质氧化成醌类。此外 PVP 还能作为澄清剂吸附甘蔗叶中的多糖, 使之沉淀去除。如果提取过程中不加 PVP, 用冷异丙醇沉淀所得到的 DNA 不是透明丝状, 而是呈粘稠状。在提取时加适当浓度的乙醇, 也可以在不影响 DNA 产率的情况下有效除去多糖。但加入的乙醇量要适宜(0.1 倍体积), 乙醇含量过低则不能有效地去除多糖, 过高则容易引起 DNA



图 4 甘蔗基因组 DNA 经 *EcoR* I 和 *Pst* I 酶切后结果

Fig. 4 Result of sugarcane genomic DNA digested with *EcoR* I and *Pst* I  
M; Lambda DNA/*EcoR*I+*Hind*III; 1, 3, 5: 酶切的甘蔗基因组 DNA  
Digested sugarcane genomic DNA; 2, 4, 6: 未酶切的甘蔗基因组 DNA  
Undigested sugarcane genomic DNA

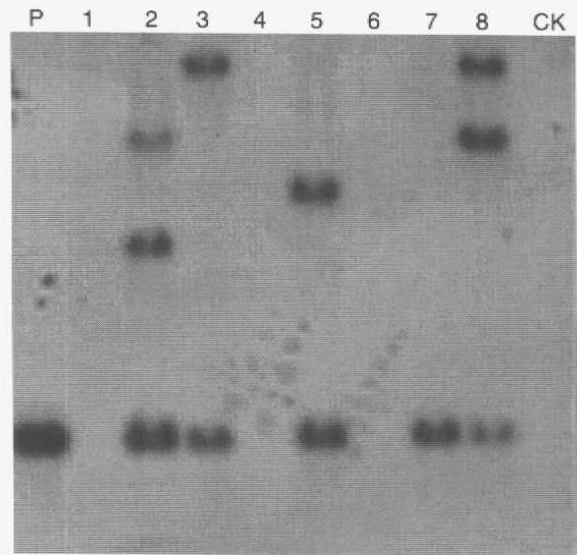


图 5 转基因甘蔗 Southern 杂交检测

Fig. 5 Southern blotting detection of transgenic sugarcane  
P: 质粒酶切片段 (阳性对照) Fragment of plasmid (positive control); CK: 未转化的受体甘蔗 (阴性对照) Untransformed sugarcane (negative control); 1-8: 转基因甘蔗 (其中 1, 4, 6 没有杂交信号)  
Transformed sugarcane (1, 4, 6, no hybridization signal)

沉淀而影响产量。

本方法提取的 DNA 产量高、纯度好, 而且简便易行, 整个步骤只需要 1 h, 节约提取时间; 每个样品的提取只需要 3 个 2.0 ml 的 Eppendorf 管即可完成, 整个过程不需要低温离心, 节约实验成本, 适合大多数实验室使用; 在提取过程中大部分 RNA 被降解, 不需要用 RNA 酶处理; 100 mg 叶片可以提取出 45-60  $\mu$ g 的 DNA; 以其作模板对转基因甘蔗进行 PCR 检测, 特异性产物明显, 重复性好。因此, 本方法提取的 DNA 适用于对甘蔗大量遗传转化后代进行 PCR、Southern 杂交等分子生物学鉴定, 同时也适合于对甘蔗基因组进行 RAPD 分析。

#### 参考文献

- [1] Honeycutt R J, Sobral B W S, Kiem P, et al. A rapid DNA extraction method for sugarcane and its relatives [J]. *Plant Mol Biol Rep*, 1992, 10:66-72.
- [2] Mannerlöf M, Tenning P. Screening of transgenic plants by multiplex PCR [J]. *Plant Mol Biol Rep*, 1997, 15:38-45.
- [3] Chen D H, Ronald P C. A rapid DNA minipreparation method

suitable for AFLP and other PCR applications [J]. *Plant Mol Biol Rep*, 1999, 17:53-57.

- [4] Dilworth E, Frey J E. A rapid method for high throughput DNA extraction from plant material for PCR amplification [J]. *Plant Mol Biol Rep*, 2000, 18:61-64.
- [5] Wang J X(王景雪), Sun Y(孙毅), Gao W J(高武军). A simple and practical method for total DNA extraction from plant [J]. *J Shanxi Univ (Nat Sci)* (山西大学学报自然科学版), 2000, 23(3):271-272. (in Chinese)
- [6] Liu X H(刘学春), Pan C X(潘春欣), Song Y Z(宋云枝). A simple procedure of DNA isolation from monocotyledonous plants and its application [J]. *J Shandong Agri Univ* (山东农业大学学报), 1995, 26(4):491-495. (in Chinese)
- [7] Fu R Z(傅荣昭), Sun Y R(孙勇如), Jia S R(贾士荣). *The Manual for Plant Transformation* [M]. Beijing: Science and Technology Press, 1994. 131-136. (in Chinese)
- [8] Gu H Y(顾红雅), Qu L J(瞿礼嘉). *Laboratory Manual of Plant Molecular Biology* [M]. Beijing: High Education Press, 1998. 3-12. (in Chinese)
- [9] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. 金冬雁, 黎孟枫译. *分子克隆实验指南* [M]. 第二版, 北京: 科学出版社, 1993. 26-28.