

花生种子高纯度 DNA 的提取(简报)

王 艳 何军贤 傅家瑞

(中山大学生命科学学院, 广州 510275)

RAPID AND EFFICIENT PURIFICATION OF DNA FROM PEANUT (*ARACHIS HYPOGAEA*) SEEDS

Wang Yan He Junxian Fu Jiarui

(School of Life Science, Zhongshan University, Guangzhou 510275)

关键词 花生; 种子; DNA; 十六烷基三甲基溴化铵

Key words Peanut; Seeds; DNA; Cetyl trimethyl ammonium bromide

随着种子生理研究的逐渐深入, 人们发现一些在植物胚胎中特异表达的基因, 它们与种子的生理功能有着密切的关系, 为此常常需要从不同来源的种子中提取高纯度的 DNA, 进行人们感兴趣的功能基因的克隆及表达的研究。目前植物材料中高纯度 DNA 的提取通常采用蛋白酶消化、酚/氯仿抽提的方法。而植物的种子由于富含蛋白质、脂肪和糖类等贮藏物质, 在提取种子 DNA 时很难将这些干扰物质完全去除。本实验选用在华南地区普遍栽种的油料作物花生, 其种子蛋白质和脂肪的含量可分别高达 30%^[1] 和 50% 左右^[2], 远远高于其它材料, 因而使得其高纯度 DNA 的制备尤为困难。我们用十六烷基三甲基溴化铵(Cetyl trimethyl ammonium bromide, CTAB)结合常规的酚/氯仿法对 DNA 进行纯化, 获得了纯度高、完整性好的 DNA 提取物, 并可同时满足限制性内切酶消化和 Southern 杂交需要。现将这一方法简介如下。

1 材料和方法

1.1 试验材料

花生(*Arachis hypogaea*)种子, 取胚轴 3g 于液氮中速冻后置于 -40℃ 冰箱中备用。

1.2 试剂和溶液

(1) DNA 提取液: 100mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 150mmol/L NaCl, 1% SDS, 100mmol/L EDTA, 4% (w/v) PVP; (2) 10mg ml⁻¹ 蛋白酶 K(Sigma 公司产品); (3) TE 缓冲液: 10mmol/L Tris-HCl (pH8.0), 1mmol/L EDTA; (4) TE 饱和酚; (5) 5mol/L NaCl; (6) CTAB 溶液: 用 0.7mol/L NaCl 将 CTAB 配制成 10% 的溶液; (7) 氯仿: 异戊醇(24:1, v/v); (8) 8mol/L LiCl。

1.3 DNA 提取与纯化

(1) DNA 提取: 取 3g 花生胚轴在液氮中研磨成粉, 加 15ml DNA 提取液分散均匀, 加蛋白

酶K至 $20\mu\text{g ml}^{-1}$ 终浓度, $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ 温育3h, $6500\times\text{g}$ 离心去组织碎片, 上清液分别用等体积苯酚: 氯仿: 异戊醇(25:24:1)抽提二次, 离心取水相, 加入LiCl至 2mol/L 终浓度, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 过夜沉淀大分子RNA, $12000\times\text{g}$ 离心10min取上清液, 并用0.6倍体积的异丙醇于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 沉淀DNA 2h。所得DNA沉淀用70%乙醇洗涤、部分干燥后溶于适量TE缓冲液中, 在260nm和280nm波长下测定光吸收, 计算DNA的浓度和纯度。

(2)用CTAB法进行纯化: 在上述DNA提取液中加NaCl至 0.5mol/L 终浓度, 并按每ml DNA提取液加0.15ml CTAB的比例加入CTAB溶液, $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ 温育10min, 于室温下用氯仿: 异戊醇(24:1)和苯酚: 氯仿: 异戊醇(25:24:1)各抽提一次, 加异丙醇从水相中沉淀DNA, 溶于适量TE缓冲液中待用。

2 结果与分析

植物种子一般含有大量的蛋白质、脂类和糖等贮藏物质, 有些还含有丰富的酚类物质及酚氧化酶, 而花生种子的脂类及蛋白质含量很高, 是制备高纯度的种子DNA的主要因素。用常规的酚/氯仿抽提法很难将这些物质除尽, 致使DNA

制备物带有一定的颜色(浅黄), $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ 比值低于1.75(表1), 并不能被限制性内切酶消化。据Murray和Thompson报道, 在核酸提取液中加入CTAB, 可有效地去除材料中的蛋白和糖类等污染物, 同时还可抑制多酚氧化酶的活性, 因此在氯化铯密度梯度离心时加入CTAB用于纯化植物的DNA, 取得了良好的效果^[3]。但这种做法费时费力, 且受超离心条件的限制, 使得这一方法在许多实验室不便采用。我们发现将DNA经酚/氯仿初步纯化后, 再用CTAB进行单独纯化, 同样可获得理想的效果。经CTAB纯化后的DNA溶液无色透明, 纯度也进一步提高, $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ 比值可达1.85(表1), 并可被EcoRI完全水解(图1)。此外, 我们用该法进行了多种顽拗型种子(富含酚类物质)中DNA的提取实验, 也获得了满意的效果。实验表明用CTAB纯化植物DNA, 操作简便, 成本低廉, 适于富含蛋白质、脂类、糖类及酚类物质的材料的高纯度DNA的制备。

参考文献

- 1 黄上志, 傅家瑞. 花生种子的发育与贮藏蛋白质的合成和积累. 植物生理学报, 1992, (1):1-6

表1 CTAB纯化前后花生DNA质量比较

Table 1 Comparison of DNA quality before and after CTAB purification

纯化作用 Purification	DNA溶解物颜色 The colour of DNA solution	DNA产量 Yield of DNA ($\mu\text{g g}^{-1}\text{FW}$)	DNA纯度 Purity of DNA ($\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$)
纯化前 Before	浅黄色 Light yellow	692	1.74
纯化后 After	无色 Colourless	665	1.85



图1 花生种子DNA的琼脂糖凝胶(0.7%)电泳分析
Fig. 1 Agarose gel (0.7%) electrophoresis of DNA from peanut seeds
1. λ — DNA, Sigma, MW 48.35kb; 2. 完整的花生DNA, Intact DNA from peanut seeds; 3. EcoRI完全水解的花生DNA, EcoRI digested peanut seed DNA

- 2 姜慧芳, 段乃雄. 花生油脂品质及含油量、油酸和亚油酸含量间的相关分析. 花生科技, 1993, (2):5-6
- 3 Murray M G, Thompson W F. Preparation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acids Research, 1980, (8):4321-4325

华南植物研究所 1997 年攻读博士学位研究生招生简章

一、培养目标: 为适应我国社会主义现代化建设需要, 培养德、智、体全面发展, 在本门学科上掌握坚实宽广的基础理论和系统深入的专业知识, 具有独立从事科学研究工作能力, 在科学和专业技术领域作出创造性的高级科学专业人。

二、招生人数: 理学学科植物生理学专业招生 10 名, 含委托培养。

三、学习年限: 三年。

四、报考条件:

1. 熟悉马列主义和毛泽东思想的基本原理, 坚持四项基本原则, 遵纪守法, 品德良好, 勤奋学习, 决心为社会主义现代化建设服务。

2. 已获得硕士学位的在职人员, 应届毕业的硕士生, 具有同等学历者(限大学本科毕业)。

3. 身体健康, 年龄一般不超过四十五岁。

4. 有两名与本专业学科有关的副教授(或具有相当职称)以上的专家推荐。

五、报名日期: 1997 年 2 月 10 日至 3 月 1 日

六、报名地点: 华南植物研究所研招办

七、报名手续:

1. 凡符合报考条件者, 需凭所在单位(具有人事权级的)同意报考的介绍信报名(外地考生可函报), 缴纳报名费 60 元, 索取(或函索)有关报名表格式。

2. 考生需由所在单位于 3 月 1 日前(以邮戳为准)向我所研招办挂号寄送下列材料: (1) 报考攻读博士学位研究生登记表; (2) 专家推荐信(二份); (3) 硕士生学位课程学习成绩单, 硕士学位论文全文和评议书(应届硕士生报名时交硕士学位论文题目及内容摘要, 论文全文及评议书待答辩通过后补交); (4) 硕士学位证书(复印件)或证明书(应届毕业的硕士生可在录取前补交); (5) 县级以上医院的体格检查表; (6) 政治审查表(由单位党组织填写); (7) 同等学历考生不交(3)、(4)两项材料, 但应送或寄交已学过的硕士生学位课程情况表和在公开发行的刊物上发表的和与硕士学位论文水平相当的学术论文全文; (8) 小一寸相片两张。

3. 报考资格经审查合格后, 即发出准考证。

八、考试地点: 华南植物研究所

九、考试时间: 一九九七年四月中旬, 详见准考证时间的通知。

十、考试科目: 英语、两门业务课, 政治理论课(凡硕士生学习阶段政治理论成绩及格者可申请免考, 同等学历考生必考)。

十一、定向和委托培养: 报考定向培养博士生和委托培养博士生, 须由考生所在单位在报名时向我所提出书面意见, 经考试及格, 正式签订定向培养或委托培养合同后录取。

十二、录取: 根据初试和复试的成绩, 德、智、体全面衡量, 择优录取。

十三、学习期间的待遇: 按国家有关规定办理。

十四、分配: 为原单位定向培养, 委托培养的博士生毕业后回原单位工作, 其他则根据国家需要和学以致用, 择优分配的原则, 由国家计划分配。

1997 年植物生理学专业招收博士学位研究生目录

单位代码: 80107 地址: 广州市五山 邮政编码: 510650
联系部门: 研究生招生办 电话: (020) 87705626-212 联系人: 毛荣森

学科、专业名称及研究方向	指导教师	人数	考试科目	备注
071002 植物生理学				
1. 植物逆境生理及生物化学	刘鸿先	2	① 英语 ② 植物生理学 ③ 生物化学	同等学历加试自然辩证法及硕士学位主干课程两
2. 植物光合作用	刘鸿先	2	同上	门(笔试)
1. 植物细胞工程	李耿光	2	同上	
1. 植物生态生理学	刘鸿先	2	① 英语 ② 植物生理学 ③ 植物生态学	
1. 植物杂种优势及遗传转化	梁承鄞	1	① 英语 ② 植物生理学 ③ 植物遗传学	
2. 生殖生物学	梁承鄞	1	① 英语 ② 植物生理学 ③ 植物胚胎学	