

一种改良的大豆 DNA 提取方法

吴艳艳,代德艳,蔡春梅

(青岛农业大学 生命科学院/山东省高校植物生物技术重点实验室,山东 青岛 266109)

摘要:大豆组织中含有较多的蛋白质、糖类、酚类和脂类物质,要从中提取高质量的 DNA 比较困难。针对这一情况提出一种改良 UREA 大豆 DNA 提取方法(mUREA),该方法用异丙醇沉淀 DNA,并配制 washing buffer 洗涤 DNA 沉淀。并以大豆叶片和种子为材料,将 mUREA 法与 CTAB 法和 SDS 法进行对比。结果表明,以大豆叶片为材料时,mUREA 法提取的 DNA 产率最高,质量最好;以大豆种子为材料时,mUREA 法提取的 DNA 产率略低于 SDS 法,但纯度最高。综合来看,mUREA 法是一种高效的大豆基因组 DNA 提取法,从大豆种子和叶片中提取的 DNA 浓度和纯度都较高,能满足后续各种分子生物学的要求。

关键词:改良 UREA 法;大豆;基因组 DNA 提取

中图分类号:S565.1 **文献标识码:**A **DOI:**10.11861/j.issn.1000-9841.2015.01.0112

A Modified UREA Protocol for Soybean DNA Extraction

WU Yan-yan, DAI De-yan, CAI Chun-mei

(College of Life Science/Key Lab of Plant Biotechnology in Universities of Shandong, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, China)

Abstract: It is difficult to extract high quality and sufficient yield of genomic DNA for soybean molecular biological research, because of a great deal of protein, polysaccharides, hydroxybenzenes and esters. A modified UREA (mUREA) protocol for extracting soybean DNA was provided in this paper. We precipitated DNA with isopropanol and washed DNA pellet with washing buffer. Using soybean leaves and seeds as material, compared mUREA method with CTAB and SDS methods. The results showed that the quality and yield of DNA from soybean leaves were highly significant than using mUREA method. And using soybean seeds as material, the purity of DNA from mUREA was better than the other two methods. So mUREA method yielded much more DNA of high quality for soybean leaves and seeds that was suitable for various molecular operations.

Keywords: mUREA; Soybean; Genomic DNA extraction

DNA 是遗传信息的载体,是重要遗传物质。一定数量及高质量的 DNA 样品是进行 PCR 扩增、限制性酶切、Southern 杂交、测序等分子生物学的保障。因此,选择合适的提取方法获取高质高量的 DNA 显得极为重要。植物 DNA 的提取方法有很多,常用的方法有 CTAB 法^[1]、SDS 法^[2]等,这些 DNA 提取方法在原理上基本一致,都是先裂解植物细胞,再利用有机溶剂进行多次抽提,使蛋白质等沉淀于有机溶剂中,而核酸保留在水相。但由于植物材料在化学成分、组织结构等方面的差异,不同方法对某一具体植物而言,提取效率差异很大。对于大豆,由于其含有较多的蛋白质、糖类、酚类、脂类、色素及其他干扰物,利用 CTAB 法和 SDS 法有时难以获取高质量的 DNA。因此,迫切需要一种更有效的大豆基因组 DNA 提取方法。

尿素(UREA)法常用于菌类 DNA 的提取,其效果明显优于 CTAB、SDS 等方法^[3]。对于多糖等次生物质含量高的材料,传统的 UREA 法提取效果欠

佳,因此其在植物中的使用受到一定限制^[4-5]。我们从长期 DNA 提取实践中总结出一种适用的大豆 DNA 改良 UREA 提取方法(modified UREA method, mUREA)。本文将 mUREA 与 CTAB 和 SDS 法所提取的大豆叶片和种子 DNA 进行比较分析,以开辟尿素法在植物 DNA 提取中的应用。

1 材料与方法

1.1 材料

大豆品种“早熟黄豆”(陕西太白县地方品种)的干种子和常规方法培育的植株叶片。

1.2 主要药品和仪器

尿素、CTAB(十六烷基三甲基溴化铵)、醋酸铵、异丙醇、无水乙醇购自生工生物工程股份有限公司;SDS(十二烷基磺酸钠)购自德国 SIGMA 有限公司;苯酚·氯仿·异戊醇(25:24:1)和氯仿·异戊醇(24:1)购自北京索来宝科技有限公司;Taq 酶、EcoR I、Hind III 购自

收稿日期:2014-04-17
基金项目:国家自然科学基金(31071444,31371647);山东省优秀中青年科学家科研奖励基金(BS2011NY006);青岛农业大学高层次人才启动基金(630908, 631304)。
第一作者简介:吴艳艳(1987-),女,硕士,主要从事作物基因组学研究。E-mail:wuyan95888@163.com。
通讯作者:蔡春梅(1972-),女,副教授,主要从事作物基因组学研究。E-mail:2561081608@qq.com。

宝生物工程(TAKARA)有限公司。

主要仪器包括 Tocan360 凝胶成像分析系统(上海领成生物科技有限公司)、T100TM thermal cycler PCR 仪(BIO - RAD 公司),MIKRO 200 高速离心机(德国 HETTICH 公司),SK - L330 - pro 恒温振荡器(大龙实验仪器有限公司)、BWS - 10 恒温数显水浴锅(上海一恒仪器有限公司)、CP512 电子天平(美国奥豪斯国际贸易(上海)有限公司)、微量分光光度计(美国 NanoDrop 2000)。

1.3 大豆基因组 DNA 提取

用液氮对幼嫩的大豆叶片进行充分研磨,取 0.2 g 分装到 2.0 mL 离心管中,−80℃ 保存待用。根据詹少华等^[6]的方法将大豆种子洗净,用 25℃ 蒸馏水吸胀 24 h,手工去皮,加少量石英砂,再分别加对应的提取缓冲液,在冰浴环境下研磨成糊状,取 500 μL 分装到 2.0 mL 离心管中,常温保存待用。然后按下列方法分别提取。每种方法均重复 3 次。其中,CTAB 法参照王关林等^[7]的方法;SDS 法参照 Pich 等^[8]的方法;mUREA 法分为 9 个步骤:

(1)在装有样品的离心管中加入 750 μL 经 65℃ 预热的 mUREA 提取缓冲液(7 mol · L^{−1} Urea, 50 mol · L^{−1} Tris - HCl, pH8.0, 0.3 mol · L^{−1} NaCl, 1% N - Lauroyl Sarcosine, 2% PVPP, 3% β - 巯基乙醇),用涡旋混合器充分震荡混匀。

(2)放置于 65℃ 水浴中温浴 30 min,其间每隔 10 min 轻轻摇动 1 次。

(3)冷却 4 ~ 5 min。加入 750 μL 苯酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)轻轻混合,放置水平摇床混匀 20 min,12 000 r · min^{−1} 离心 10 min。

(4)取上清液于 1.5 mL 离心管中,加入等体积氯仿:异戊醇(24:1),水平摇床混匀 5 min,12 000 r · min^{−1} 离心 10 min。

(5)取上清液于 1.5 mL 离心管中,加入 120 μL 4.4 mol · L^{−1} 的醋酸氨(pH5.2)和 600 μL 异丙醇,轻轻颠倒混合,12 000 r · min^{−1} 离心 5 min。

(6)倾去上清液,保留沉淀物,加入 1 mL 1st Washing Buffer(76% 乙醇,0.2 mol · L^{−1} NaOAc),水平摇床轻摇 20 min,12 000 r · min^{−1} 离心 2 min。

(7)倾去上清液,加入 1 mL 2nd Washing Buffer(76% 乙醇,10 mmol · L^{−1} NH₄OAc)振荡洗涤 10 min,12 000 r · min^{−1} 离心 2 min。

(8)倾去上清液,60℃ 烘干箱晾干沉淀后,加入 200 μL TE Buffer。65℃ 的水浴锅中放置 20 min 使 DNA 溶解。

(9)加入 1.5 μL 10 mg · mL^{−1} RNase A 酶液,在 37℃ 条件下保温 3 h,于 −20℃ 保存备用。

1.4 DNA 的质量检测

1.4.1 琼脂糖凝胶电泳检测 取 3 μL DNA 原液,加 2 μL 6 × Loading buffer,混匀后点入 0.8% 琼脂糖凝胶,在电压 50 V 下电泳 30 min,最后在凝胶成像系统中观察、拍照。

1.4.2 分光光度法检测 取 1 μL DNA 原液,用微量分光光度计测定提取的 DNA 的浓度及 A₂₆₀/A₂₈₀ 值。

1.4.3 PCR 检测 将 3 种方法提取的大豆叶片和种子的 DNA 原液稀释到 10 ng · μL^{−1},用 SSR 引物 Sat502 进行 PCR 扩增。上游引物:GCGCAACTC-CCCTTCTAGTGTAAATTGT;下游引物:GCGACT-CAACTCCCCTATAATGTATAT。

PCR 扩增采用 20 μL 反应体系,其中包括 2 μL 10 × PCR buffer(含 MgCl₂),1.6 μL dNTP mix(各 2.5 mmol · L^{−1}),1 μL 的正反向引物混合液(各 10 μmol · L^{−1}),0.1 μL Taq 聚合酶(5 U · μL^{−1}),2 μL 模板 DNA(10 ng · μL^{−1}),13.3 μL ddH₂O。PCR 扩增程序为:94℃ 预变性 4 min;94℃ 变性 30 s,52℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 60 s,共 30 个循环;72℃ 延伸 5 min。扩增产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测,紫外凝胶成像仪观察并拍照。

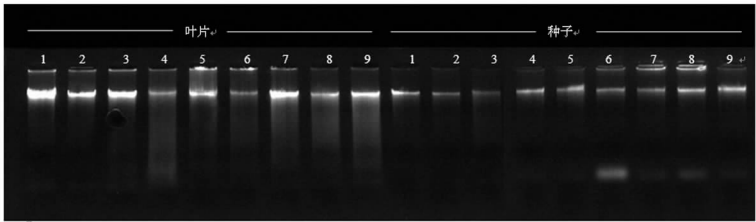
1.4.4 限制性内切酶酶切检测 在 20 μL 反应体系中对各 DNA 样品分别进行限制性内切酶 *Eco*R I 和 *Hind* III 单酶切检测,酶切反应体系中包括 10 μg DNA,5 U *Eco*R I 或 *Hind* III,2 μL Buffer,剩余体积用 ddH₂O 填充。条件为 37℃ 保温 1 h。吸取 10 μL 酶切反应液,进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,在凝胶成像系统中观察并拍照。

2 结果与分析

2.1 DNA 产率

DNA 产率可以通过 DNA 电泳条带亮度来大致判断。以大豆叶片为提取材料时,本研究所用的 3 种提取方法中,mUREA 法提取的 DNA 电泳条带明显亮于 CTAB 法和 SDS 法(图 1),说明 mUREA 法提取叶片 DNA 的产率较高。以大豆种子为材料时,3 种提取方法得到的 DNA 的电泳条带明暗度差不多,说明 3 种方法从大豆种子中提取 DNA 的产率无明显差异。

DNA 产率还可以通过分光光度计来精确检测。以大豆叶片为提取材料时,3 种提取方法中,mUREA 法提取的 DNA 产率高于其他 2 种方法提取的 DNA 产率(表 1),该检测结果证实了凝胶电泳的检测结果。以大豆种子为提取材料时,SDS 法提取的 DNA 产率略高于 CTAB 法和 mUREA 法。



1~3: mUREA 法;4~6: CTAB 法;7~9: SDS 法。
1-3: mUREA method; 4-6: CTAB method; 7-9: SDS method.

图 1 用 3 种方法提取的大豆叶片和种子的 DNA 琼脂糖凝胶电泳检测结果

Fig. 1 Agarose gel profiles of DNAs extracted from soybean leaves and seeds using three methods

表 1 用分光光度计计算的大豆叶片和种子基因组 DNA 产率

Table 1 Yield of DNA extracted from soybean leaves and seeds using three methods, estimated by spectrophotometer

	样品 Sample	mUREA	CTAB	SDS
叶片 Leaves	1	2691.5	1667.7	1917.5
	2	2691.4	1663.3	2019.5
	3	2878.8	1684.5	2091.4
	平均 Mean	2753.9	1684.5	2009.5
种子 Seeds	1	1010.5	1085.5	1448.1
	2	1336.8	1263.8	1249.1
	3	1125.6	1135.7	1534.4
	平均 Mean	1157.6	1161.7	1410.5

2.2 DNA 质量

从琼脂糖凝胶电泳检测结果来看(图 1),以叶片为提取材料时,3 种方法提取的 DNA 都有 1 条高分子量条带,但 CTAB 法和 SDS 法提取的 DNA 有部分降解现象,而 mUREA 法提取的 DNA 则无降解,说明 mUREA 法能够提取相对完整的 DNA。以种子为提取材料时,3 种方法提取的 DNA 都有 1 条高分子量条带,但和 mUREA 法相比较,CTAB 法和 SDS 法提取的 DNA 泳道点样孔较亮,说明提取的 DNA 中含有较多的多糖、蛋白质等,纯度比 mUREA 法提取的 DNA 差。

用分光光度计检测 DNA 纯度,高纯度 DNA 的 A_{260}/A_{280} 比值应在 1.8~2.0。当 A_{260}/A_{280} 小于 1.8 时, DNA 样品中可能存在蛋白质污染;当 A_{260}/A_{280} 大于 2.0 时, DNA 样品中可能存在 RNA 污染^[9]。从表 2 可以看出,所有的 DNA 其 A_{260}/A_{280} 比值都在 1.90~1.98,说明 3 种方法在大豆叶片和种子中提取 DNA 质量较好,纯度较高。三种方法中 mUREA 法提取的 DNA 的 A_{260}/A_{280} 比值最低, DNA 纯度最高,这和琼脂糖凝胶电泳的结果一致。

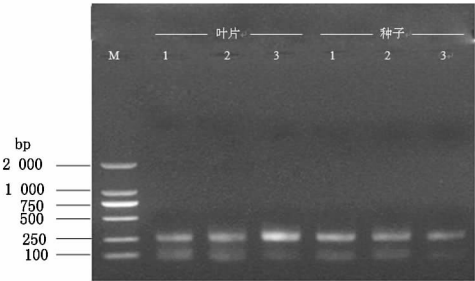
PCR 扩增和限制性内切酶酶切对 DNA 模板的质量要求较高,因此 PCR 扩增和酶切成功率成为评判 DNA 质量的重要依据。随机挑取 1 个 SSR 引物

(Satt502)对提取的 DNA 进行扩增。从图 2 可以看出,以 3 种方法提取的 DNA 为模板进行的 SSR-PCR 扩增,均获得了较清晰的扩增条带。对用 3 种方法从大豆叶片和种子中提取的基因组 DNA 进行限制性内切酶酶切,从图 3 可以看出,酶切后 DNA 呈弥散状,说明所提取的 DNA 均能被 *Hind* III 和 *Eco*R I 酶切。

表 2 用分光光度计测定的大豆叶片和种子基因组 DNA 纯度

Table 2 Purity of DNA extracted from soybean leaves and seeds using three methods, estimated using spectrophotometer (A_{260}/A_{280})

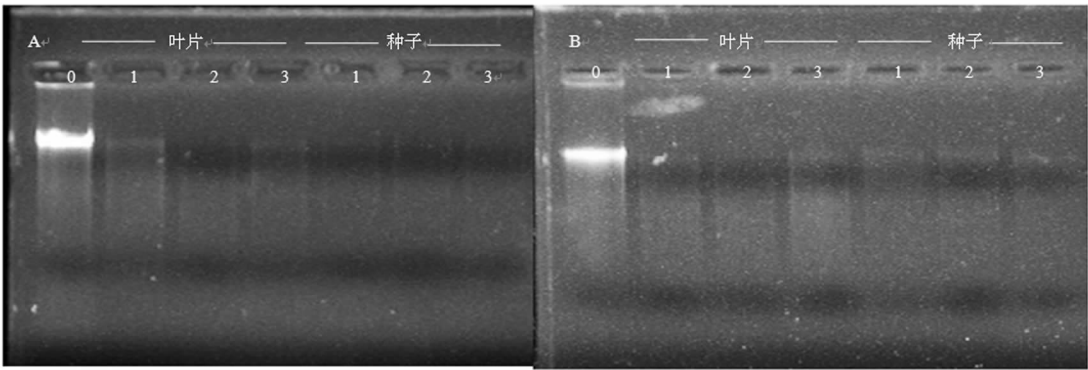
样品 Sample	mUREA	CTAB	SDS	
叶片 Leaves	1	1.95	1.96	1.98
	2	1.95	1.97	1.98
	3	1.95	1.94	1.98
	平均 Mean	1.95	1.96	1.98
种子 Seeds	1	1.90	1.97	1.90
	2	1.89	1.94	1.93
	3	1.90	1.92	1.93
	平均 Mean	1.90	1.94	1.92



1: mUREA 法;2: CTAB 法;3: SDS 法。
1: mUREA method; 2: CTAB method; 3: SDS method.

图 2 SSR 引物对 3 种方法提取的大豆叶片和种子 DNA 的扩增情况

Fig. 2 PCR amplification of genomic DNA extracted from soybean leaves and seeds using three methods using SSR primer pair



A: *EcoR* I;B: *Hind* III;0: 未酶切;1: mUREA 法;2: CTAB 法;3: SDS 法。
0: Not digested; 1: mUREA method; 2: CTAB method; 3: SDS method.

图3 *EcoR* I 和 *Hind* III 对 3 种方法提取的大豆叶片和种子 DNA 的酶切情况
Fig.3 Digestion of genomic DNA extracted from soybean leaves and seeds using three methods using *EcoR* I and *Hind* III

3 结论与讨论

以 SDS 法、CTAB 法和 mUREA 法提取的大豆叶片和种子基因组 DNA 均可满足 PCR 扩增和限制性内切酶酶切的要求。以大豆叶片为材料时,mUREA 法提取的 DNA 产率最高,质量最好。以大豆种子为材料时,mUREA 法提取的 DNA 产率略低于 SDS 法,但纯度最高。综合来看,mUREA 法是一种高效的大豆基因组 DNA 提取法,从大豆种子和叶片中提取到的 DNA 的浓度和纯度都较高,能满足后续各种分子生物学的要求。

本文的 mUREA 主要改进了以下几个方面:
(1)用异丙醇沉淀 DNA,这样会避免用无水乙醇沉淀 DNA 可能导致的蛋白质和其他杂质污染;(2)在 DNA 提取液中加入 2% 的交联聚乙 烯吡咯烷酮 (PVPP)。PVPP 是 PVP 的交联态,更易于和多酚物质结合形成络合物而沉淀出来,达到彻底去除酚的目的;(3)用 1st Washing Buffer(76% 乙醇,0.2 mol · L⁻¹ NaOAC)和 2nd Washing Buffer(76% 乙醇, 10 mmol · L⁻¹ NH₄OAC)2 次洗涤 DNA 沉淀。NaOAC 和 NH₄OAC 的加入可保证在充分洗涤情况下减少 DNA 的损失。

参考文献

[1] 蔡朝辉,李萍,董婷,等. 贝母 的分子生物学鉴定方法的研究 [J]. 药学报,2000,35(4):309-312. (Cai C H, Li P, Dong T,et al. Molecular biological identification of the Chinese drug “BeiMu” (*Bulbus fritillariae*) [J]. Acta Pharmaceutica Sinica, 2000,35(4):309-312.)
[2] Doyle J J, Doyle J L. A rapid DNA isolation procedure for small

quantities of fresh leaf tissue[J]. Phytochemical Bulletin, 1987, 19;11-15.
[3] 刘少华,陆金萍,朱瑞良,等. 一种快速简便的植物病原真菌基因组 DNA 提取方法 [J]. 植物病理学报,2005,35(4):362-365. (Liu S H, Lu J P, Zhu H L, et al. A rapid and simple extraction method for plant pathogenic fungi [J]. Acta Phytopathologic Sinca,2005,35(4):362-365.)
[4] 王永飞,王鸣,郑学勤,等. 提取大白菜基因组 DNA 的几种方法比较 [J]. 西北农业大学学报,2000,28(4):85-87. (Wang Y F, Wang M, Zheng X Q, et al. Comparison of genomic DNA extraction methods of Chinese cabbage (*Brassica campestris* ssp. pekinensis) [J]. Journal of Northwest Agriacultural University, 2000, 28(4):85-87.)
[5] 代翠红,李杰,朱延明,等. 不同 DNA 提取方法对 4 种重要作物 DNA 提取效率的比较 [J]. 东北农业大学学报,2005,36(3):329-332. (Dai C H ,Li J, Zhu Y M, et al. Comparison of the efficiency of different DNA extraction methods on 4 kinds of important crops [J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2005,36(3):329-332.)
[6] 詹少华,尹艺林. 大豆基因组 DNA 提取纯化方法研究 [J]. 安徽农业科学,2008,36(23):9871-9872. (Zhan S H, Yin Y L. Study on extraction and purification methods of soybean genomic DNA [J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2008,36(23):9871-9872.)
[7] 王关林,方洪筠. 植物基因工程 [M]. 2 版. 北京:科学出版社, 2002:744. (Wang G L, Fang H J. Plant gene engineering (second edition) [M]. 2nd ed. Beijing:Science Press, 2002:744.)
[8] Pich U, Schubert I. Miniprep method for isolation of DNA from plants with a high content of polphenolics [J]. Nucleic Acids Research, 1993, 21(14):3328-3332.
[9] 李金璐,王硕,于婧,等. 一种改良的植物 DNA 提取方法 [J]. 植物学报,2013,48(1):72-78. (Li J L, Wang S, Yu J, et al. A modified CTAB protocol for plant DNA extraction [J]. Chinese Bulletin of Botany, 2013,48(1):72-78.)