

文章编号:1674-7054(2011)02-0138-05

DNA 提取方法对转基因甘蔗 PCR 检测的影响

王晓音¹, 赵婷婷¹, 冯翠莲², 张树珍²

(1. 海南大学 农学院, 海南 海口 570228; 2. 中国热带农业科学院 热带生物技术研究, 海南 海口 571101)

摘要: 研究了不同提取方法和不同生长时期甘蔗提取的 DNA 对转基因甘蔗植株 PCR 检测的影响。结果表明, 幼苗时期提取的甘蔗叶片模板 DNA 质量高于田间成熟植株; 甘蔗幼苗时期的 PCR 检测易于成熟植株; CTAB 法、SDS 法和 CTAB-SDS 法提取的甘蔗叶片 DNA 均能满足幼苗期甘蔗抗性植株的 PCR 检测要求; 对成熟转基因甘蔗植株而言, 以 CTAB-SDS 法提取的 DNA 进行 PCR 检测的效果最佳。

关键词: 转基因甘蔗; DNA 提取; PCR 检测

中图分类号: S 566.1

文献标志码: A

甘蔗(*Saccharum officinarum* L.) 是我国重要的糖料作物和经济作物, 同时也是重要的能源作物。由于甘蔗常规育种的局限性, 分子育种已经成为甘蔗育种的一条新途径, 转基因研究也逐渐成为甘蔗遗传改良的一项快捷有效的新技术。PCR 作为一种常规的现代分子生物学技术, 在转基因分子检测中得到了广泛的应用。理论上, 只要存在一定量的 DNA 就可以实现 PCR 扩增^[1], 但实践中发现模板 DNA 的质量常是影响 PCR 的重要因素^[2], 国内报道的不同甘蔗 DNA 提取方法大多数是针对内源基因的检测^[3]。因此, 笔者针对转基因甘蔗抗性植株在不同生长时期, 不同提取方法提取的 DNA 对转基因甘蔗植株 PCR 检测结果的影响进行了研究, 旨在确定不同时期甘蔗植株进行 PCR 检测时最优化的 DNA 提取方法。

1 材料与方法

1.1 材料 供试的转基因抗性甘蔗植株由中国热带农业科学院热带生物技术研究提供。

1.2 试剂 PCR 试剂购自 TaKaRa 公司; 100 bp Ladder DNA marker(100 ~ 2 000 bp) 购自杭州维特洁生化技术有限公司; PCR 引物合成及基因测序均由上海生物工程公司完成; 低熔点琼脂糖购自 Sigma 公司; 其他常用的化学试剂均为国产分析纯。

1.3 方法

1.3.1 甘蔗 DNA 的提取方法 甘蔗 DNA 的提取采用 CTAB 法、SDS 法及 CTAB-SDS 法。CTAB 法具体的操作方法详见文献 [4]; SDS 法提取步骤见文献 [5]; CTAB-SDS 法操作步骤见文献 [5]。

1.3.2 不同生长时期甘蔗 DNA 的提取

1.3.2.1 幼苗时期 DNA 的提取 选取种植于无菌培养基中的抗性转化苗幼叶 2 片(约 0.03 g), 装入 2.0 mL 的离心管中, 并将装有材料的离心管放入液氮中, 速冻数分钟后, 用细塑料研磨棒在离心管内迅速将其碾碎成粉末, 然后用 CTAB 法、SDS 法及 CTAB-SDS 法进行提取。

1.3.2.2 田间成熟时期 DNA 的提取 从田间成熟的甘蔗植株上选取幼嫩叶片, 去除叶脉, 剪碎置于研钵中充分研磨成粉末(也可以加入适量的石英砂有助研磨), 将研磨好的粉末迅速置于事先加好提取液的离

收稿日期: 2011-04-11

基金项目: 中央级公益性科研院所基本科研业务费(ITBBZD0724)

作者简介: 王晓音(1985-), 女, 河南安阳人, 海南大学农学院 2008 级生化与分子生物学专业硕士研究生。

通信作者: 张树珍, 中国热带农业科学院热带生物技术研究研究员, 博士后。E-mail: zhangsz.2007@yahoo.com.cn

心管中,然后用上述 3 种方法分别进行 DNA 提取。

1.3.3 DNA 浓度和质量的检测 1) 取 2 μL 基因组 DNA 进行电泳($w = 0.8\%$ 的琼脂糖凝胶,100 V,电泳 15 min),于凝胶成像系统下照相,并初步观察 DNA 的质量。2) 采用 Eppendorf BioPhotometer plus 分光光度计,以 DNA 最后溶解的 Buffer 为对照,测定样品 DNA 的吸光值,记录其在 230 nm、260 nm 和 280 nm 处的吸光值,并根据 OD_{260}/OD_{230} 和 OD_{260}/OD_{280} 值确定 DNA 样品的纯度。

1.3.4 甘蔗转化植株的 PCR 检测 以 3 种方法提取的 2 个时期的甘蔗 6 种总 DNA 为模板,采用 *bar* 基因的引物对甘蔗抗性植株进行筛选基因的 PCR 扩增检测。*bar* 基因引物 P1: 5′-CGGTCAGATCTCGGT-GACGGGCAG-3′; P2: 5′-CGGATGAGCCCAGAACGACGCCC-3′。扩增片段为 552 bp。其程序如下: 94 ℃ 5 min,94 ℃ 1 min,58 ℃ 1 min,72 ℃ 1 min, 30 个循环,72 ℃ 10 min,4 ℃ 保存。其中以质粒 DNA 作正对照,以未转化甘蔗的 DNA 为负对照,用 $w = 1\%$ 的琼脂糖凝胶对 PCR 产物进行电泳并照相。

2 结果与分析

2.1 不同提取方法和不同生长时期甘蔗 DNA 浓度与质量比较

2.1.1 DNA 提取方法的比较 采用紫外分光光度法分别检测 3 种方法提取的甘蔗基因组 DNA 的纯度,结果见表 1。从表 1 可以看出,CTAB 法提取 DNA 的 OD_{260}/OD_{230} 值为 1.83 ~ 2.01,说明 CTAB 法提取 DNA 能有效去除多糖类物质;SDS 法提取的 DNA 质量浓度为 3.7 ~ 5.3 mg · L⁻¹,CTAB 法提取的 DNA 质量浓度为 3.4 ~ 4.8 mg · L⁻¹,说明 SDS 法提取 DNA 较 CTAB 法的得率高;CTAB-SDS 法提取 DNA 的 OD_{260}/OD_{230} 值为 1.91 ~ 2.21, DNA 质量浓度为 4.3 ~ 7.0 mg · L⁻¹,均比 SDS 法和 CTAB 法的高,为 3 种方法中最佳,但 CTAB-SDS 法的缺点是步骤较多,耗时耗药品,花费的周期较长。

表 1 不同时期甘蔗和不同方法提取 DNA 的纯度比较

时期与方法	OD_{260}/OD_{280}	OD_{260}/OD_{230}	DNA/(mg · L ⁻¹)
幼苗期 CTAB 法	1.68 ~ 1.93	1.89 ~ 2.01	3.7 ~ 4.8
成熟期 CTAB 法	1.58 ~ 1.92	1.83 ~ 1.97	3.4 ~ 4.2
幼苗期 SDS 法	1.71 ~ 1.96	1.73 ~ 1.98	4.9 ~ 5.3
成熟期 SDS 法	1.62 ~ 1.95	1.69 ~ 1.93	3.7 ~ 5.2
幼苗期 CTAB-SDS 法	1.74 ~ 1.81	1.97 ~ 2.21	5.5 ~ 7.0
成熟期 CTAB-SDS 法	1.67 ~ 1.94	1.91 ~ 2.13	4.3 ~ 6.5

2.1.2 提取甘蔗 DNA 的琼脂糖凝胶电泳分析结果 CTAB 法获得的幼苗期甘蔗基因组 DNA 条带较平整、清晰,且有部分拖尾现象,含有较多的蛋白质和多糖等杂质(见图 1);SDS 法获得的幼苗期植株甘蔗基因组 DNA 条带平整、清晰,拖尾现象不明显,含有较少的蛋白质和多糖等杂质(见图 2);SDS-CTAB 法获得的幼苗期植株甘蔗基因组 DNA 条带平整、清晰,无拖尾现象,完整性较好,RNA 去除效果较好,蛋白质和多糖等杂质较少(见图 3)。

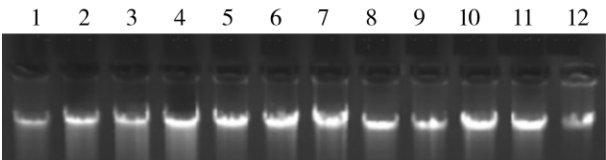


图 1 CTAB 法提取的幼苗期甘蔗转化植株基因组 DNA

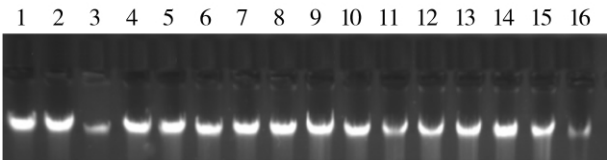


图 2 SDS 法提取的幼苗期甘蔗转化植株基因组 DNA

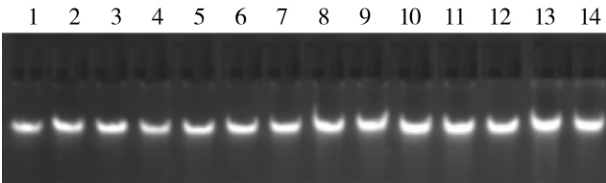


图 3 CTAB-SDS 法提取的幼苗期甘蔗转化植株基因组 DNA

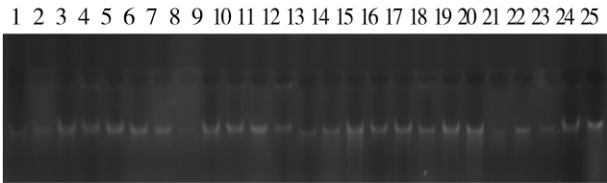


图 4 CTAB 法提取的成熟期甘蔗转化植株基因组 DNA

CTAB 法获得的成熟期甘蔗基因组 DNA 条带较暗,有部分拖尾现象,含有相对较多的蛋白质和多糖等杂质(见图 4); SDS 法获得的成熟期植株甘蔗基因组 DNA 条带较暗、平整,拖尾现象不明显,含有较少的蛋白质和多糖等杂质(见图 5); SDS-CTAB 法获得的成熟期植株甘蔗基因组 DNA 条带平整、清晰,无拖尾现象,完整性较好, RNA 去除效果较好,蛋白质和多糖等杂质较少(见图 6)。

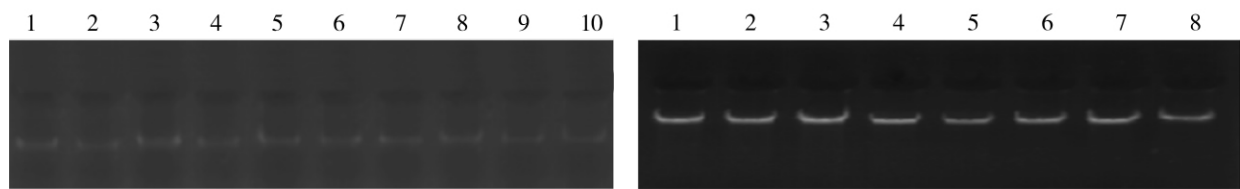


图 5 SDS 法提取的成熟期甘蔗转化植株基因组 DNA 图 6 CTAB-SDS 法提取的成熟期甘蔗转化植株基因组 DNA

2.2 转化甘蔗植株 PCR 检测结果 利用 CTAB 法提取的幼苗期甘蔗抗性植株基因组 DNA 为模板进行 PCR 检测,结果见图 7。从图 7 中可以看出,有 20 株能扩增到与目的片段大小一致的条带,且条带特异性较好,无杂带。利用 CTAB 法提取的田间成熟期甘蔗植株基因组 DNA 为模板进行 PCR 检测,结果见图 8。从图 8 中可知,有 15 株能扩增到与目的片段大小一致的条带,但目的 DNA 的条带较弱,且下方出现 2 条非特异性条带。



图 7 以 CTAB 法提取的幼苗期甘蔗抗性植株基因组 DNA 的 PCR 检测

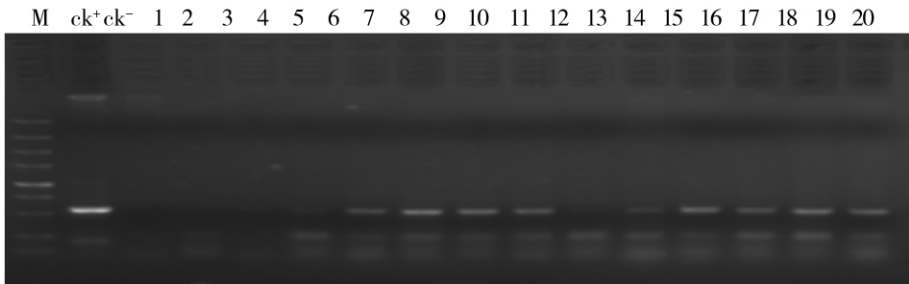


图 8 以 CTAB 法提取的田间成熟期甘蔗抗性植株基因组 DNA 的 PCR 检测

利用 SDS 法提取的幼苗期甘蔗抗性植株基因组 DNA 为模板进行 PCR 检测,结果见图 9。从图 9 中可以看出,有 17 株能扩增到与目的片段大小一致的条带,且条带特异性较好,无杂带。利用 SDS 法提取的田间成熟期甘蔗抗性植株基因组 DNA 为模板进行 PCR 检测,结果见图 10。从图 10 中可以看出,有 15 株能扩增到与目的片段大小一致的条带,但与幼苗期抗性植株 PCR 相比较弱。

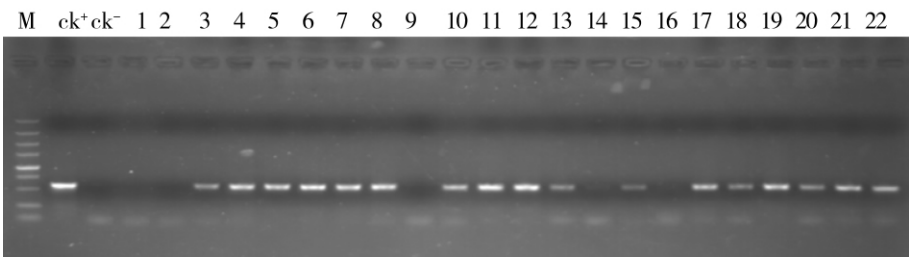


图 9 以 SDS 法提取的幼苗期甘蔗抗性植株基因组 DNA 的 PCR 检测

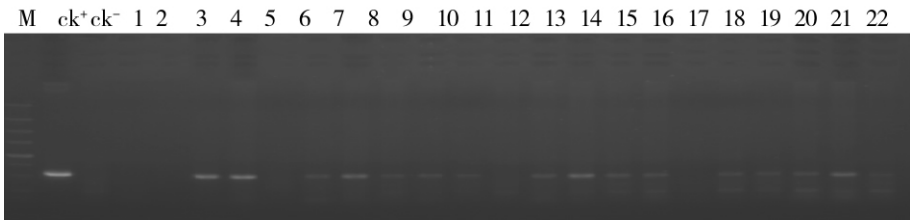


图 10 以 SDS 法提取的田间成熟期甘蔗抗性植株基因组 DNA 的 PCR 检测

利用 CTAB-SDS 法提取的幼苗期甘蔗抗性植株基因组 DNA 为模板进行 PCR 检测,结果见图 11。从图 11 中可以看出,有 18 株能扩增到与目的片段大小一致的条带,其中 15 株条带特异性较好,基本无杂带。利用 CTAB-SDS 法提取的田间成熟期甘蔗抗性植株基因组 DNA 为模板进行 PCR 检测,结果见图 12。从图 12 中可以看出,有 19 株能扩增到与目的片段大小一致的条带,其中 13 株条带特异性较好,无杂带。

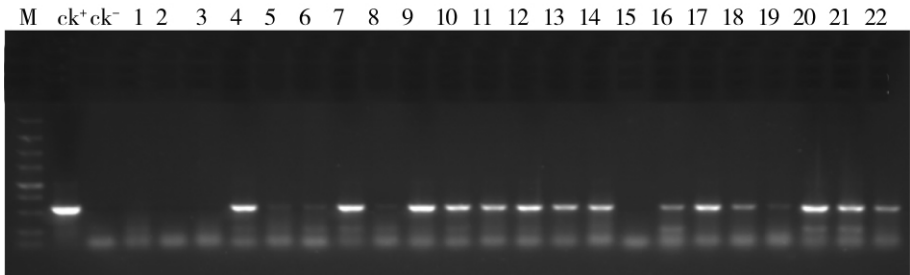


图 11 以 CTAB-SDS 法提取的幼苗期甘蔗抗性植株基因组 DNA 的 PCR 检测

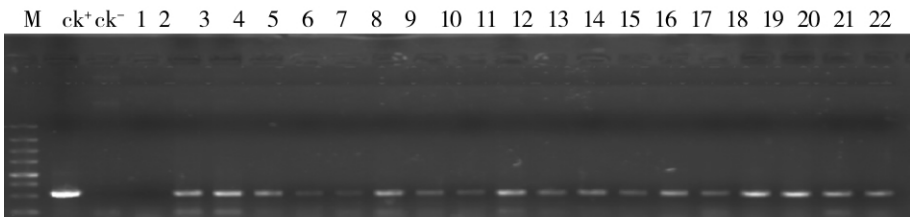


图 12 以 CTAB-SDS 法提取的田间成熟期甘蔗抗性植株基因组 DNA 的 PCR 检测

综上所述,转基因甘蔗抗性植株在幼苗期较容易进行 PCR 检测,且扩增片段特异性较好,扩增产物浓度高,CTAB 法、SDS 法和 CTAB-SDS 法均能满足幼苗期甘蔗抗性植株的 PCR 检测。采用 SDS 法和 CTAB-SDS 法提取的甘蔗基因组 DNA 纯度较 CTAB 法高,且提取率高,PCR 效果较好,但 CTAB-SDS 法提取甘蔗基因组 DNA 操作步骤多,耗时耗药品,花费的周期比较长。因此,在甘蔗幼苗期可采用 SDS 法提取甘蔗基因组 DNA 进行 PCR 检测。而对田间成熟植株进行 PCR 检测时,以 CTAB 法、SDS 法提取的甘蔗 DNA 为模板时,扩增的目的条带较弱,且容易出现非特异性条带;以 CTAB-SDS 法提取的甘蔗 DNA 为模板时,PCR 效果较好,故 CTAB-SDS 方法适用于田间成熟期甘蔗抗性植株基因组 DNA 的提取。

4 讨 论

笔者探索了模板 DNA 质量对转基因甘蔗植株 PCR 检测的影响,结果表明,幼苗时期 PCR 检测易于田间成熟植株,可能是由于甘蔗幼苗时期产生的多糖多酚以及纤维等物质较成熟植株少,且其细胞壁较成熟植株的易裂解之缘故。但幼苗时期甘蔗抗性植株在培养基中培养,可能会引起农杆菌污染造成 PCR 的假阳性,所以可以把幼苗时期的 PCR 结果作为初筛,待田间成熟时期再进行复筛,这样可以有效减少 PCR 的假阳性植株。

利用 3 种方法提取甘蔗 DNA,进行转基因甘蔗的 PCR 检测是经过本实验室多个不同转基因的抗性植株进行验证的。甘蔗幼苗期采用 SDS 法提取甘蔗基因组 DNA 为模板,而田间成熟植株则采用 CTAB-SDS

法提取的 DNA 为模板进行 PCR 检测,具有良好的检测结果。因此,该系列方法同样适用于其他类型的甘蔗转基因植株的 PCR 检测。本研究发现模板 DNA 质量是 PCR 分子检测的关键因素之一。与拟南芥、烟草等模式植物相比,甘蔗转基因植株的 PCR 检测对模板 DNA 的质量要求更高。因此,获取高质量模板 DNA 的方法是甘蔗转基因 PCR 检测的重要环节,并为后续 Southern 检测高质量模板 DNA 的获得提供了参考。

参考文献:

- [1] 杨道理,王宝成. DNA 扩增技术与医学应用 [M]. 济南: 山东科学技术出版社,1992: 71.
- [2] 唐恩洁, HODGES E, SMITH L J. 用聚合酶链反应和地高辛系统检测 [J]. 中华医学检验杂志, 1996, 19(1): 14.
- [3] 吴转娣, 曾逢刚, 赵丽宏, 等. 甘蔗基因组 DNA 小量提取与大量提取方法研究 [J]. 生物技术通报, 2009(1): 172-175.
- [4] 吕金海, 伍贤进. 两种提取植物组织 DNA 方法的改良及结果比较 [J]. 农业与技术, 2005, 25(2): 64-65.
- [5] DELLAPORTA S L, WOOD J, HICKS J B. A Plant DNA Miniprep [J]. Plant molecular biology reporter, 1983, 1(4): 19-21.

Effects of DNA Extraction Methods on Transgenic Sugarcane PCR Detection

WANG Xiao-yin¹, ZHAO Ting-ting¹, FENG Cui-lian², ZHANG Shu-zhen²

(1. College of Agriculture, Hainan University, Haikou 570228, China; 2. Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, CATAS/Ministry of Agriculture Key Biotechnology Laboratory for Tropical Crops, Haikou 571101, China)

Abstract: The effects of three template DNA extraction methods from different growth stages on transgenic sugarcane PCR detection were compared. The results indicated that the quality of DNA extracting from seedling leaves was better than that of mature plants and mature stage, and PCR detections were easier; DNA extracted from sugarcane leaves with CTAB method, SDS method and CTAB-SDS method were all suitable for PCR detection of resistant plants in seedling stage. The quality of DNA extracted with CTAB-SDS method was the best for PCR detection of resistant plants in mature stage.

Key words: transgenic sugarcane; DNA extraction; PCR