



中华人民共和国国家标准

GB/T 30988—2014

多酚类植物基因组 DNA 提取纯化 及测试方法

Methods of genomic DNA extraction from plants with high levels of polyphenols

2014-07-24 发布

2015-03-01 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局 发布
中国国家标准化管理委员会

目 次

前言 Ⅲ

1 范围 1

2 规范性引用文件 1

3 缩略语 1

4 原理 1

5 实验室通用要求 2

6 试剂与溶液 2

7 仪器和设备 2

8 提取步骤 3

9 DNA 纯度、浓度测试 4

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由中国测试技术研究院提出。

本标准由全国生化检测标准化技术委员会 (SAC/TC 387) 归口。

本标准起草单位:中国测试技术研究院、中测测试科技有限公司。

本标准主要起草人:谭和平、沈兴中、唐祥凯、周李华、孙登峰。

多酚类植物基因组 DNA 提取纯化 及测试方法

1 范围

本标准规定了以茶树为代表的多酚类植物基因组 DNA 提取纯化方法以及 DNA 纯度、浓度测试方法。

本标准适用于茶树、马铃薯、樱桃、葡萄以及其他富含多酚类的植物的植物基因组 DNA 提取及纯化。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

GB/T 6682—2008 分析实验室用水规格和实验方法

GB/T 19495.3—2004 转基因产品检测 核酸提取纯化方法

3 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

Tris:三(羟甲基)氨基甲烷

SDS:十二烷基磺酸钠

PVP:聚乙烯吡咯烷酮

RNase A:核糖核酸酶 A

FF:二甲苯青

EDTA:乙二胺四乙酸

TE:三(羟甲基)氨基甲烷 - 乙二胺四乙酸

4 原理

4.1 提取纯化

在液氮条件中,通过物理研磨方法破碎多酚类植物叶片的细胞,利用抗氧化剂防止多酚类化合物氧化褐变,同时利用聚乙烯吡咯烷酮(PVP)的粘接性去除多酚类化合物及其他次生代谢物等杂质,然后利用化学方法使 DNA 从植物细胞中释放出来,再弃除 DNA 中的蛋白质等杂质,以及 DNA 提取过程中加入的异戊醇、异丙醇、乙醇等有机溶剂,最后得到纯的 DNA。

4.2 纯度测试

在 pH 7~8.5 下,根据 DNA 在 260 nm 处有吸收高峰,蛋白质在 280 nm 处有吸收高峰,硫氰酸盐、碳水化合物(糖类)在 230 nm 处有吸收高峰,酚类物质在 270 nm 处有吸收高峰的特性,利用 A_{260}/A_{280} 、

A_{260}/A_{230} 、 A_{260}/A_{270} 的比值来评估 DNA 样品的纯度。然后利用 $A_{260}=1$ 相当于 $50\text{ }\mu\text{g/mL}$ 的双链 DNA 来计算 DNA 的浓度。

利用荧光染料(如溴化乙啶)可与琼脂糖凝胶中的 DNA 嵌合,在紫外源激发下发出荧光的特性,通过观察 DNA 条带是否单一、清晰、明亮来评估 DNA 样品的纯度。

5 实验室通用要求

按照 GB/T 19495.3—2004 第 4 章中实验室通用要求的规定执行。

6 试剂与溶液

6.1 本标准所使用的水均为一级水,符合 GB/T 6682—2008 的要求。除非另有说明,在分析中仅使用分析纯试剂,所有试剂溶液宜大体积配制、小体积分装后经高压灭菌后使用,不宜高压灭菌的试剂应用 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 膜过滤除菌;酶溶液应避免反复冻融。

6.2 葡萄糖(glucose, $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$)。

6.3 焦亚硫酸钠(sodium pyrosulfite, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$)。

6.4 聚乙烯吡咯烷酮[polyvinylpyrrolidone, PVP, $(\text{C}_5\text{H}_9\text{NO})_n$]。

6.5 β -巯基乙醇(β -mercaptoethanol, $\text{HOCH}_2\text{CH}_2\text{SH}$)。

6.6 十二烷基磺酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS, $\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{O}_4\text{SN}$)。

6.7 乙二胺四乙酸二钠(ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt, Na_2EDTA , $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_8\text{Na}_2$)。

6.8 三(羟甲基)氨基甲烷[tris (hydroxymethyl) methyl aminomethane, Tris, $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$]。

6.9 无水乙醇(alcohol, $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$), $4\text{ }^\circ\text{C}$ 保存及使用。

6.10 氯化钠(sodium chloride, NaCl)。

6.11 三氯甲烷(chloroform, CHCl_3)。

6.12 异丙醇[isopropyl alcohol, $\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$]。

6.13 异戊醇[isoamyl alcohol, $(\text{CH}_3)_2\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$]。

6.14 乙酸钠(sodium acetate, NaAc)溶液: 3 mol/L , 用乙酸调 pH 至 5.2, 不要高压灭菌($0.22\text{ }\mu\text{m}$ 膜过滤)。

6.15 氯仿: 异戊醇: 乙醇溶液(80:4:16)。

6.16 DNA 提取液 I: 100 mmol/L Tris-Cl, 20 mmol/L EDTA, 500 mmol/L NaCl, 1.5% SDS。

6.17 DNA 提取液 II: 18.6 g 葡萄糖, 6.9 g $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$, 6.0 g PVP, $240\text{ }\mu\text{L}$ β -巯基乙醇, 加水至 300 mL 。

6.18 TE 缓冲液(pH 8.0): 10 mmol/L Tris-Cl, 1 mmol/L EDTA, 使用 HCl 或 NaOH 调节 pH。

6.19 RNase A 酶溶液: 10 mg/mL , $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 保存, 避免反复冻融。

6.20 70% 乙醇溶液: $4\text{ }^\circ\text{C}$ 保存及使用。

6.21 $10\times$ 上样缓冲液: 含 0.25% 溴酚蓝, 0.25% 二甲苯青 FF, 30% 甘油水溶液。

7 仪器和设备

7.1 冷冻研磨机(样品冷冻, 研磨都处于液氮条件下)。

7.2 离心机(可以在 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 下进行离心, 离心转速 $10\text{ }000\text{ r/min}$ 以上)。

7.3 水浴锅(工作范围 $60\text{ }^\circ\text{C}\sim 70\text{ }^\circ\text{C}$)。

7.4 涡旋器。

7.5 平板电泳仪。

7.6 凝胶成像系统。

7.7 可调移液器(0.5 μL ~10 μL , 10 μL ~1 000 μL , 100 μL ~1 000 μL , 0.5 mL~5 mL)。

7.8 紫外分光光度计。

7.9 天平(精度为 0.1 mg)。

8 提取步骤

多酚类植物基因组 DNA 提取按下述步骤进行：

- a) 取植物新鲜嫩叶,用无菌超纯水冲洗 1 min,70%乙醇消毒 2 min,最后用无菌超纯水冲洗 2 min,无菌吸水纸吸干水分,称取约 0.5 g(精确至 0.1 mg)。
- b) 将干净的样品放于灭菌的样品研磨瓶中,按表 1 研磨机研磨条件将样品研磨成粉状,迅速用无菌玻棒将磨碎的样品转移至预冷的含有 5 mL DNA 提取液 II 的 15 mL 离心管中,加入 0.09 g $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$,0.2 g PVP,500 μL β -巯基乙醇,颠倒混匀,于 4 $^{\circ}\text{C}$ 下以 5 000 r/min 离心 5 min。

表 1 研磨机研磨条件

步骤	时间
预冷	2 min
研磨	1 min
频率	12 次/s

- c) 去上清液,加入 5 mL 预热至 65 $^{\circ}\text{C}$ 的 DNA 提取液 I,温和颠倒混匀,65 $^{\circ}\text{C}$ 温浴 1 h,温浴期间每 10 min 摇动混匀一次。
- d) 将离心管放置于冰上冷却,加入 1 mL 预冷的 NaAc 溶液。
- e) 混匀后加入 5 mL 氯仿:异戊醇:乙醇溶液,温和颠倒混匀(需带手套,防止损伤皮肤),冰上静置 5 min~10 min,使水相和有机相分层(必要时可重新混匀)。在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下以 10 000 r/min 离心 10 min,仔细移取上清液至一无菌 15 mL 离心管中,重复该步骤。
- f) 向抽提得到的上清液中加入等体积异丙醇,温和倒转数次使之混匀,-20 $^{\circ}\text{C}$ 放置 20 min,出现絮状 DNA 沉淀。
- g) 将絮状 DNA 沉淀转入含 600 μL TE 的无菌离心管中(如 DNA 不形成絮状沉淀,则可在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下以 10 000 r/min 离心 5 min,再将沉淀移入 TE 管中。这样收集的沉淀,往往难溶解于 TE,可在 60 $^{\circ}\text{C}$ 水浴放置 15 min 以上,以帮助溶解)。
- h) 加入 RNase A 溶液至 RNase A 终浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$,37 $^{\circ}\text{C}$ 温浴 30 min;加入 0.1 g PVP,加入等体积的氯仿:异戊醇:乙醇溶液,温和颠倒混匀,10 000 r/min 离心 10 min。
- i) 取上清液于 1.5 mL 灭菌离心管内,重复抽提一次。
- j) 向抽提得到的上清液中加入 1/10 体积的 NaAc 溶液,加入 2 倍体积预冷的无水乙醇,混匀,-20 $^{\circ}\text{C}$ 放置 20 min 左右。
- k) 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下以 10 000 r/min 离心 10 min,弃上清液,加入 1 mL 70%乙醇,温和颠倒离心管数次,洗涤沉淀,重复该步骤 2 次。
- l) 向沉淀加入 500 μL 预冷的无水乙醇,在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下以 10 000 r/min 离心 5 s~8 s。
- m) 弃去乙醇溶液,将离心管开盖放置于室温下,待乙醇挥发干后将 DNA 重溶解于 200 μL TE 缓冲液中。

9 DNA 纯度、浓度测试

9.1 紫外分光光度法

将待测 DNA 溶液进行稀释,使样品溶液在 260 nm 处的吸收值为 0.1~0.5,以 TE 缓冲液做参比,测定样品溶液在 260 nm、280 nm、230 nm、270 nm 处的吸收值,计算 A_{260}/A_{280} , A_{260}/A_{230} , A_{260}/A_{270} 的比值, A_{260}/A_{280} 为 1.8~1.9, $A_{260}/A_{230} > 2.0$, A_{260}/A_{270} 为 1.1~1.3 的 DNA 样品可视为较纯 DNA。

符合上述要求后,利用 $A_{260}=1$ 相当于 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的双链 DNA 来计算 DNA 的浓度,依据测得的浓度将 DNA 稀释到 50 $\text{ng}/\mu\text{L}$ ~100 $\text{ng}/\mu\text{L}$, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

注:因基因组 DNA 不宜反复冻融,建议将所得 DNA 进行多管分装,使用时取出,融化后立刻使用,使用结束后,剩余的 DNA 放于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱短期保存,时间不宜超过 14 d。

9.2 琼脂糖凝胶电泳法

取 2 μL ~5 μL DNA 样品溶液与 1 μL 10 $\times$ 上样缓冲液混合,用超纯水补齐至 10 μL ,在 0.7% 琼脂糖凝胶中以 3 V/cm~5 V/cm 恒压条件下电泳 40 min,用凝胶成像系统观察 DNA 条带,要求所得 DNA 条带单一、清晰、明亮,同时可利用发出的荧光强度与 DNA 的浓度或质量成线性关系的特性,通过比较待测 DNA 条带与已知浓度 DNA 条带的亮度,测定待测 DNA 样品的浓度。
