

宁夏枸杞线粒体 DNA 提取方法的研究

刘建利

(北方民族大学 生命科学与工程学院, 宁夏 银川 750021)

摘要: 探讨了宁夏枸杞线粒体 DNA 提取中线粒体分离、纯化、裂解、线粒体 DNA (mtDNA) 提取等步骤, 建立了一种分离提取高质量枸杞 mtDNA 的方法。以幼嫩叶片为材料, 榨汁机破碎组织和细胞, 采用 2 000 g/10 min, 15 000 g/20 min, 12 000 g/20 min 差速离心法分离出线粒体, Sarkosyl 和 CTAB 两步裂解、抽提后获得纯度高、污染少、电泳条带清晰 mtDNA。

关键词: 枸杞; 线粒体 DNA

中图分类号: S 665.9; Q 946.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2008)12-0153-02

线粒体是真核细胞的半自主性细胞器。植物线粒体 DNA (mtDNA) 通常由一群环状或线状 DNA 分子组成, 在一个线粒体通常含几个 mtDNA, 是一个相对独立的遗传单位, 主要编码一些与呼吸相关的酶和蛋白质^[1]。mtDNA 分子之间、mtDNA 与核 DNA、叶绿体 DNA 间经常存在交流, 大量研究表明, mtDNA 的突变与作物的雄性不育密切相关^[2,3]。快速、高效分离提取高质量的 mtDNA, 是研究 mtDNA 与雄性不育的基础, 关于作物和蔬菜 mtDNA 分离提取方法报道较多^[4,6], 而关于宁夏枸杞 (*Lycium barbarum* L.) mtDNA 的提取方法未见报道。现将报道一种快速、高效分离提取高质量枸杞 mtDNA 的提取方法, 为进一步深入研究线粒体 DNA 与枸杞雄性不育的关系打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料

宁夏枸杞品种为“宁杞 1 号”, 来自北方民族大学实验基地。

1.2 方法

1.2.1 线粒体的分离与纯化 采集新鲜幼嫩叶片 15 g 左右, 蒸馏水洗涤 2~3 次, 晾干。将干净叶片加入 60 mL 缓冲液 (山梨醇 0.5 mol/L, Tris-Cl (pH=8.0) 50 mmol/L, EDTA (pH=8.0) 5 mmol/L, BSA 0.1%, PVP 1% (临用时加入), β -巯基乙醇 2.5% (临用时加入)) 用榨汁机破碎 45 s。用 4 层无菌纱布过滤研磨好的样液, 并将滤液分装于 50 mL 无菌离心管中, 750 g 离心 10 min, 收集上清液, 取 1 滴做水装片显微镜下检查细胞破碎情况; 将上清液按表 1 差速离心分离线粒体 2 次; 得到的粗线粒体沉淀 10 mL 用清洗液 (NaCl 150 mmol/L,

Tris-Cl (pH=8.0) 50 mmol/L, EDTA (pH=8.0) 25 mmol/L, PVP 1% (临用时加入), β -巯基乙醇 2.5% (临用时加入), 小心向离心管底部加入等体积 0.6 mol/L 的蔗糖溶液, 12 000 g 离心 15 min, 收集沉淀, 重复两次, 即为较纯的线粒体, 向所得线粒体沉淀中加入 2 mL TE 缓冲液 (Tris-Cl (pH=8.0) 5 mmol/L, EDTA (pH=8.0) 2 mmol/L) 悬浮沉淀, 取 1 滴悬浮液詹纳斯绿 B 染色后显微镜下检查所得线粒体的量及纯度^[7]。

表 1 不同离心力分离线粒体

组号	第 1 次离心		第 2 次离心		第 3 次离心	
	离心力/g	时间/min	离心力/g	时间/min	离心力/g	时间/min
1	1 000	10	10 000	20	8 000	20
2	1 000	10	15 000	20	12 000	20
3	2 000	10	10 000	20	8 000	20
4	2 000	10	15 000	20	12 000	20
5	3 000	10	10 000	20	8 000	20
6	3 000	10	15 000	20	12 000	20

1.2.2 mtDNA 的分离与提取 在 1.2.1 所得悬液中按表 2 加入裂解液并裂解。加入等体积氯仿/异戊醇 (24:1) 混匀, 室温混合 10 min 后, 于 12 000 g 离心 5 min, 取上清液, 重复 2 次, 转移上清至新管, 上清液加入 2~3 倍体积的无水乙醇, -20℃ 沉淀 2 h, 15 000 g 离心 15 min, 轻轻倒掉上清液, 用吸水纸吸干, 用 70% 的酒精洗涤沉淀, 将沉淀风干, 将沉淀溶于 20 μ L 无菌水中, 充分溶解并加入 1 μ L 5 mg/mL RNase 酶液, 于 37℃ 保温 1 h, 加入 3 倍体积的 -20℃ 预冷的乙醇, 轻轻混匀, 15 000 g 离心 10 min, 轻轻倒掉上清, 用吸水纸吸干, 用 70% 的酒精洗涤沉淀, 将所得 DNA 风干, 加入 40 μ L 无菌水溶解, 即为高纯度的线粒体 DNA, -20℃ 保存, 备用。反应条件: 细胞器裂解液 A (Sarkosyl 15%, Tris-Cl (pH=8.0) 25 mmol/L, EDTA (pH=8.0) 10 mmol/L, PVP 1% (临用时加入), β -巯基乙醇 2.5% (临用时加入), 0℃ 保温 45 min; 细胞器裂解液 B (CTAB 5%, EDTA (pH=8.0) 40 mmol/L, NaCl 1.4 mol/L, Tris-Cl (pH=8.0) 50 mmol/L, PVP 1% (临用时加入), β -巯基乙醇 2.5% (临用时加入), 65℃ 保温 45 min, 期间颠倒数次; 细

作者简介: 刘建利 (1973-), 男, 硕士, 讲师, 主要从事植物和微生物分子生物学研究工作。E-mail: ljl7523@126.com。

基金项目: 宁夏自然科学基金资助项目 (NZ20690)。

收稿日期: 2008-07-24

胞器裂解液 C (SDS 5%, EDTA 10 mmol/L, Tris -Cl (pH 8.0) 25 mmol/L) 65°C 保温 30 min, 期间颠倒数次。

表 2 不同裂解液裂解线粒体

组号	试剂/ μ L		
	细胞器裂解液 A	细胞器裂解液 B	细胞器裂解液 C
1	500	0	0
2	0	500	0
3	0	0	500
4	0	500	500
5	500	0	500
6	500	500	0
7	500	500	500

1.2.3 mtDNA 的检测 分别用紫外分光光度法和琼脂糖凝胶电泳法检测所得 mtDNA 的量及纯度^[8]。

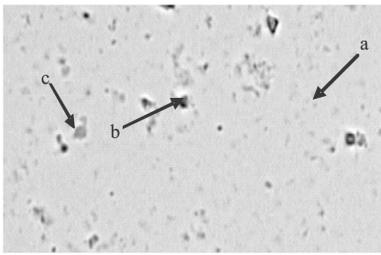


图 1 破碎样品水装片 (10×10)

注: a 线粒体; b 组织、细胞碎片; c 叶绿体。

2 结果与分析

2.1 破碎组织和细胞

有效的破碎组织和细胞, 但不破坏细胞内的细胞器, 尤其是细胞核、线粒体和叶绿体等含 DNA 的细胞器以及溶酶体等含酶的细胞器, 是高质量提取 mtDNA 的前提条件。现在缓冲液保护下采用榨汁机快速破碎组织和细胞, 结果如图 1, 组织和细胞破碎较为充分, 细胞器结构依然保持完整。

2.2 分离纯化线粒体

不同的离心力分离获得线粒体结果表 3, 第 1 组、第 2 组分离到的线粒体虽然产量较高, 但是纯度较差; 第 3 组、第 5 组、第 6 组分离到的线粒体较少; 只有第 4 组分离到的线粒体不但产量高, 且纯度较好, 结果见图 2 染色后无叶绿体、细胞核等其它细胞器污染, 浓度约为 1.16×10^8 个/mL, 可满足下一步 mtDNA 提取的需要, 因此 2 000 g/10min, 15 000 g/20min, 12 000 g/20min 差速离心分离线粒体效果最佳。

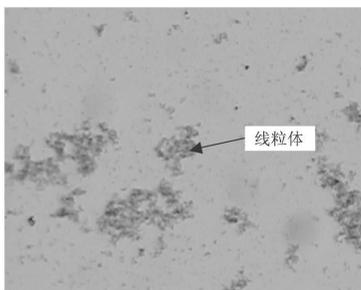


图 2 差速离心法分离线粒体 (40×10)

表 3 不同离心力获得线粒体的数量

组号	线粒体数量/ $\times 10^8$ 个 \cdot mL ⁻¹	叶绿体
1	0.82	有
2	1.28	有
3	0.34	无
4	1.16	无
5	0.06	无
6	0.22	无

2.3 mtDNA 的检测

7 组裂解液裂解线粒体后提取 DNA 琼脂糖电泳结果如图 3 第 6 组合分离到的线粒体 DNA 产量最高、纯度最好, 没有降解, 条带清晰, 无核 DNA 和叶绿体 DNA 污染, 大小约为 20 kb。用紫外吸收光度测定该方法提取的 mtDNA 纯度高, 其 A260/A280 约 1.6 A260/A230 约 2.1, 样品平均浓度为约 2.0 μ g/ μ L, 因此 Sarkosyl 和 CTAB 两步裂解为线粒体最好裂解方法。

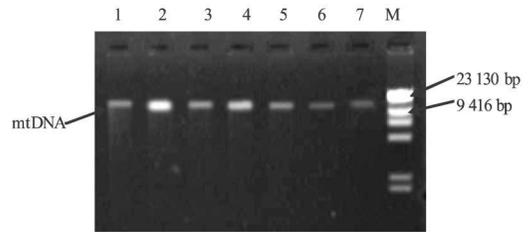


图 3 mtDNA 电泳检测图

注: M; Lamda DNA Marker; 1~7; 7 组裂解液裂解线粒体后提取的 mtDNA 样品。

3 讨论

Sarkosyl 和 CTAB 是一种去污剂, 裂解质膜, 同时可以通过选择性沉淀很好的去除糖类物质, 对于含糖较高的植物材料一般用优先^[8]。试验中采用 Sarkosyl 和 CTAB 两步法裂解线粒体, 可最大限度获得 DNA, 同时又方便下步骤除去多糖和蛋白。

传统的方法采用蔗糖密度梯度或氯化铯密度梯度超速离心 2 次密度梯度离心提取 mtDNA^[4-6, 8], 其成本高, 操作复杂, 耗时长, 不宜广泛应用。现利用差速离心法分离纯化线粒体, Sarkosyl 和 CTAB 沉淀、氯仿/异戊醇反复抽提、RNA 酶解等步骤分离纯化 mtDNA, 简单、省时, 整个提取过程可在 4~5 h 内完成, 不需要超速离心机实验设备, 适用于普通实验室的操作。

参考文献

- [1] 孟紫强. 线粒体 DNA 及其表达研究进展[J]. 生命的化学, 2001, 21(6): 500-502.
- [2] 熊庆, 刘作易, 喻子牛. 线粒体 DNA 的研究与应用[J]. 西南农业学报, 2002, 15(3): 111-116.
- [3] 郝岗平, 陈敏, 杨清. 植物线粒体与细胞质雄性不育研究进展[J]. 植物学通报, 2003, 20(5): 549-557.
- [4] 李文强, 张改生, 汪奎, 等. 小麦线粒体 DNA 提取方法遗传[J]. 遗传, 2007, 29(6): 771-775.
- [5] 涂王君, 朱英国. 水稻线粒体 DNA 的提取与分析[J]. 氨基酸和生物资源, 1997, 19(3): 4-7.
- [6] 史公军, 王彦华, 侯喜林. 不结球白菜线粒体 DNA 的提取及分析[J]. 西北农业学报, 2004, 13(1): 52-54.
- [7] 杨汉民. 细胞生物学实验[M]. 2 版. 北京: 高等教育出版社, 1997: 63.
- [8] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程[M]. 2 版. 北京: 科学出版社, 2004.