

适于木瓜属植物 AFLP 分析用 DNA 提取方法研究

陈红¹, 张雷¹, 吕晓贞², 孙永山³, 郑林¹, 臧德奎¹

(1. 山东农业大学 林学院 山东 泰安 271018; 2. 杭州市园林绿化工程有限公司, 浙江 杭州 310016; 3. 东营市东营区城市管理局, 山东 东营 257000)

摘要: 利用改进的 CTAB 法提取了 29 个木瓜属品种的基因组 DNA, 并进行了 AFLP 分析。结果表明: 该方法提取的 DNA 溶液无色透明, 紫外分光光度计测得 A_{260}/A_{280} 值为 1.8~2.0, 0.8% 琼脂糖胶电泳为清晰的一条带, RNA 去除干净, 无降解现象; AFLP 分析条带清晰, 多态性好。说明该方法完全适于 AFLP 分析。

关键词: 木瓜属; DNA 提取; AFLP

中图分类号: S 685.99; Q 946.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2008)12-0161-03

木瓜属 (*Chaenomeles*) 植物属于蔷薇科, 是重要的观赏和药用植物。近些年, 国内外学者对其进行了栽培繁殖、形态分类、孢粉学分类、数量分类、观赏特性、化学成分及提取和药用食用价值等方面的研究^[1-7], 但其叶片 DNA 提取比较困难。目前尚无该类植物的 AFLP 分子标记方面的研究。为此, 进行了木瓜叶片 DNA 提取的研究, 并总结出适宜 AFLP 分析用的木瓜基因组 DNA 提取的有效方法。AFLP 试验成功的关键是高质量的基因组 DNA 的制备, 但由于木瓜属植物的叶片内多酚类物质及多糖等次生代谢物质及色素等干扰物质, 直接影响了 Taq-DNA 聚合酶的活性, 常导致扩增反应失败⁸。经研究, 总结了一种适于该类植物 AFLP 分析用的 DNA 提取方法, 为 AFLP 技术有效地用于其系统进化及亲缘关系的研究提供依据。

1 材料与方法

1.1 试材

试材来自山东农业大学木瓜种质资源圃(泰安)和山东省临沂市河东区。共 29 个品种, 分别为: ‘醉杨妃’ *C. cathayensis* ‘Zui Yangfei’; ‘罗扶’ *C. cathayensis* ‘Luofu’; ‘长俊’ *C. cathayensis* ‘Changjun’; ‘一品香’ *C. cathayensis* ‘Yipin Xiang’; ‘报春’ *C. speciosa* ‘Baochun’; ‘多彩’ *C. speciosa* ‘Toyo Nishiki’; ‘凤凰木’ *C. speciosa* ‘Fenhuang Mu’; ‘红星’ *C. speciosa* ‘Hongxing’; ‘红霞’ *C. speciosa* ‘Hongxia’; ‘夕照’ *C. speciosa* ‘Xizhao’; ‘猩红与金黄’ *C. × superba* ‘Crimson and

Gold’; ‘长寿乐’ *C. × superba* ‘Changshoule’; ‘绿宝石’ *C. × superba* ‘Lü Baoshi’; ‘紫衣’ *C. × superba* ‘Ziyi’; ‘大富贵’ *C. × superba* ‘Da Fugui’; ‘红宝石’ *C. × superba* ‘Hong Baoshi’; ‘复长寿’ *C. × superba* ‘Fu Changshou’; ‘碧雪’ *C. × superba* ‘Bixue’; ‘沂红’ *C. × superba* ‘Yi Hong’; ‘粉蝶’ *C. × superba* ‘Fendie’; ‘红舞’ *C. × superba* ‘Hongwu’; ‘沂橙’ *C. × superba* ‘Yi Cheng’; ‘骄阳’ *C. × superba* ‘Jiaoyang’; ‘单白’ *C. japonica* ‘Danbai’; ‘单粉’ *C. japonica* ‘Dan Fen’; ‘日落’ *C. japonica* ‘Riluo’; ‘矮红’ *C. japonica* ‘Pygmaeus’; ‘日本红’ *C. japonica* ‘Rubra’; ‘四季红’ *C. japonica* ‘Siji Hong’。取嫩叶提取 DNA。

1.2 试剂

CTAB 缓冲液 2%(W/V)CTAB, 1.4 mol/L NaCl, 20 mmol/L EDTA (pH 8.0), 100 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 3% PVP-40, 5%(V/V) β -巯基乙醇。

1.3 方法

1.3.1 DNA 的提取 取幼嫩叶片 2~3 g 放入液氮预冷的研钵中, 在液氮下将嫩叶迅速研磨成粉末。立即将粉末转入 1.5 mL 离心管中, 加 700 μ L 已预热至 65 $^{\circ}$ C 的 CTAB 缓冲液, 充分混匀。在 65 $^{\circ}$ C 水浴保温 45~60 min, 其间小心颠倒摇动使之充分受热。加入等体积的 Tris-饱和酚: 氯仿: 异戊醇 (25:24:1, V/V/V), 充分混匀 10 min, 12 000 r/min 离心 10 min。取上清液于新离心管中, 加入等体积氯仿: 异戊醇 (24:1, V/V), 混匀 10 min, 12 000 r/min 离心 10 min。取上清加 1/10 体积的 NaAc (3 mol/L, pH 5.2) 和 2 倍-20 $^{\circ}$ C 预冷的无水乙醇, 并在-20 $^{\circ}$ C 冰箱内静置 5~10 min 后取出, 用枪头轻轻将沉淀钩出, 70% 乙醇反复冲洗, 干燥。加入 40 μ L 无菌水, 在室温下溶解 DNA (12 h 以上), 12 000 r/min 离心 10 min, 去除不溶解物质, 将上清液转入干净离心管中, 加入 1 μ L 无 DNA 酶的 RNase (10 mg/mL)

第一作者简介: 陈红(1983-), 女, 山东菏泽人, 硕士, 研究方向为观赏植物种质资源。E-mail: chenhong19830909@126.com.

通讯作者: 臧德奎。E-mail: zangdk@sdau.edu.cn.

基金项目: 山东省优秀中青年科学家奖励基金资助项目(2004BS06003); 山东农业大学博士基金资助项目(23215)。

收稿日期: 2008-07-30

37℃保温1~2 h, 用等体积氯仿:异戊醇(24:1, V/V)在12 000 r/min下离心10 min, 取上清。重复抽提1次, 上清液加1/10体积的NaAc(3 mol/L, pH 5.2)和2倍体积的无水乙醇, 混匀, -20℃静置10 min, 12 000 r/min离心20 min, 弃上清。75%的乙醇漂洗3次, 室温风干后用50 μL无菌水溶解, 4℃下溶解1~2 d, 4℃冰箱保存, 或-20℃长期保存。

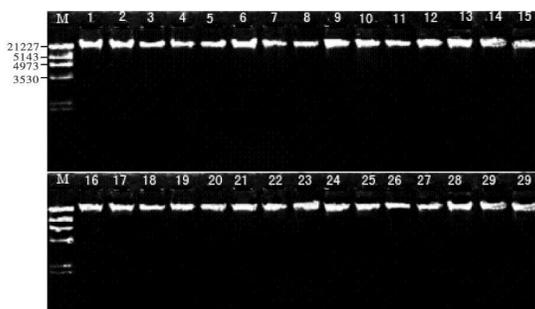


图1 木瓜品种的基因组DNA

1.3.2 DNA的质量检测 DNA紫外吸收值。天然双链DNA在260 nm处的吸收值与在280 nm处的吸收值之比应在1.8左右, 低于1.8说明可能残存蛋白质及氨基酸、酚类等小分子杂质, 高于1.8则说明提取的DNA中可能还含有RNA。取10 μL DNA溶液用TE稀释至400 μL, 在紫外分光光度计上检测DNA的浓度及纯度; DNA的电泳检测。取5 μL DNA样品, 加入2 μL Loading Buffer于0.8%琼脂糖凝胶中电泳, EB染色, 拍照, 判断DNA分子量大小及完整程度。

1.3.3 AFLP分析 按王卓伟^[9]方法进行, 并按北京鼎国公司提供的银染试剂盒及方法进行银染。

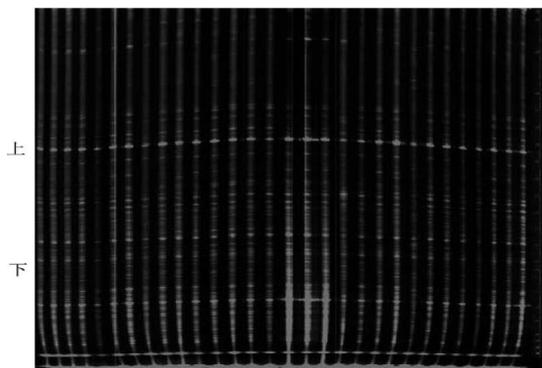


图2 29个品种的AFLP图谱; 引物组合 EcoRI-AAG + MseI-CAA

2 结果与分析

应用此改进的CTAB法提取了29个木瓜属品种的基因组DNA, 在提取过程中未出现多酚类物质的褐化现

象。获得的DNA溶液无色透明, 紫外分光光度计测得其 A_{260}/A_{280} 为1.8~2.0之间, 取10 μL DNA溶液在0.8%琼脂糖胶电泳, 结果如图1。表明所提DNA主带清晰, DNA片段比较完整, 无降解现象。利用此方法提取的DNA在引物组合EcoRI-AAG+MseI-CAA下的AFLP分析结果见图2。表明AFLP带纹相当丰富, 在不同的材料间表现出丰富的多态性。因此, 用上述方法提取的DNA质量好、纯度高, AFLP分析效果好。

2.1 抗氧化剂的作用

高质量的DNA模板制备是AFLP试验成功的关键。AFLP每个反应要求100~500 ng DNA, 如果DNA模板量不足, 或制备过程中被盐、EDTA、蛋白质等污染, 则选择性扩增产物在5%~6%的变性聚丙烯酰胺凝胶上经过电泳分离后不能形成AFLP指纹, 或显出的条带非常弱。木瓜属植物叶片含多糖、酚类物质很多, 采用一般的DNA提取方法如SDS法, 提取的DNA往往不能达到AFLP所要求的纯度, 内含杂质, 部分发生氧化, 颜色为浅褐色。这些浅褐色的非可溶性物质与DNA结合, 影响了Taq(DNA酶)的活性, 从而导致AFLP扩增失败。因此, 在提取DNA时, 必须将这些物质去除。多数报道是在提取液中加入β-巯基乙醇与水溶性PVP, 但研究发现对木瓜属植物而言这种方法效果不理想。针对该类植物叶片中多糖、多酚、色素等物质含量较高的特点, 研究采用了改良的CTAB法提取叶片DNA, 2%的CTAB裂解缓冲液中加入3%非水溶性PVP-40和5%β-巯基乙醇。非水溶性的PVP, 可防止酚类氧化为醌类, 有效去除多糖, 避免溶液变褐^[10]; β-巯基乙醇作为还原剂和抗氧化剂, 也可防止材料中的酚类氧化^[11], 将其浓度由2%提到5%, 效果更为理想。需要注意的是β-巯基乙醇、PVP-40等防止酚类物质氧化的物质, 不易久放, 应随用随配。

2.2 DNA提取方法

该研究还改进了操作流程, 进一步减少了色素和其他物质的影响, 提高了模板DNA的纯度。首先在第一次无水乙醇沉淀后, 用细玻璃棒钩出絮状沉淀, 反复漂洗, 而不是离心, 这不仅能使DNA沉淀和其他杂质分开, 而且DNA沉淀在松散状态下漂洗, 可以洗去粘附在上面的大部分色素; 其次将已充分溶解过的DNA溶液高速离心, 弃沉淀, 从而能除去附着在DNA上的不溶物; 最后, 在无水乙醇沉淀DNA时, 加入NaAc以产生大量的DNA沉淀。由于DNA在乙醇的盐溶液中的沉淀速度大于色素、多糖和酚类等物质^[12], 所以用有机溶剂沉淀DNA时间宜短, 尽可能减少共沉淀。经过以上处理, 得到的DNA经过氯仿/异戊醇(体积比为24:1)多次抽提, RNA酶去除RNA, 再经70%乙醇多次洗涤, 最终能保证获得高质量的模板DNA。经测定, 供试材料DNA

的 A_{260}/A_{280} 值在 1.8~2.0 之间。另外, 该类植物的 DNA 提取受季节干扰较严重, 最好选择春季提取。

综合上述结果看出, 该方法所提取木瓜 DNA 纯度高, 完全适于进行 AFLP 等分子生物学试验。

3 小结

改良后的 CTAB 法增加了 3% 的非水溶性 PVP 和 5% 巯基乙醇, 防止酚类物质的氧化, 并有效去除了多糖。操作流程上的改进包括用细玻璃棒钩出絮状沉淀; 无水乙醇沉淀都加入 NaAc , 以产生大量的 DNA 沉淀, 并缩短沉淀时间。这些做法均在一定程度上减少了多糖、色素、酚类物质等杂质, 提高了 DNA 的纯度和质量。

用该方法提取的 DNA 作 AFLP 分析, AFLP 带纹相当丰富, 在不同的材料间表现出丰富的多态性 AFLP 分析效果较为理想。

参考文献

- [1] 张元俊 徐兴东. 沂州海棠盆花栽培技术[J]. 落叶果树, 2003(5): 52-54.
[2] 王嘉祥. 山东皱皮木瓜品种分类探讨[J]. 园艺学报, 2004, 31(4): 520-

522.

- [3] 丁以华 田伟作, 李水福, 等. 木瓜及其伪品的紫外光谱聚类分析[J]. 中国现代应用药学杂志 2000 17(2): 114-115.
[4] 赵红霞 郭刚, 赵兰勇, 等. 沂州海棠数量分类学研究[J]. 山东农业大学学报(自然科学版), 2003, 34(3): 379-382.
[5] 陈日来 吴廷俊, 戴跃进, 等. 四种木瓜主要化学成分的比较[J]. 华西药理学杂志, 2000 15(16): 38-39.
[6] 臧德奎 王关祥 郑林, 等. 我国木瓜属观赏品种的调查与分类[J]. 林业科学, 2007, 43(6): 72-75.
[7] 吴廷俊 张浩, 熊绒先, 等. 中药木瓜的药源调查[J]. 华西药理学杂志, 1996, 11(3): 190-192.
[8] Vta P, Ingo S. Midiprep method for isolation of DNA from plants with a high content of polyphenols[J]. Nucleic Acids Res, 1993, 21(14): 3328-3330.
[9] 王卓伟. 桑树多倍体育种材料遗传背景的分析[D]. 重庆: 西南农业大学, 2001.
[10] 熊光明 梁国鲁, 阎勇, 等. 适于 AFLP 分析用的柑橘 DNA 提取方法[J]. 果树学报 2002, 19(4): 267-268.
[11] 易干军 霍合强, 蔡长河, 等. 适于 AFLP 分析用的荔 DNA 提取方法[J]. 华南农业大学学报 1999, 20(3): 123-124.
[12] 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术与原理[M]. 北京: 高等教育出版社, 1993.

DNA Extraction Method for AFLP Analysis in *Chaenomeles*

CHEN Hong¹, ZHANG Lei¹, LV Xiao-zhen², Sun Yong-shan³, ZHEN Lin¹, ZANG De-kui¹

(1. Forestry College, Shandong Agricultural University, Taian, Shandong 271018; 2. Hangzhou Park Queen Co., Ltd, Hangzhou, Zhejiang 310016, China; 3. Dongying District Management Bureau of Dongying City, Dongying, Shandong 257000, China)

Abstract: The Genomic DNA samples of 29 cultivars in the genus *Chaenomeles* were isolated by modified CTAB method and then AFLP analysis was conducted. The result indicated that the DNA extracted by this method appeared as a clear band when electrophoresed in 0.8% agarose gel, and the RNA was eliminated completely. Measured the DNA by smart spec TM 3 000, the value of A_{260}/A_{280} was 1.80~2.0. AFLP analysis indicated the primer (EcoRI-AAG + MseI-CAA) produced clear polymorphic patterns. Therefore this method could be used for extracting ideal DNA samples and be suitable for AFLP.

Key words: *Chaenomeles*; Extraction of DNA; AFLP

科学家成功将一年生植物变成多年生植物

据国外媒体报道, 一年生植物在一年之内完成其生长、开花结果和死亡过程, 而多年生植物可以过冬, 到第二年春天再度枝繁叶茂。许多一年生植物的生命策略就是萌芽后快速生长, 迅速开花结果, 因此不需更多的能量来建造永久性的生命结构。

冬季过后, 一年生植物快速发芽, 因此它们比其它植物出来早, 以消除争夺食物和光线的需要。此策略基本上让许多种子尽可能地长成了一年生植物。而多年生植物有更进化的生命策略, 以求在艰苦环境下能继续生长。它们建造了自己的永久

结构, 如可以越冬的花蕾、鳞茎和块茎。这些结构含有没有分化的细胞群, 当需要生长新的器官如茎和叶时, 它们就能迅速分化, 长成植物的各种器官。

一年生植物在开花时就消耗了所有的没分化的细胞, 因此一旦开花就意味着此植物生命的终结。幸运的是它们还留下有种子, 过冬后第二年能再度种植。植物能表达出延长日照的效应, 春日日照时间延长的好处从叶子生长开始到生命的鼎盛时期再到激活其有限的开花诱导基因。比利时法兰德大学生物技术学院(VIB)的研究人员已经研究了2个这

样的开花诱导基因。他们成功抑制了典型的一年生植物—阿拉伯芥的开花诱导基因的活性, 结果发现这种变异植物就不再能诱导开花了, 但能继续生长, 并在解除抑制后开始开花。研究人员发现此改良植物并没有用完它所贮备的没分化的细胞, 因此能长年生长很长时间。而真正的多年生植物通过木纹来展现其第二年的生长历程。

研究人员一直对草本到木本植物的进化过程感兴趣, 此次研究清楚地表明事实上只有2个基因在控制这一过程。这可能遍及植物的整个进化史。