

果梅基因组 DNA 提取方法的比较及 ISSR 分析

桂腾琴^{1,2,3}, 乔爱民³, 孙 敏¹, 王心燕³, 孙雪梅¹

(1. 西南大学 生命科学学院, 重庆 400715; 2. 黔西南民族师范高等专科学校 化学与生命科学系

贵州 兴义 562400; 3. 仲恺农业技术学院 农业与园林学院, 广东 广州 510225)

摘 要:以果梅品种鸳鸯梅、皇后梅和肖山选的幼嫩叶片为试材, 提取果梅的 DNA。针对果梅组织细胞体内含有较多的酚类、糖类及萜类等次生代谢物质的特点, 采用传统的 CTAB 法、改良的 CTAB 法和改良的 SDS 法提取果梅基因组 DNA, 并比较其提取效果。结果表明: 改良的 CTAB 法可获得高质量、高得率的基因组 DNA, OD_{260/280}比值在 1.80 左右。通过基因组 DNA-ISSR 分析, 完全满足试验要求。并进一步对改良的 CTAB 法的关键步骤作出具体的分析讨论。

关键词:果梅; 基因组 DNA; DNA 提取; CTAB; SDS

中图分类号:S 662.403.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2008)04-0212-04

梅(*Prunus mume* Sieb. et Zucc.)属蔷薇科李属, 原产于中国。根据其用途的不同, 可将梅分为果梅和花梅。果梅是我国南方的重要创汇树种, 用途广泛。

基因组 DNA 的提取是进行分子生物学研究的前提和基础, 目前植物基因组 DNA 的提取方法有很多^[1-3], 不同的植物材料, 所适合的提取方法也不同。果梅叶片中富含多糖、多酚、有机酸等^[4], 这些次生物质的存在是果梅核酸提取的一个很大障碍。因此, 从果梅中提取高质量的核酸成为分子生物学研究的瓶颈^[5-9]。

为了利用 ISSR 技术来探讨果梅种质资源遗传多样性, 首先涉及到果梅基因组 DNA 的提取。现利用传统 CTAB 法、改良 CTAB 法和改良 SDS 法以果梅幼嫩叶片为材料进行了 DNA 提取研究。结果改良 CTAB 法能获得高质量果梅基因组 DNA, 可以满足如 ISSR、AFLP、SSR 等对 DNA 质量的要求。

1 材料与方法

1.1 材料

供试的 23 份果梅品种材料于 2007 年 1 月底采集于广东省普宁市青梅标准化示范区, 采集健康植株上的幼嫩叶片后用塑料袋封装, 然后置于冰壶中, 带回实验室于 -70℃ 冰箱直接保存。

1.2 主要试剂

1.2.1 传统的 CTAB 法主要试剂 2% CTAB (W/V),

100 mmol · L⁻¹ Tris-HCl (pH 8.0), 20 mmol · L⁻¹ EDTA (pH 8.0), 1.4 mol · L⁻¹ NaCl, 高压灭菌。

1.2.2 改良的 CTAB 法主要试剂 STE 核分离液: 700 mmol · L⁻¹ NaCl; 100 mmol · L⁻¹ Tris-HCl (pH 8.0); 50 mmol · L⁻¹ EDTA (pH 8.0); 2% PVP (W/V); 2% β-巯基乙醇 (V/V)。3×CTAB 核裂解液: 100 mmol · L⁻¹ Tris-HCl (pH 8.0); 50 mmol · L⁻¹ EDTA (pH 8.0); 1.4 mol · L⁻¹ NaCl; 3% CTAB (W/V); 2% PVP (W/V)。“PCN”溶液: 0.0675 g PVP, 45 μL 10% CTAB+4% NaCl。

1.2.3 改良的 SDS 法主要试剂 100 mmol · L⁻¹ Tris-HCl (pH 8.5); 100 mmol · L⁻¹ NaCl; 50 mmol · L⁻¹ EDTA (pH 8.0); 2% SDS。

1.3 DNA 的提取

1.3.1 传统的 CTAB 法 传统的 CTAB 法见 Clark MS 等^[7]。

1.3.2 改良的 CTAB 法 具体步骤: ①快速称取 0.2 g 左右的果梅幼叶于预冷的灭过菌的研钵中, 并加入少量的 PVP 和 2% β-巯基乙醇, 加液氮研磨成粉状后立即加入 600 μL STE 核分离缓冲液, 迅速研磨成糊状匀浆, 小心转入 1.5 mL 离心管中, 上下颠倒混匀, 放置 0℃ 冰浴 10 min。②取出, 4℃ 下 5 000 r · min⁻¹ 离心 10 min, 弃上清液。若上清液仍粘稠, 用 STE 核分离液反复清洗后离心。③往沉淀中加入 600 μL 65℃ 预热的 3×CTAB 核裂解液和 10 μL β-巯基乙醇, 同时洗净管盖及管壁上残留的植物组织, 将材料轻轻混匀。65℃ 水浴保温 60 min, 期间不时轻轻摇动离心管几次。④取出, 冷却几分钟后加入 600 μL 氯仿/异戊醇 (体积比 24:1) 和“PCN”溶液 (0.0675 g PVP, 45 μL 10% CTAB+4% NaCl) 摇匀, 室温静置 5 min 后 10 000 r · min⁻¹ 离心

第一作者简介: 桂腾琴(1977-), 女, 在读硕士, 讲师, 主要从事植物生物技术方面的研究工作。E-mail: guitq@swu.edu.cn。

通讯作者: 孙敏。

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目 (B1010412)。

收稿日期: 2007-11-07

10 min。⑤转上清液于一新的离心管,重复抽提2~3次,每次抽提时都加入“PCN”溶液去多糖。⑥取上清液,加入RNaseA至终浓度为 $10\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 37°C 水浴保温30 min。取出后加入1/5体积 $5\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{NaCl}$ 和2倍体积预冷的乙醇,颠倒摇匀, -20°C 静置30 min沉淀DNA。⑦挑出DNA集结成白色絮状用70%的乙醇清洗2次,室温风干后溶于 $50\mu\text{L}$ TE中, -20°C 贮存备用。

1.3.3 改良的SDS法 参照明军等^[8]的方法并略有所改动。

1.4 DNA的质量检测

1.4.1 比色检测 取 $2\mu\text{L}$ DNA溶液稀释至 $150\mu\text{L}$,紫外吸收检测纯度并计算DNA产率^[9]。

1.4.2 电泳检测 取 $2\mu\text{L}$ DNA溶液进行0.8%的琼脂糖凝胶电泳。

1.4.3 PCR检测 按照上述改良CTAB法提取23个果梅品种核基因组DNA,用引物AF77118(GA)₈YC对23个果梅品种进行ISSR扩增,即在 $20\mu\text{L}$ 反应体系中含 $10\times$ buffer, $2.5\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{Mg}^{2+}$, $0.2\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ dNTPs, $0.32\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 引物,40 ng模板DNA,0.75 U Taq DNA聚合酶,用无菌超纯水补至总体积为 $20\mu\text{L}$ 。反应程序为: 94°C 预变性5 min; 94°C 45 s, 54.6°C 45 s, 72°C 2 min,35个循环; 72°C 最后延伸7 min。扩增产物用1.5%的琼脂糖凝胶电泳检测,EB染色,采用GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus(购自上海生工公司)作为分子量标准,电泳结束后在Bio-RAD凝胶成像系统中

观察、照相和分析。

2 结果

2.1 基因组DNA紫外检测

表1 不同提取方法所得DNA的检测结果

品种	提取方法	OD _{260/280} OD _{260/230}		DNA 得率	DNA	质量
				/μg · g ⁻¹ FW	外观	
‘鸳鸯梅’	改良 CTAB	1.82	2.06	460.26	无色透明	1
	改良 SDS	1.78	2.04	423.67	无色透明	1
	传统 CTAB	1.25	1.40	587.32	红褐	3
	改良 CTAB	1.78	2.03	482.34	无色透明	1
‘皇后梅’	改良 SDS	1.75	1.86	502.16	白色	2
	传统 CTAB	1.46	1.54	554.68	微褐色	3
	改良 CTAB	1.83	2.05	487.68	无色透明	1
‘肖山选’	改良 SDS	1.68	1.68	532.12	浅黄色	2
	传统 CTAB	1.52	1.57	546.82	浅棕色	3

注:1,2,3为比较等级,1为最佳,2次之,3为最差。

试验采用3种方法均能提取果梅基因组DNA,但是采用改良CTAB法提取的果梅基因组DNA,其OD_{260/280}比值在1.78~1.83,在1.80左右(表1),表面蛋白质和RNA等去除较干净,DNA纯度较高,改良CTAB法OD_{260/230}比值为2.03~2.06,平均为2.05,而改良SDS法OD_{260/230}比值为1.68~2.04,平均为1.86(表1),表明改良CTAB法去除小分子、盐和酚类物质等杂质的能力比改良SDS法更彻底,且质量较高,就DNA的得率而言,“传统CTAB法>改良SDS法>改良CTAB法”(表1)。尽管改良CTAB法提取DNA得率最低,却是能够从果梅嫩叶中提取到符号纯度标准的基因组DNA的方法。



图1 3种方法提取DNA的琼脂糖凝胶电泳图谱
注:材料:1,4,7为鸳鸯梅;2,5,8为皇后梅;3,6,9为肖山选。
方法:1,2,3为改良CTAB法,4,5,6为改良SDS法,7,8,9为传统CTAB法。



图2 改良CTAB法提取23份果梅品种基因组DNA

2.2 DNA质量的凝胶电泳检测

用0.8%的琼脂糖凝胶检测,改良CTAB法提取的DNA不含RNA,无拖尾,比较完整,点样孔干净,纯度完全符合ISSR要求(图1)。而改良SDS法在样孔中有微弱可见荧光且有轻微的降解,说明改良SDS法去多糖

能力不如改良CTAB法。而传统CTAB法提取的DNA片段在点样孔处出现高亮的区域,说明DNA样品受蛋白质污染严重且去多糖不彻底。有明显的拖尾和降解,说明RNA去除不彻底(图1)。采用改良的CTAB法对23份果梅品种的嫩叶进行DNA的提取,琼脂糖凝胶结

果表明,用改良 CTAB 法提取的 DNA 呈现一条整齐清晰的条带,无明显的 RNA 存在、无拖尾(图 2)。

通过上述综合比较,改良 CTAB 法提取 DNA 效果最佳,多糖去除较干净,无褐化现象,能够获取高质量果梅基因组 DNA,适宜用于 ISSR、AFLP 分析等分子生物学实验。

2.3 分子生物学检测

PCR 结果显示,应用改良 CTAB 法提取的 23 份果

梅品种(1~23 分别代表:矮白梅、浙江白毛、肖山选、浙江大叶青、沅江全福青梅、红梅二号、木瓜梅、桐绿四号、石庵白粒圆、中脂梅、核梅、鸳鸯梅、红花梅、三排早、三排选一、山溪选一、李梅、竹梅、皇后梅、白梅、桃梅、腊梅和胭脂梅)的基因组总 DNA,并以此为模板进行了 ISSR 扩增,可见条带清晰、明亮,扩增出的多态性条带丰富、稳定性和重复性好(图 3),表明利用该方法提取的 DNA 质量好、纯度高,可用于 PCR 扩增。

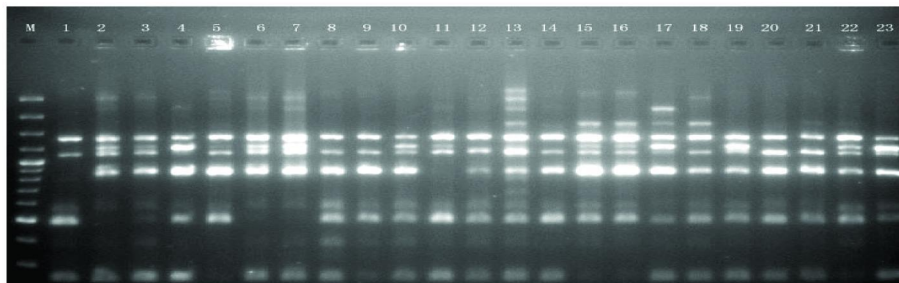


图3 引物 AF77118(GA)₈YC 对果梅的部分品种扩增的 ISSR 带型

3 讨论

提取高质量 DNA 是进行分子生物学研究的首要步骤,同时还要综合考虑采样方便、易于保存携带、提取成本等因素,筛选出适合所研究材料的提取方法。果梅组织细胞体内富含多酚、多糖、萜类等杂质,这些物质一旦与 DNA 发生不可逆的结合便会严重影响 PCR 扩增,导致扩增的失败。

试验采用 3 种方法提取果梅基因组 DNA,改良 CTAB 法与传统 CTAB 法和改良 SDS 法相比,不同之处在于:①在用液氮磨样前加入少量 PVP 和 2%β-巯基乙醇,能有效去除酚类物质和防止酚类物质氧化成醌。严防植物组织氧化是获取高质量 DNA 的关键。因此,应尽量减少植物组织与空气接触的时间和接触面,转移样品的速度要快,可成团转移;水浴和抽提时,要盖严管盖。黄小英等在提取苧麻总 DNA 的过程中添加 6%的 PVP 和 2%β-巯基乙醇,能得到较好的 DNA。李明芳在提取荔枝的 DNA 过程中,在 CTAB 提取液中加入 1%的 PVP 和 2%β-巯基乙醇所得 DNA 无色透明状,并认为两者单独使用效果不好但结合使用则取得较好的效果。因此,以上物质的加入,都明显提高了 DNA 的质量,能获得纯度高质量好的 DNA。除此之外,还可以在提取液中加入抗坏血酸、半胱氨酸、亚硫酸钠、V_C、V_E 等都能有效防止酚类物质的氧化。②利用 STE 核分离液破壁和低速离心步骤,将细胞核粗制剂分离出来,可以将细胞质中的多糖、酚和 RNA 杂质类等干扰物质先除去,同时也避免了核外 DNA 对目标基因组 DNA 的污染。③在用氯仿/异戊醇抽提时,采用了高浓度的 CTAB/NaCl 溶液与氯仿/异戊醇共沉淀有效去除了多糖。多

糖常与 DNA 共沉淀,形成黏稠的胶状物包裹 DNA。这些酸性多糖或改变 PCR 缓冲液的 pH 值或抑制 Taq 酶的活性,导致 PCR 扩增失败。去除多糖的方法常因材料不同而各异。④在预冷的乙醇沉淀 DNA 前加入 1/5 体积的 5 mol·L⁻¹ NaCl, -20℃放置 30 min,能使细胞碎片、色素物质及其它杂质沉淀于离心管底部,而 DNA 集集成白色絮状悬浮于液相的上层,极易挑出,这种现象目前尚未见报道。推测一定浓度的 NaCl 能促使细胞碎片及其它杂质析出并沉淀下来提高了 DNA 的纯度,使得基因组 DNA 析出后能够集集成絮状而容易挑出。另外,在试验中发现,为了获得纯度较高的 DNA 而采用多次氯仿/异戊醇抽提,往往容易丢失部分 DNA。对于一些珍稀较难采集到的材料,要想获得纯度好且足够量的 DNA,可将抽提后要弃去的中层和下层液保留,加提取缓冲液继续提取^[9],还可以获得 DNA,从而提高 DNA 获得率。

因此,改良 CTAB 法是一种有效提取高质量果梅基因组 DNA 的最佳方法,并运用该方法提取了大量果梅基因组 DNA,用 ISSR 技术进行果梅种质资源遗传多样性分析研究,效果良好。

参考文献

- [1] 王关林,方宏筠.植物基因工程[M].北京:科学出版社,2002:742-744.
- [2] 顾红雅,瞿礼嘉.植物基因与分子操作[M].北京:北京大学出版社,1995:21-23.
- [3] 颜子颖.精编分子生物学实验指南[M].北京:科学出版社,1998:36-37.
- [4] 赵昶灵,郭维明,陈俊愉.梅花花色色素种类和含量的初步研究[J].北京林业大学学报,2004,26(2):68-73.
- [5] 杨钊,唐旭蔚,涂炳坤等.栗属中国特有种板栗、茅栗、锥栗 RAPD 分析[J].果树学报,2004,21(3):275-277.

GUS 基因在农杆菌和甜瓜中的表达差异研究

陶 兴 林

(甘肃农业科学院蔬菜研究所, 甘肃 兰州 730070)

摘 要:以农杆菌和转化的甜瓜组织为试验材料,通过组织化学染色法,来研究 GUS 基因在农杆菌和甜瓜组织中的表达。结果表明,含有 GUS 基因的农杆菌和甜瓜愈伤组织都能被染成蓝色,而不含有 GUS 基因的农杆菌和甜瓜愈伤组织没有被染色,因此在检测转基因植株时,可以减少或避免假阳性的出现,为植物的转化奠定了坚实的基础。

关键词:GUS 基因;组织化学染色法;农杆菌;甜瓜;表达

中图分类号:S 961.6;S 652 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2008)04-0215-03

GUS 基因存在于某些细菌体内,编码 β -葡糖苷酸酶(β -glucuronidase; GUS),该酶是一种水解酶,能催化许多 β -葡糖苷酸酶类物质的水解。在转基因研究中,GUS 基因作为一种常用的指示基因,在检测外源基因的转化上,主要是在研究基因表达调控上具有重要作用。由于绝大多数的植物细胞内不存在内源的 GUS 活

性,许多细菌及真菌也缺乏内源 GUS 活性,因而 GUS 基因广泛用作转基因植物、细菌和真菌的报告基因^[1-3],尤其是在研究外源基因瞬时表达的转化试验中,GUS 基因应用最多。但是目前关于 GUS 在农杆菌中是否表达的研究很少,很多用 GUS 基因作为报告基因的文献也没有提到。因此,在研究中以含有 GUS 基因的农杆菌 EHA105 和不含有 GUS 基因的 EHA105 作为材料,通过 GUS 染色反应,来检测其在农杆菌中和甜瓜转化愈伤组织中的表达,从而为转基因过程更准确地检测转基因植株打下坚实的基础。

作者简介:陶兴林(1977-),男,硕士,主要从事蔬菜育种及在生物技术园艺作物育种中的应用。E-mail:taoxinglin77@126.com。
收稿日期:2008-01-08

[6] 沈永宝,施季森,银杏、板栗不同组织 DNA 提取[J].南京林业大学学报(自然科学版),2001,25(6): 80-82.
[7] Clark M S, 顾红雅,瞿礼嘉.植物分子生物学—手册实验[M].北京:高等教育出版社,1998:5-6.
[8] 明军,张启翔,晏小兰等.梅花基因组 AFLP 银染反应体系的建立

和优化[J].北京林业大学学报,2003,25(3):17-21.
[9] 徐德昌,赵亚华,杜人奎.植物总 DNA 和核 DNA 提取及其纯度的研究[J].宁夏农学院学报,1997,18(3):57.
[10] 李丹,凌定厚.五种马尾松基因组 DNA 方法的比较[J].植物学通报,2000,17(2):168-173.

Comparison of Extraction Methods and ISSR Analysis of Genomic DNA in Japanese apricot (*Prunus mume* Sieb. et Zucc.)

GUI Teng-qin^{1,2,3}, QIAO Ai-min³, SUN Min¹, WANG Xin-yan³, SUN Xue-mei¹

(1. College of Life Science, Southwest University, Chongqing 400715, China; 2. Dept. of Chemistry & Life Science, Qianxinan Teachers' College Xingyi, Guizhou 562400, China; 3. College of Agriculture and Landscape Architecture, ZhongKai University of Agriculture and Technology, Guangzhou, Guangdong 510225, China)

Abstract: Genomic DNA of Japanese apricot (*Prunus mume* Sieb. et Zucc.) was extracted from the leaves of three cultivars of Japanese apricot, 'yuanyangmei', 'huanghoumei' and 'xiaoshanxuan'. Considering that Japanese apricot is rich in secondary metabolites such polyphenols, saccharide and terpene and so on. Three methods were adopted to isolate genomic DNAs of Japanese apricot. The results show that the modified CTAB method is more effective, the quality and quantity of genomic DNA extracted can used at all kinds studied of molecular biology for Japanese apricot. OD_{260/280} was 1.80 or so. When tested through the DNA-ISSR analysis, experiment requirement was met perfectly. In addition, the key steps and main characters in the modified CTAB method were analyzed in detail.

Key words: Japanese apricot (*Prunus mume* Sieb. et Zucc.); Genomic DNA; DNA extraction; CTAB; SDS