

一种高质量枇杷基因组 DNA 提取方法

杨 琴¹, 付 燕², 邓群仙³, 王永清³, 陶 炼³, 刘 露³

(1. 凯里学院 环境与生命科学学院, 贵州 凯里 556011; 2. 黔东南民族职业技术学院 贵州 凯里 556000;

3. 四川农业大学 园艺学院, 四川 雅安 625014)

摘 要: 针对枇杷叶片富含多糖、多酚及其它次生代谢物质的特点, 采用改良 CTAB 法, 通过对抽提液、沉淀液和解离缓冲液进行逐步筛选, 对其基因组总 DNA 进行提取, 并对 DNA 进行电泳检测、含量测定和 ISSR 分析。结果表明: 该方法从‘大五星’枇杷幼叶、成熟叶片、花药、组培苗, 与幼果中的胚珠, 以及桫欏叶枇杷的幼叶与成熟叶片 7 种材料提取的基因组总 DNA 纯度和完整性都较好, OD_{260}/OD_{280} 值均在 1.8~2.0 之间, 无降解现象, RNA 去除干净, 能被限制性内切酶完全消化; 其 ISSR 分析条带清晰, 多态性好, 表明此方法提取的枇杷基因组总 DNA 质量较高。

关键词: 枇杷; 基因组 DNA; ISSR

中图分类号: S 667.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2010)20-0126-04

枇杷 (*Eriobotrya* Lindl.) 是起源于中国的蔷薇科苹果亚科植物^[1]。近年来, 分子标记技术在枇杷遗传多样性^[2]、品种鉴定^[3]、分类^[4]等方面逐步得到了运用, 但这些研究多数都是以枇杷未展开的幼叶为材料提取基因组 DNA, 用于对 DNA 质量要求不高的 RAPD 分析。近年来一些研究者在枇杷研究各方面取得了可喜的进展, 如花药胚状体发生及植株再生^[5], 成熟子叶或叶片 (即使是种子苗叶片) 再生^[6], 雄性不育^[7]与自交不亲和^[8]与同一朵花中不同相对长度的花柱的发现。虽然这些研究取得了一定的突破, 但如何充分利用现有材料, 及上述特殊生殖特性进行更深入的分子生物学研究, 为枇杷育种提供新型育种材料和理论依据将是下一步研究工作的重点。这使得枇杷组培苗、幼苗成熟叶片、花药、花柱、胚珠都将成为某些特定研究获得基因组 DNA 的材料, 但这些材料中的多糖、多酚类次生物质比未展开的幼叶更为丰富, 这极大地增加了 DNA 样品提取的难度。因此, 针对以上问题, 该研究参考李荣等^[9]、佟兆国等^[10]、李媛媛等^[11]的方法, 采用 CTAB 法, 以‘大五星’未展开幼叶为材料, 通过在抽提时使用配制储放时间不同的酚: 氯仿: 异戊醇, 以及在沉淀时是否加入 5 mol/L NaCl, 组成 6 种组合, 对抽提与沉淀液组合进行

筛选。在此基础上通过在 STE、介质 I 和 CTAB 缓冲液中分别添加 PVP40 (聚乙烯吡咯烷酮)、 β -BME (β -巯基乙醇) 等抗酚类、氧化、褐变的物质, 组合成 6 种方法, 对解离缓冲液组合进行筛选。然后用不同的材料对所筛选出的优化组合进行稳定性与适用性检验, 以期筛选出成本低, 得率高, 稳定性好, 实用性广的枇杷基因组 DNA 提取方法, 为开展枇杷分子生物学研究提供可靠的技术基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

以‘大五星’枇杷未展开的幼叶为材料对抽提与沉淀液组合进行筛选; 以‘大五星’枇杷成熟叶片、花药、组培苗、幼果中的胚珠, 桫欏叶枇杷的幼叶与成熟叶片, 桃组培苗与成熟叶片为材料对筛选出的抽提与沉淀液组合进行稳定性与适用性检验。上述材料均由四川农业大学园艺生物技术研究中心提供。

1.2 试验方法

1.2.1 枇杷基因组 DNA 抽提、沉淀液优化 以‘大五星’未展开幼叶为材料, 利用解离缓冲液筛选组合 1 中的解离液 (表 2)。按照 1.2.2 中的操作程序进行基因组 DNA 提取, 但在抽提时使用配制储放时间不同的酚: 氯仿: 异戊醇, 在沉淀时是否加入 5 mol/L NaCl, 对提取过程中的抽提与沉淀液进行筛选, 具体组合见表 1。

表 1 枇杷基因组 DNA 抽提、沉淀液处理方法

处理	1	2	3	4	5	6
组合	A	A	B	B	C	C
	D	E	D	E	D	E

注: A: 现配的酚: 氯仿: 异戊醇 (25: 24: 1); B: 配制后室温避光存放 3 个月的酚: 氯仿: 异戊醇 (25: 24: 1); C: 配制后室温避光存放 6 个月的酚: 氯仿: 异戊醇 (25: 24: 1); D: 沉淀时加 1/5 体积的 5 mol/L NaCl; E: 沉淀时不加 NaCl。

第一作者简介: 杨琴 (1983-), 男, 硕士, 现主要从事果树育种与优质高产栽培技术研究工作。E-mail: yangqin1028518@126.com。

通讯作者: 邓群仙 (1968-), 女, 博士, 副教授, 现主要从事园艺植物生物技术及观赏植物栽培保护研究工作。E-mail: dqxlwj@sina.com.cn。

基金项目: 贵州省教育厅自然科学基金资助项目 (黔教科 20090085)。

收稿日期: 2010-07-22

1.2.2 枇杷基因组 DNA 解离缓冲液筛选 利用上述筛选获得的枇杷基因组 DNA 抽提、沉淀液组合, 综合考虑含有大量多糖与多酚类等次生物质对植物叶片基因组 DNA 提取的方法, 如核桃^[9]、果树成熟叶片^[10] 与山楂^[11], 对解离缓冲液作相应的调整, 组合成 6 种方法, 具体见表 2, 按下述操作进行基因组 DNA 提取: ①取 0.5 g ‘大五星’ 枇杷幼嫩叶片置于预冷的加有 10 mg 抗坏血酸的陶瓷研磨中, 加入适量液氮, 在液氮冷冻下迅速研磨成粉状, 立即转入预冷的 1.5 mL 离心管中, 样量达到 0.1 mL 刻度线即立即加入 STE 或介质 I 溶液至 1.5 mL 刻度线, 常温放置 5~10 min, 期间颠倒几次; ②取出离心管, 在 20℃ 5 000 r/min 下离心 5 min, 倒掉上清液, 迅速加入 750 μL 经 65℃ 预热的 CTAB 提取液, 于 65℃ 水浴 45 min, 期间轻轻颠倒到 3~4 次, 使样品粉末与提取液充分混匀; ③取出离心管, 冷却至室温, 在 20℃ 12 000 r/min 下离心 10 min; ④将上清液转入新的 1.5 mL EP 管中, 加入等体积现配的苯酚: 氯仿: 异戊醇(25:24:1), 轻轻颠倒若干次至液体呈乳白色止; ⑤ 20℃ 12 000 r/min 下离心 10 min; ⑥重复上述④~⑤步; ⑦将上清液转入含有 1/5 体积 5 mol/L 的 NaCl 溶液的 1.5 mL EP 管中, 加入 2 倍体积无水乙醇, 颠倒离心管混匀; ⑧将离心管放入-20℃冰箱静置 1~2 h 后, 4℃ 12 000 r/min 下离心 10 min, 弃上清液, 沉淀用 70% 酒精漂洗 3 次, 每次至少 10 min, 再用无水乙醇漂洗 3 次, 每次至少 10 min; ⑨在超净工作台上吹干或自然风干。加入 100 μL 去离子水溶解, 取 10 μL DNA 原液, 稀释 10 倍, 用 Eppendorf Biophotometer (核酸蛋白检测仪) 检测 OD 值 (260/280) 和 DNA 的浓度。0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 完整性和纯度。余下的置于-20℃保存备用。

表 2 枇杷基因组 DNA 解离缓冲液处理方法

处理	1	2	3	4	5	6
组合	STE+ CTAB1	STE+ CTAB2	STE+ CTAB3	介质 I+ CTAB1	介质 I+ CTAB2	介质 I CTAB3

注: STE1: 100 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 50 mmol/L EDTA (pH 8.0), 700 mmol/L NaCl, 3%β-BME, 2% PVP40; 介质 I: 200 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 50 mmol/L EDTA (pH 8.0), 250 mmol/L NaCl, 2%β-BME; CTAB1: 100 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 20 mmol/L EDTA (pH 8.0), 1.4 mol/L NaCl, 2% CTAB, 2% β-BME, 2% PVP40; CTAB2: 100 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 20 mmol/L EDTA (pH 8.0), 1.4 mol/L NaCl, 2% CTAB, 3%β-BME; CTAB3: 100 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 20 mmol/L EDTA (pH 8.0), 1.4 mol/L NaCl, 3% CTAB, 3%β-BME。

2 结果与分析

2.1 枇杷基因组 DNA 抽提、沉淀液优化组合

以 ‘大五星’ 枇杷未展开的幼叶为材料, 按表 1 中的 6 种组合, 3 次重复, 进行基因组 DNA 提取, 经琼脂糖凝胶电泳检测, 结果见图 1。从图 1 可看出, 在抽提时使用现配的苯酚: 氯仿: 异戊醇 (25:24:1) 抽提获得的 DNA 带明亮清晰, 点样孔无残留, 能够获得质量较高的 DNA 样品 (图 1, 泳道 1、2); 而使用储放 3 个月以上的苯

酚: 氯仿: 异戊醇 (25:24:1) 抽提获得的 DNA 条带不仅较弱, 而且点样孔微亮, 另外 DNA 主带还有弥散现象 (图 1, 泳道 3~6), 这表明获得的 DNA 样品可能含有较多的蛋白质、多糖等杂质, 且 DNA 不完整。在抽提时使用相同的苯酚: 氯仿: 异戊醇 (25:24:1) 前提下, 沉淀时加入终浓度为 5 mol/L NaCl 的组合 (图 1, 泳道 1、3、5) 效果优于不加 NaCl 组合 (图 1, 泳道 2、4、6)。

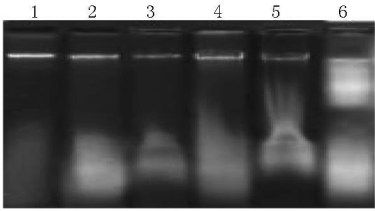


图 1 不同抽提液、沉淀液组合所提枇杷 DNA 的电泳效果
注: 组合编号与表 1 一致

2.2 适合枇杷基因组 DNA 提取的解离缓冲液组合

从图 2 可看出, 6 种方法中除了组合 4 以外, 其它 5 种方法均可提出 DNA, 且样品孔均不发亮。组合 2 的 3 个重复 (4~6) 都能够获得 DNA, 但在亮度上重复间都差异较为明显, 且条带较弱, 表明该组合不稳定, 且获得的 DNA 量较少。组合 3 的 1 个重复 (8) 与组合 5 的 2 个重复 (13、14) 虽然也能够获得 DNA, 但电泳条带极弱, 表明获得的 DNA 量很少。组合 6 的 2 个重复 (16、18) 能够获得的 DNA 条带虽然较组合 3 与 5 的亮, 但拖尾现象较为严重, 表明 DNA 有降解或多糖、蛋白质等杂质较多, 质量不高。组合 1 的 3 个重复 (1~3) 获得的 DNA 主带清晰, 无弥散带, 无明显的 RNA 带, 说明该组合不仅能够获得的 DNA 量较高, 而且完整性较好, 说明多糖及 RNA 其它次生物质等杂质去除的比较干净, 纯度较高, 是提取枇杷基因组 DNA 比较理想的解离液组合。

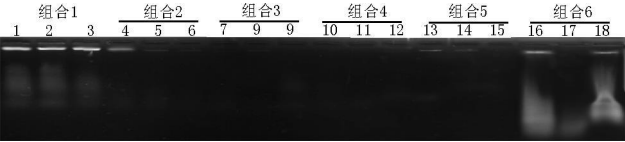


图 2 不同解离液组合所提枇杷 DNA 的电泳效果
注: 1~18, 6 种不同处理提取的 DNA, 每个组合 3 次重复, 组合与表 2.3 一致。

从表 3 可看出, 方法 6 的 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 值小于 1.8, 说明样品中残存的蛋白质、酚类及多糖类等杂质含量高, 断裂严重, 含有较多的碎片, 纯度不高。方法 3 与 4 的 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 值大于 2.0 表明样品中 RNA 的含量较高, 严重影响 DNA 质量。方法 1、2、5 的 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 值为 1.8~1.9 之间, 表明用这些处理方法提取的 DNA 样品

中蛋白质、多糖等杂质去除的比较干净,获得的 DNA 样品质量较高。但方法 2、3、5 获得的 DNA 量太少且不稳定,而方法 1 获得 DNA 量不仅高而且稳定,表明方法 1 能够获得纯度和产率均较高的 DNA,是提取枇杷基因组 DNA 解离液比较理想的组合,既采用 STE+CTAB1 组合最为有效,与电泳图谱分析结果一致。

表 3 不同处理方法提取 DNA 的纯度和浓度

处理	OD ₂₆₀	OD ₂₈₀	OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀	浓度/ng · μL ⁻¹
1	0.101	0.053	1.9057	505
2	0.087	0.045	1.9333	185
3	0.097	0.048	2.0208	116
4	0.089	0.043	2.0698	76
5	0.151	0.081	1.8642	165
6	0.113	0.063	1.7937	465

注:数值为 3 次重复的平均值。

2.3 优化的枇杷基因组 DNA 提取方法适用性

以‘大五星’、桫叶枇杷与桃 3 个树种 9 种材料基因组 DNA 的紫外分析结果(表 4)可看出,改进的 CTAB 法从所试样品中均提取出了高质量的基因组 DNA,每一样品的 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值都介于 1.8~2.0 之间,且提取的 DNA 均为白色絮状沉淀,溶液清亮,无黏稠感,说明 DNA 样液中基本无蛋白质、RNA、多糖和酚类等杂质的污染,纯度较好;但就 DNA 的产率而言,不同材料的产率有一定差异,最高 67.85 μg/g,最低为 40.38 μg/g。

表 4 3 个树种 9 种不同类型材料基因组

DNA 紫外分析结果

编号	OD ₂₆₀	OD ₂₈₀	OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀	产率/μg · g ⁻¹
1	0.2456	0.1258	1.9523	58.18
2	0.2378	0.1237	1.9224	67.85
3	0.1182	0.0638	1.8527	43.67
4	0.1373	0.0728	1.8860	46.32
5	0.1075	0.0586	1.8345	40.38
6	0.1438	0.0802	1.7930	47.35
7	0.1257	0.0692	1.8165	45.72
8	0.1574	0.0873	1.8030	52.31
9	0.1015	0.0546	1.8590	41.78

注:1~5 分别为普通枇杷的成熟叶片、未展开幼叶、花药、组培苗、胚珠;6、7 分别为桫叶枇杷成熟叶片与幼叶;8、9 分别为桃成熟叶片与组培苗;图 3 相同。

3 个树种 9 种不同材料 DNA 提取原液的琼脂糖凝胶电泳分析如图 3 所示,由图 3 可看出,所有材料的 DNA 样品孔均不发亮,且 DNA 主带清晰,除了桫叶枇杷与桃成熟叶片有轻微的弥散外,其它材料均无弥散带,所有材料有较弱的 RNA 带,说明蛋白质、多糖、RNA 及其它次生物质等杂质去除的比较干净纯度较高,完整性也较好。但在亮度上,树种间及同一树种不同品种间都不同程度地存在差异,与紫外分光光度计的定量分析结果相一致。表明经筛选优化获得的枇杷基因组 DNA 提取方法具有较广的适用性。

3 结论与讨论

基因组 DNA 的提取是进行分子生物学分析的重要步骤,提取 DNA 的质量好坏直接关系到试验的成败^[12]。

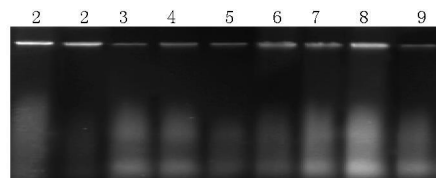


图 3 3 个树种 9 种不同类型材料基因组 DNA 电泳图谱

枇杷叶片中含有大量蛋白质、多糖、多酚等物质,这些物质在 DNA 提取过程中与 DNA 共沉淀,形成胶状物难以溶解或产生褐变,严重影响了 DNA 的质量^[13]。多酚类物质在完整的细胞和组织中与多酚氧化酶分隔存在,因此比较稳定^[14],当被破碎时二者结合极易氧化,影响所提取 DNA 的质量。多糖和蛋白质易与 DNA 结合成复合物,难以溶解,又易抑制 *Taq* 酶活性,从而影响 PCR 扩增,因此多糖和蛋白质的去除对提高 DNA 质量尤为重要。郑国华等^[15]采用细胞分离液去除多糖的方法获得了枇杷的 DNA;程运江^[16]等研究认为用水和乙醚泡可以去除枇杷大部分多糖,获得高质量的 DNA。刘月学^[17]等认为用 CTAB 作为裂解液在裂解细胞的同时可去掉大部分多糖,而与 DNA 结合的蛋白质无法用氯仿:异戊醇(24:1)去除,通过加入适量蛋白酶 K 能有效降解植物组织中与 DNA 结合的蛋白质,从而避免蛋白质和 DNA 共沉淀^[18]。但该实验室先后采用刘月学等^[17]及参照以上 2 种方法优化的核沉淀-蛋白酶 K 的方法,以枇杷未展开的幼叶为材料提取基因组 DNA,表现为基因组 DNA 经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳时,获得的量极少或点样孔总是有一条亮带,或者经纯化后获得的 DNA 量极少,需要多次提取才能获得足够 PCR 扩增所需的 DNA 样品,不仅浪费药品而且工作量较大。而以成熟叶片与组培苗为材料提取基因组 DNA 时,获得的 DNA 原液十分粘稠,用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳后,点样孔很亮,有的甚至不能在凝胶中扩散,蛋白质、多糖、RNA 等次生物质污染十分严重,不能用于 PCR 扩增。

试验参考李荣等^[9]、佟兆国等^[10]、李媛媛等^[11]的方法,做了进一步改进,在裂解细胞核之前加入不含 CTAB 的 STE 或介质 I,以及在 STE 或介质 I 与 CTAB 解离液中分别添加 β-BME (β-巯基乙醇),可很好的游离出酚类,防止酚类的氧化^[19],再加上提取缓冲液中的可溶性 3% PVP40 与酚类物质的结合作用^[20],有效去除了多酚类物对 DNA 提取的干扰。这是提取过程中的关键步骤,若缺少此步骤,用酚、氯仿、异戊醇、NaCl 和乙醇等物质多次抽提或沉淀,也很难达到完全去除多糖类物质污染的目的。沉淀时加入终浓度为 5 mol/L NaCl 则可使残留的多糖类等物质充分溶解,无水乙醇可选择性沉淀 DNA,而多糖仍留在上清液中^[21],进而达到了分离纯化

DNA 的目的。酚如果储放时间过长,可能部分被氧化而降低了其对蛋白质等大分子的抽提作用,该研究也证明现配抽提剂(苯酚:氯仿:异戊醇)效果明显优于储放3个月以上的^[2]。最后需要指出的是,在DNA提取过程中,影响因素很多,如样品研磨要充分,速度要快,以防DNA暴露在空气中而被氧化,要想获得高质量的DNA,不可过分追求简化步骤,除了方法上的选择外,还应在操作技术上严格要求。

参考文献

- [1] 付燕,罗楠,杨琴,等.枇杷属植物ISSR反应体系的建立和优化[J].果树学报,2009,26(2):180-185.
- [2] José M S, Carlos R, Santiago V, et al. Genetic diversity of loquat germplasm (*Eriobotrya japonica* (Thunb) Lindl) assessed by SSR markers[J]. Genom, 2005, 48(1): 108-114.
- [3] 陈菁英,陈义挺,赖钟雄.福建省12个地方解放钟枇杷的RAPD分析[J].亚热带农业研究,2006,2(2):142-145.
- [4] FU Y, YANG Q, Nan L, et al. Studies on Genetic relationships among Oakleaf Loquat, Daduhe Loquat and Common Loquat by RAPD and ISSR[J]. Journal of Agricultural Science and Technology, 2009, 3(1): 17-22.
- [5] LI J Q, WANG Y Q, ZHOU L J, et al. Embryogenesis and plant regeneration from anther culture in loquat (*Eriobotrya japonica* L.) [J]. Scientia Horticulturae, 2008, 115(4): 329-336.
- [6] 吴延军,谢鸣,蒋桂华,等.枇杷成熟子叶及叶片不定芽再生研究[J].林业科学,2007,43(1):107-111.
- [7] DENG Q X, WANG Y Q, YANG Q, et al. Identification of Male Fertility of Longquan No. 5 Lines in Loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl) [J]. Plant Sciences Research, 2008, 1(3): 61-67.
- [8] YANG Q, DENG Q X, WANG Y Q, et al. Study on Characteristics of *in Situ* Pollen Germination and Pollen Tube Growth of Loquat [J]. Plant Sciences Research, 2008, 1(3): 50-55.
- [9] 李荣,牛建新,王林,等.适合核桃 AFLP 分析用的 DNA 提取方法研究[J].西北农业学报,2006,15(3):175-178.

- [10] 佟兆国,王富荣,章镇,等.一种从果树成熟叶片提取DNA的方法[J].果树学报,2008,25(1):122-125.
- [11] 李媛媛,代红艳,郭修武,等.山楂总DNA提取方法的比较[J].果树学报,2007,24(1):115-118.
- [12] Hidenori S. A technique to isolate DNA from woody and herbaceous plants by using a silica-based plasmid extraction column[J]. Analytical Biochemistry, 2007, 363: 166-167.
- [13] WANG D H, SONG K M, Carol K, et al. A High-Throughput System for the Rapid Extraction of Plant Genomic DNA for Genome Mapping and Marker-Assisted Breeding Studies [J]. Journal of the Association for Laboratory Automation, 2005, 10(4): 242-245.
- [14] Nikoloudakis N, Banilas G, Gazis F, et al. Discrimination and genetic diversity among cultivated olive of Greece using RAPD markers [J]. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 2003, 128(5): 741-746.
- [15] 郑国华,郑育俊,何文庆.枇杷基因组DNA分离技术及浓度测定[J].福建农业科技,2000(6):13-15.
- [16] 程运江,伊华林,庞晓明,等.几种木本果树DNA的有效提取[J].华中农业大学学报,2001(10):481-48.
- [17] 刘月学,杨向晖,林顺权,等.枇杷属植物基因组DNA提取方法的改进及其应用[J].果树学报,2005,22(2):182-185.
- [18] 陆光远,杨光圣,傅廷栋.应用于油菜研究的简便银染AFLP标记技术的构建[J].华中农业大学学报,2001,20(5):413-415.
- [19] 李莉,彭建营,白瑞霞.不同方法对枣叶片总DNA提取效果的影响[J].果树学报,2007,24(3):389-392.
- [20] 罗志勇,周钢,陈湘晖,等.高质量植物基因组DNA的分离[J].湖南医科大学学报,2001,26(2):178-180.
- [21] WANG X D, WANG Z P, ZOU Y P. An improved procedure for nuclear DNA isolation from silica-gel dried leaves of wild grapevine [J]. Plant Mol-Biol Rep, 1996, 14(4): 369-373.
- [22] 邹喻苹,葛颂,王晓东.系统与进化植物学中的分子标记[M].北京:科学出版社,2001:9-107.

(该文作者还有李性苑、张文华,凯里学院环境与生命科学学院,贵州凯里556011。)

A Method for Excellent Quality DNA Extraction of Loquat

YANG Qin¹, FU Yan², DENG Qun-xian³, WANG Yong-qing³, TAO Lian³, LIU Lu³, LI Xing-yuan¹, ZHANG Wen-hua

(1. College of Environmental and Life Science Kaili University, Kaili, Guizhou 556000; 2. Qiandongnan Nationality Professional Technology College, Kaili, Guizhou 556000; 3. College of Horticulture, Sichuan Agricultural University, Ya'an, Sichuan 625014)

Abstract: The leaves of loquat are rich in polyhexose, polyphenols and other secondary metabolism compounds which prevent DNA extraction. The genomic DNA samples of loquat were isolated by improved CTAB method which based on optimizing extraction, deposition and dissociation. The purity and quantity of DNA was evaluated by agarose gel electrophoresis, UV scanning and ISSR analysis. The results showed that the genomic DNA extracted from Yong leaves and mature leaves of "Dawuxing" and Oakleaf loquat, and anther, seedlings of tissue-cultured and ovules of Young fruit of "Dawuxing" loquat, the above mentioned 7 different components of loquat was pure and integral, without degradation and RNA, and the value of D260/D280 was 1.80 to 2.0, which was suitable for digestion by restriction endonucleases. ISSR analysis indicated the primer produced clear polymorphic patterns. Therefore this method could be used for extracting ideal DNA samples from different components of loquat.

Key words: Loquat; genomic DNA; ISSR