

# 贡水白柚基因组 DNA 提取方法研究

石开明, 邓志军, 方响亮

(湖北民族学院 林学院园艺学院, 湖北 恩施 445000)

**摘要:**以“贡水白柚”为试材,采用盐乙醚处理法、苯酚氯仿处理法、基本 CTAB 处理法 3 种 DNA 提取方法来处理“贡水白柚”基因组 DNA,研究不同提取方法对 DNA 样品的产率、外观、酶切电泳等方面的影响。结果表明:用盐乙醚法所提 DNA 外观呈纯白色,冷冻沉淀为纤维状,效果最好;用苯酚氯仿法处理幼穗期柚叶片基因组提取 DNA 产率最高,DNA 浓度达 118 ng/ $\mu$ L;*Eco*RI 酶切图谱用 CTAB 处理法和盐乙醚处理法效果均较好,苯酚氯仿处理法则拖尾严重,效果差;RAPD 引物 PCR 扩增效果图表明,3 种方法均能扩增出清晰条带,均适合于有关“贡水白柚”基因组的相关研究。

**关键词:**贡水白柚;DNA;提取

**中图分类号:**S 602 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)21-0097-04

柚(*Citrus grandis* (L.) Osbeck)是柑橘类果树的一个主要栽培种类,有着丰富的种质资源。柚果实色香味俱全,加上外形美观、营养丰富,而且耐贮藏,深受消费者的喜爱,经济价值高。现已成为我国柑橘类品种中相当重要的一个种类<sup>[1]</sup>。“贡水白柚”原产鄂西恩施土家族苗族自治州,属酸甜型中熟柚类良种,是湖北地方特色优良柚类品种,与同类品种相比,具有皮薄肉厚,易剥

皮,无苦涩口感等优势,深受大众喜爱。

随着国内柑橘产业结构的调整,近年来针对各种柚的研究也逐渐增多。目前有关柚种质资源的遗传多样性基础研究中,涉及到柚基因组 DNA 提取方面是个难题,特别是从柚成熟的老叶中提取高质量的基因组 DNA,一般方法难以实现。老叶中酚类化合物、色素、多糖和其它次生代谢物质含量较高,这给柚老叶基因组 DNA 提取带来了极大困难。而在研究柚基因组学时首先需要得到高纯度、结构完整的 DNA。同时为了便于研究的进行,还要保证 DNA 提取量充足,所以很有必要摸索一套适合提取柚基因组 DNA,特别是从老叶中快速有效提取 DNA 的方法,该方法应尽可能具备操作简便、省

**第一作者简介:**石开明(1980-),男,博士,讲师,现主要从事林学院园艺植物遗传育种等研究工作。E-mail:skm331@163.com.

**基金项目:**湖北省教育厅资助项目(Q20122902);国家自然科学基金青年科学基金资助项目(81303169)。

**收稿日期:**2014-05-19

different media of a basal nutrient medium supplemented with different auxins, cytokinins and auxin- cytokinin combinations, different physiological ages of aseptic seedlings and different parts of cotyledon on cotyledon *in vitro* culture system and plant regeneration, such as *in vitro* cotyledon inoculation, callus induction, adventitious bud differentiation, bud elongation, root induction, domestication, transplantation and growing adult plant were investigated. The results showed that the optimal medium for adventitious bud differentiation was MS+6-BA 2 mg/L+NAA 0.1 mg/L, with 100% bud differentiation percentage. The optimal medium for bud elongation was MS+KT 2 mg/L, with 50% bud elongation percentage. And the rooting medium was MS without other supplements, with 44% taking root percentage. The average of 15-18 adventitious clustered buds were differentiated by one explant. Among these adventitious buds differentiated per explant, 14-16 buds were elongated, and 6-7 seedlings were obtained at last. This period was 50-55 days from cotyledon explant inoculation to regeneration seedlings. The survival percentage of regeneration seedlings after transplanting was 98%. The efficient regeneration system by *in vitro* culture was preliminarily established on pod pepper of Guizhou province, which laid important foundation for tissue culture in rapid propagation and genetic transformation of pod pepper in this study.

**Keywords:** pod pepper; cotyledon; auxin-cytokinin combination; culture *in vitro*; plant regeneration

时、费用低等特点<sup>[2]</sup>。

常用的植物 DNA 简易提取方法有碱处理法、高温水煮法等<sup>[3-5]</sup>。选用这些通用的简易提取方法速度很快,需要的试剂成本低,但是 DNA 提取质量无法保证,样品纯度低,碎片多,难以长时间保存,在后续的基因组 PCR 扩增中效果也差。现以 DNA 提取的 CTAB 法为依据,在此基础上比较了 3 种方法,同时选取了 3 个不同时期的材料(苗期幼叶、抽穗期幼穗、抽穗期老叶)进行对比,旨在分析以不同方法提取柚基因组 DNA 所带来的差异,方便今后研究中根据具体情况加以应用。

## 1 材料与方

### 1.1 试验材料

供试材料“贡水白柚”由湖北民族学院鄂西柚类种质资源圃提供。分别采取不同年龄的成年柚母本树上不同发育时期的叶片。

### 1.2 试验方法

1.2.1 盐乙醚处理法 参考高玉峰等<sup>[6]</sup>的基因组 DNA 提取方法。

1.2.2 苯酚氯仿处理法 参考易庆平等<sup>[7]</sup>的植物基因组 DNA 提取方法。

1.2.3 基本 CTAB 处理法 参考石开明等<sup>[8]</sup>的基因组 DNA 提取方法。

1.2.4 不同提取法提取 DNA 结果比较 取 15  $\mu\text{L}$  DNA 样品稀释 20 倍,分别测量  $\lambda_{260}$  和  $\lambda_{280}$  的吸光值。要

求 DNA 吸光值比值区间:  $1.7 < A_{260}/A_{280} < 2.0$ 。DNA 浓度( $\text{ng}/\mu\text{L}$ ) =  $50 \times \text{OD}_{260} \times \text{溶液稀释倍数}$ 。向一定量的 DNA 中加入限制性内切酶 *EcoRI* 至  $4 \sim 5 \text{ U}/\mu\text{g}$  DNA,  $37^\circ\text{C}$  消化过夜,用  $0.5 \times \text{TBE}$ 、1.2% 琼脂糖凝胶、1.5 V/cm 电泳 3 h 进行检测。用 RAPD 引物 S13 和 S27 (购自上海 Sagon 公司)进行 PCR 循环,通过产物观察分析所提 DNA 质量,其中 PCR 程序为  $94^\circ\text{C}$  预变性 5 min,  $94^\circ\text{C}$  变性 1 min,  $36^\circ\text{C}$  退火 1 min,  $72^\circ\text{C}$  链延伸 2 min, 循环 33 次后  $72^\circ\text{C}$  延伸 8 min。扩增产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳,通过 EB 染色 30 min,然后在凝胶成像系统中观察。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同提取法 DNA 品质比较

从表 1 可以看出,不同处理方法提取 DNA 得到的产率存在差异,依次为苯酚氯仿法 > 盐乙醚法 > 基本 CTAB 法。但在品质上确以盐乙醚法提取的最好,多糖和蛋白质去除较彻底,得到的 DNA 颜色纯净,易溶于 TE。苯酚氯仿法虽然 DNA 产率高,但多糖污染较严重,沉淀难溶于 TE。基本 CTAB 法产率和品质都在中等水平,但在沉淀多糖的同时会损失一部分 DNA。因此,在用 CTAB 法进行植物 DNA 提取时,用高盐水饱和乙醚法纯化最为合适,但是高盐乙醚法对操作者要求较高,不熟练者不易得到较高产量。

表 1 不同提取 DNA 方法的效果比较

Table 1 Comparison of different methods for DNA extraction

DNA 提取方法 Method of DNA extraction	提取率及外观 Yield and appearance	TE 溶解难易 Dissolution in TE	沉淀效果 Effect of precipitation	去杂能力 Removal of impurity
盐乙醚处理法 DNA water-saturated ether method	提取率较高,纯白色沉淀	容易溶解	纤维状	多糖蛋白质均能有效去除
苯酚氯仿处理法 DNA phenol/chloroform method	提取率高,白色沉淀	较难溶解	冻胶团状	蛋白质去除效果好,多糖去除差
基本 CTAB 法 DNA basic CTAB method	提取率低,白色沉淀	比较容易溶解	絮状	多糖和蛋白质去除效果尚可,DNA 有损伤

### 2.2 不同提取法 DNA 浓度比较

表 2 表明,以苯酚氯仿处理法用幼穗提取柚基因组 DNA 时浓度达  $118 \text{ ng}/\mu\text{L}$ ,明显高于其它,2 种方法提取的 DNA 浓度,超过 CTAB 基本法的 2 倍。研究数据表明不同取材时期所提 DNA 浓度高低为:老叶 < 幼叶 < 幼穗。不同取材时期柚基因组 DNA 提取率有明显差异是不可避免的,但用基本 CTAB 法提取 DNA 最好只有  $52 \text{ ng}/\mu\text{L}$ ,提取率一般为  $35 \sim 52 \text{ ng}/\mu\text{L}$ ,不同取材时期

提取率都普遍较低,一般不推荐使用。用盐乙醚法提取 DNA 产率居于中间水平,比较接近盐乙醚处理法,不同取材时期提取率为  $47 \sim 101 \text{ ng}/\mu\text{L}$ 。单从差率来看最好的是用苯酚氯仿处理法,不同时期提取率为  $59 \sim 118 \text{ ng}/\mu\text{L}$ 。

在循环利用提取 DNA 比较中,基本上在 Cycle 1 中还能得到初次提取 Cycle 0 中将近一半的产率,说明用柚叶片一次提取不能全部释放细胞的所有 DNA,可供第 2 次提取 DNA 样品的余地还很大。这就对一些样品不

表 2 不同提取法 DNA 浓度

Table 2 The yield of DNA extracted by different extraction methods

$\text{ng}/\mu\text{L}$

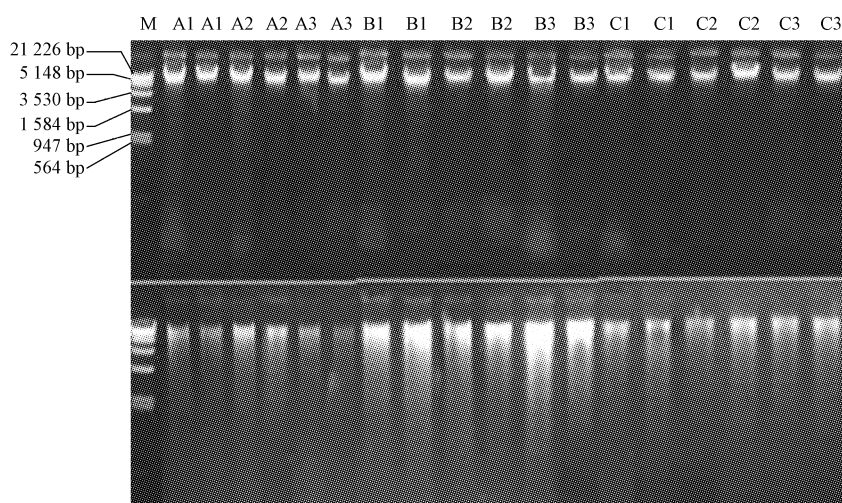
取材时期 Tested material	苯酚氯仿处理法提取 DNA 浓度 Phenol/chloroform method			盐乙醚处理法提取 DNA 浓度 Water-saturated ether method			基本 CTAB 法提取 DNA 浓度 Basic CTAB method		
	Cycle 0	Cycle 1	Cycle 2	Cycle 1	Cycle 1	Cycle 2	Cycle 0	Cycle 1	Cycle 2
春梢幼叶 Tender leaf	89	48	5	78	45	6	45	19	1
春梢幼穗 Tender spike	118	51	7	101	49	9	52	22	1
一年生老叶 Old leaf	59	19	2	47	31	5	35	14	0

易获得的特殊情况相当有利,大大方便了从异地采回的珍贵资源种质的可持续利用效率。

### 2.3 不同 DNA 提取法酶切及 PCR 产物凝胶电泳效果比较

从图 1 可以看出,由盐乙醚处理法提取的酶切图谱最纯净,拖尾现象少,效果最好。而由苯酚氯仿处理法提取的扩增带谱背景噪点明显增多,拖尾现象要严重一些,效果最差。由于其它生物大分子没有去除干净,所提取的 DNA 内含杂质较多,特别是被不同成分多糖包裹,DNA 片段游动时阻力大,带谱分散,显示样品 DNA

质量差。基本 CTAB 法处理酶切图谱效果尚可,但也有一定程度的拖尾。通过酶切图谱比较分析,不同取材时期 DNA 样品酶切图谱效果有显著差异,尤以 B1、B2 和 B3 的对比最为鲜明,其中 B1 和 B2 都是相对幼嫩期,差别不大,但 B3 为老叶的酶切图谱则带拖的相当严重,说明杂质很多。从图 2 可以看出,对样品“贡水白柚”的 2 个不同采样点材料分别用 S13 和 S27 的扩增带谱都十分清晰,说明在柚 RAPD 分析中,对 DNA 样品的质量并不十分敏感,3 种方法所提取的 DNA 都能满足要求。

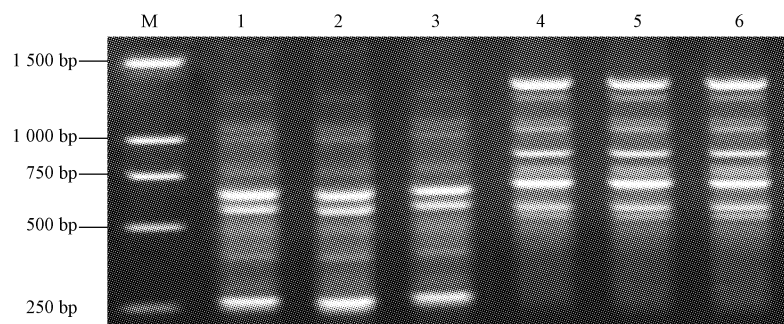


注:M:标准分子量;A、B 和 C 分别为盐乙醚处理、苯酚氯仿处理和基本 CTAB 处理 3 种 DNA 提取方法;1、2 和 3 代表幼叶、幼穗和老叶不同取材时期。

Note:M;DNA marker;A,B and C shows 3 different methods of DNA water-saturated ether,DNA phenol/chloroform and DNA basic CTAB method;1,2 and 3 shows different materials of young leaf,young spike and old leaf.

图 1 3 种提取方法的柚 DNA 限制性内切酶谱电泳分析

Fig. 1 Agarose electrophoresis of DNA and *EcoRI* digestion for *Citrus grandis* (L.) Osbeck by 3 methods



注:M:表示分子量;1~3 为 3 种不同提取 DNA 法用引物 S13 扩增样品贡水白柚(宜恩高罗无性系)带谱;4~6 为 3 种不同提取 DNA 法用引物 S27 扩增样品“贡水白柚”(宜恩李家河无性系)带谱。

Note:M;DNA marker;1—3 shows bands amplified by S13;4—6 show bands amplified by S27.

图 2 引物 S13 和 S27 对“贡水白柚”2 个无性系的 RAPD 扩增效果

Fig. 2 RAPD makers amplified with S13 and S27 primers in 2 clones

### 3 讨论

柚叶片组织包含大量会影响 DNA 提取的物质,其

中多酚就是一种很强的氧化因子,它能够同 DNA 结合,生成褐色凝胶状物;此外,高含量的多糖也使得 DNA 形成粘性沉淀而难以处理<sup>[6]</sup>。为避免酚类物质氧化造成



的褐化,通常就需要在样品提取缓冲液中加入 PVP(聚乙烯吡咯烷酮)以及巯基乙醇、抗坏血酸等巯基试剂等防止氧化。柚资源不同组织、不同发育时期之间 DNA 及代谢产物的含量存在很大的差异,前面该研究结果表明在幼穗期提取效果最好,太早则量不够,太晚则杂质过多。由于 DNA 提取步骤较为复杂和耗时较长,不同 DNA 提取纯化方法的操作细节都会对 DNA 提取产率和质量造成很大影响。有些简化的 DNA 提取方法甚至不经过纯化也可直接用于 PCR 扩增<sup>[7-9]</sup>,但是对多年生植物组织来说,不经过纯化去除多糖多酚等杂质的样品 DNA 用于酶切的话,则带谱弥散严重,无法分析。一般来说 DNA 提取效果以愈伤组织和幼嫩叶为最佳,但一些抽穗期老叶也能获得较好的效果,该试验中提取抽穗期老叶的 DNA 所得的带也比较亮。叶片受伤后,多酚类物质很容易被氧化,应尽可能采用新鲜无损伤的幼叶,如果不方便保存,样品应贮存在液氮或-70℃冰箱中<sup>[10]</sup>。

该研究过程中注意到,在水浴过程中,随着细胞裂解,提取缓冲液慢慢变褐色。分光光度计检测提取 DNA 的  $OD_{260}/OD_{280}$  大部分偏离 1.7~2.0,说明杂质较多;如果不水浴,则 DNA 得率非常少,电泳 DNA 带也较淡。在研钵中研磨也是个值得注意的技术环节,如果在研钵研磨时间短,则细胞组织破碎不完全,影响细胞裂解, DNA 提取率低;如果用研钵研磨时间长,则提取过程中不可避免带来污染和损坏。盐乙醚法虽然提取效果相对苯酚氯仿法也好一些,但操作不方便,而且相对费用

较高。通过摸索,研究者认为在一些条件不能满足高标准情况下,提取 DNA 样品也可以先剪碎柚叶片,再置于研钵,不用灭菌,节省时间。该方法经研究者试验,不用液氮研磨也能得到一定产量的 DNA,这样就可以节省成本,同时也避免了研钵中残留的污染。用这种方法提取 DNA 质量也较高,能满足大多 PCR 要求,有稳定的重复性,能进行高质量的分子标记分析。

#### 参考文献

- [1] 石开明. 利用 RAPD 及 ISSR 标记分析鄂西地区柚种质资源遗传多样性[D]. 武汉:华中农业大学,2004.
- [2] 钟国跃,周华蓉,凌云,等. 黄花蒿优质种质资源的研究[J]. 中草药,1998,29(4):264-267.
- [3] Klimyuk V I, Carroll B J, Thomas C M, et al. Mkal treatment for preparation of plant material for reliable PCR analysis[J]. Plant J, 1993(3): 493-494.
- [4] 汪秀峰,杨剑波,向太阳,等. 一种叶片直接用做 PCR 扩增的新方法及其应用[J]. 中国水稻科学,2002,15(1):67-70.
- [5] 桑贤春,何光华,张毅,等. 水稻 PCR 扩增模板的快速制备[J]. 遗传,2003,25(6):705-707.
- [6] 高玉峰,张攀,郝晓敏,等. 一种快速提取玉米大群体基因组 DNA 的方法[J]. 中国农业大学学报,2011,16(6):32-26.
- [7] 易庆平,罗正荣,张青林. 植物总基因组 DNA 提取纯化方法综述[J]. 安徽农业科学,2007,35(25):7789-7791.
- [8] 石开明,艾训儒,丁莉,等. 鄂西地区青蒿遗传多样性研究[J]. 湖北农业科学,2008,47(7):740-742.
- [9] 丁晓东,吕柳新. 从顽拗植物荔枝中提取基因组 DNA 技术的研究[J]. 应用与环境生物学报,2000,6(2):142-145.
- [10] 石开明,周毅峰. 青蒿组织中快速有效 DNA 提取方法[J]. 安徽农业科学,2008,47(7):740-742.

## Study on Extraction of Genome DNA in Gongshui Pomelo

SHI Kai-ming, DENG Zhi-jun, FANG Xiang-liang

(College of Forestry and Horticulture, Hubei Institute for Nationalities, Enshi, Hubei 445000)

**Abstract:** Taking Gongshui pomelo as test materials, water-saturated ether method, DNA phenol/chloroform method and basic CTAB method were used to extract DNA genome of Gongshui pomelo, the analysis and comparison was conducted from the yield of DNA samples, the appearance of DNA samples and the enzyme electrophoresis of DNA samples. The results showed that the water-saturated ether method proposed the best effect of appearance, which was pure white and fibrous for the frozen precipitation. The yield of genome DNA was the highest from the tender spike with phenol/chloroform treatment of young pomelo leaves, which obtained DNA concentration of 118 ng/ $\mu$ L. It indicated that the quality of DNA was more better with basic CTAB method and water-saturated ether method than phenol/chloroform method by *Eco*RI. moreover, three methods all amplified clear bands of PCR by RAPD primers.

**Keywords:** Gong-shui pomelo (*Citrus grandis* (L.) Osbeck); DNA; extraction