

不同保存方法对石榴成熟叶片基因组 DNA 提取效果的影响

陈 芸^{1,2}, 高原青¹, 王继莲^{1,2}, 马刘峰^{1,2}

(1. 喀什大学 生命与地理科学学院, 新疆 喀什 844006; 2. 叶尔羌绿洲生态与生物资源研究自治区重点实验室, 新疆 喀什 844006)

摘 要:以石榴(*Punica granatum* L.)成熟叶片为试材,设置6种保存方法,采用改良的CTAB法提取石榴基因组DNA,研究了不同保存方法对石榴叶片基因组DNA提取效果的影响。结果表明:采用改良的CTAB法,新鲜叶片、-70℃保存6个月、4℃保存5d的样品均能得到浓度较高的DNA;-20℃保存7d和14d的样品均能得到完整DNA,但浓度略低;硅胶干燥常温保存5个月的样品用同样的方法未能提取到DNA,在对提取方法进行优化后,可提取纯度较高的基因组DNA,但其浓度仅约为鲜叶的50%。上述方法保存的样品提取的基因组DNA均能得到清晰、稳定的SRAP-PCR扩增图谱。

关键词:石榴;保存方法;DNA提取

中图分类号:S 665.403.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)08-0100-04

石榴(*Punica granatum* L.)属石榴科石榴属落叶灌木或小乔木,又名安石榴,在我国已有两千多年的栽培历史。石榴果实营养丰富,富含石榴酸、维生素C、胡萝卜素、微量元素、多酚等多种营养物质及活性成分,具有抑菌^[1]、抗病毒^[2]、抗肿瘤^[3]、降血糖^[4]及预防心脑血管疾病^[5]等作用。以石榴为材料制成的果酒、保健品、护肤品受到了消费者的青睐。

石榴为新疆大力发展的特色林果业,但新疆石榴的种植资源调查、分类、遗传多样性等研究还处在初级阶段。石榴的果实性状是分类研究的重要依据,故石榴遗传多样性调查采样往往要在9月底进行,此时石榴叶片富含多酚、多糖和其它杂质,获得高质量的基因组DNA有一定的难度。新疆幅员辽阔,长距离采样时,液氮罐携带及补充液氮都极不方便,如何保存石榴叶片防止其基因组降解及如何获得高质量夏秋梢石榴基因组DNA成为石榴遗传多样性研究中面临的首要难题。现探讨不同方法保存样品对石榴夏秋梢基因组DNA提取的影响,旨在寻找一种可以用于高质量基因组DNA提取的

样品保存方法,同时探讨提取高质量石榴夏秋梢基因组DNA的方法,以期石榴夏秋梢基因组DNA提取及远距离采样提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为喀什甜石榴叶片,9月中旬采集于新疆喀什什伯什克然木乡石榴园,置于车载冰箱内迅速带回实验室。

试验试剂:DL 2 000 Marker、Taq DNA聚合酶、RNaseA、dNTPs购置于天根生化科技有限公司。引物合成自上海生工。其它药品如CTAB、氯仿、乙醇等均为分析纯试剂。

1.2 试验方法

1.2.1 样品的处理 将采集的石榴叶片用蒸馏水冲洗干净,滤纸吸干后进行如下处理。处理1:新鲜叶片直接用于提取基因组DNA;处理2:叶片分装到冷冻管置低温冰箱内-70℃保存6个月;处理3:叶片分装到冷冻管置冰箱内4℃保鲜保存5d;处理4:叶片分装到冷冻管置冰箱内-20℃冷冻保存,1周后提取基因组DNA;处理5:叶片分装到冷冻管置冰箱内-20℃冷冻保存,2周后提取基因组DNA;处理6:硅胶干燥常温保存5个月提取基因组DNA。

1.2.2 石榴秋梢叶片基因组DNA提取(方法一) 参照王富荣等^[6]的改良CTAB法,并对此方案进行了部分修改,具体方案如下:(1)取0.25g左右的石榴鲜叶于预冷的研钵中,加2%PVP研磨成细粉,转至10mL无菌

第一作者简介:陈芸(1980-),女,浙江天台人,硕士,讲师,现主要从事植物分子遗传等研究工作。E-mail:chenyun8111@126.com.

责任作者:马刘峰(1979-),女,安徽蚌埠人,博士,副教授,现主要从事植物基因工程等研究工作。E-mail:maliufeng@126.com.

基金项目:新疆维吾尔自治区高校科研计划资助项目(XJEDU2013S35);喀什大学校内课题资助项目((11)2411)。

收稿日期:2015-09-24

离心管中,加入预热的 $2\times$ CTAB 缓冲液 3 mL,临用时加 2% β -巯基乙醇,上下颠倒混匀数次,65℃水浴 1 h,期间摇匀数次;(2)取出离心管冷却至室温,加入等体积的氯仿/异戊醇(24:1),轻缓上下颠倒混匀 1 min,静置 5 min;(3)室温下 5 000 r/min 离心 30 min;因离心力达不到,增加离心时间后上清液中仍有少许的绿色漂浮物的现象,在吸取上清液时应注意切勿吸到绿色物质。(4)将上清液转入另一离心管中,加等体积氯仿/异戊醇(24:1),颠倒混匀,5 000 r/min 离心 30 min;(5)上清转入另一离心管,加 1/2 体积 5 mol/L NaCl,混匀,加等体积预冷异丙醇,混匀,室温静置 15 min;(6)5 000 r/min 离心 15 min,弃上清;(7)70%乙醇洗沉淀 2 次,沉淀转移至 1.5 mL EP 管,12 000 r/min 离心 5 min,弃尽上清,室温微干;(8)将沉淀溶于含 RNase A(10 mg/mL)的 100 μ L TE 缓冲液中 37℃水浴 1 h;(9)取出离心管,补充 TE 溶液至总体积 500 μ L,然后加 50 μ L 体积 CTAB/NaCl 和 500 μ L 的酚:氯仿:异戊醇(25:24:1),颠倒混匀,室温静置 5 min;(10)12 000 r/min 离心 10 min,取上清于另一支 EP 管,加等体积的氯仿:异戊醇(24:1),颠倒混匀,室温下静置 5 min;(11)12 000 r/min 离心 10 min;(12)取上清于另一支 EP 管,加入 1/10 体积 3 mol/L NaAc(pH 5.2)和 2 倍体积预冷的无水乙醇,颠倒混匀,−20℃静置 1 h(时间尽量延长,可过夜);(13)12 000 r/min 离心 10 min,弃上清;(14)用 70%乙醇洗沉淀 2 次,12 000 r/min 离心 5 min,弃尽上清,室温干燥;(15)沉淀溶于 100 μ L TE,−20℃保存。

1.2.3 优化 CTAB 法提取石榴秋梢叶片基因组 DNA (方法二) 由于处理 6 的样品用方法一未提取到 DNA,故对方法一进行优化,步骤如下。(1)取 0.06 g 左右硅胶干燥的石榴叶片(新鲜叶片 0.11 g 左右)于液氮中(加 4% PVP,0.02 g 抗坏血酸)研磨成细粉,转至 2 mL 无菌 EP 管中,加入 1.5 mL 预热的 $2\times$ CTAB 缓冲液(临用时加 2% β -巯基乙醇)上下颠倒混匀,65℃水浴 45 min,期间轻缓摇匀数次;(2)取出 EP 管冷却至室温,12 000 r/min 离心 10 min;(3)将上清转入另一支 2 mL EP 管,加等体积的氯仿:异戊醇(24:1),轻缓上下颠倒混匀,静置 3~5 min;(4)室温下 12 000 r/min 离心 10 min;(5)上清转入另一支 2 mL EP 管,加 1/10 体积的 CTAB/NaCl 及等体积氯仿:异戊醇(24:1),上下颠倒混匀 1 min,静置 5 min,12 000 r/min 离心 10 min;(6)将上清转入另一支 EP 管中,加入 1/2 体积 5 mol/L NaCl 混匀,再加入等体积预冷的异丙醇,颠倒混匀,室温下静置 15 min;(7)12 000 r/min 离心 10 min,弃上清(如果能用弯头玻璃管将沉淀钩出于另一支离心管中更好);(8)70%乙醇洗涤沉淀 2 次,并将沉淀溶于含 RNase A(10 mg/mL)的 100 μ L TE 缓冲液中 37℃水浴 1 h(注:该步骤中的 TE 可以适量增加至 200 μ L,使沉淀完全溶于 TE 后,利于

RNase A 的充分消化)。余下步骤与 1.2.2 中的方法相同,只是在步骤(10)和(11)之间再增加一步取上清,加等体积的酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)抽提。最后一步溶解沉淀时,因硅胶干燥保存样品提取的基因组 DNA 浓度较低,将沉淀仅溶于 30 μ L TE,−20℃保存。

1.2.4 基因组 DNA 的纯度及浓度检测 用核酸蛋白测定仪测定提取的基因组 DNA 在波长 260 nm 和波长 280 nm 处的吸收值,根据 OD_{260}/OD_{280} 值来检测样品 DNA 的纯度和浓度。同时,采用 0.8%的琼脂糖凝胶(含 0.5 μ g/mL 的 Goldview 溶液)进行电泳,在凝胶系统成像分析仪上照相,验证所提 DNA 的纯度及浓度。

1.2.5 SRAP-PCR 产物检测 以不同保存方法保存的石榴叶片所提取的基因组 DNA 为模板,将每个样本基因组 DNA 用双蒸水稀释至约 50 ng/ μ L,以 SRAP 标记引物^[7](正向引物 Me7: TGAGTCCAAACCGGACG;反向引物 Em10: GACTGCGTACGAATTTCAT)组合进行扩增。扩增体系:反应体系总体积为 25 μ L,含 DNA 75~100 ng,dNTPs 0.5 mmol/L,Mg²⁺ 2 mmol/L,上、下游引物各 0.4 μ mol/L,Taq DNA polymerase 2 U,10 \times PCR buffer 2.5 μ L,补足超纯水至 25 μ L。参照 LI 等^[8]的扩增程序:94℃预变性 5 min;94℃变性 1 min;35℃复性 1 min,72℃延伸 1 min,5 个循环;94℃变性 1 min,50℃复性 1 min,72℃延伸 1 min,35 个循环;72℃延伸 10 min。4℃保存。取 PCR 产物 8 μ L 加入 6 \times Loading buffer 3 μ L,于 8%的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测。

2 结果与分析

2.1 紫外吸收检测基因组 DNA 的纯度

DNA 的嘌呤和嘧啶中都有共轭双键,对紫外光有强烈的吸收作用,其浓度和纯度可以通过测定 OD_{260}/OD_{280} 检测。低于 1.6 则说明所测样品中有蛋白质、酚等小分子杂质可能未除净,高于 1.9 则说明样品中有 RNA。由表 2 可知,处理 2、3 的叶片与新鲜叶片基因组 DNA 浓度和纯度无明显差异;处理 4、5 与新鲜叶片基因组 DNA 相比纯度差异不大,但浓度较低。处理 6 的石榴叶片用方法一提取基因组 DNA 浓度和纯度都很低,对方法一进行优化后(方法二)可提取到纯度较高但浓度略低的基因组 DNA。

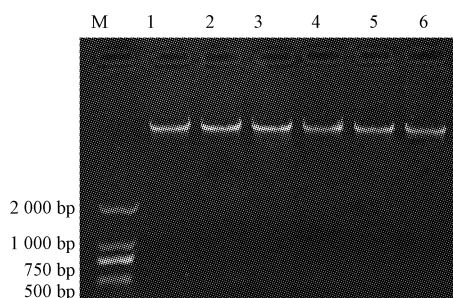
表 1 不同保存方法提取的 DNA 产物纯度和浓度

Table 1 Concentration and purity of different DNA products

样品 Sample	DNA 沉淀外观 Appearance of DNA precipitation	浓度 Concentration /(ng· μ L ⁻¹)	纯度 Purity (OD_{260}/OD_{280})
1	无色透明	651	1.82
2	无色透明	617	1.86
3	无色透明	623	1.78
4	无色透明	567	1.73
5	无色透明	532	1.77
6(方法一)	棕色沉淀	29	1.46
6(方法二)	乳白色沉淀	356	1.64

2.2 琼脂糖凝胶电泳测定基因组 DNA 的浓度

由图 1 可知,新鲜叶片的电泳谱带清晰,有一条明亮的 DNA 条带,且无明显拖带和点样孔亮的现象,说明提取的基因组 DNA 纯度和浓度较高,杂质较少;处理 2、3 的叶片提取基因组 DNA 的电泳谱带亮度与新鲜叶片的相似,说明提取的基因组 DNA 纯度和浓度较高,杂质较少;处理 4、5 的叶片提取的基因组 DNA 电泳谱带亮度相较于新鲜叶片较淡,说明提取的基因组 DNA 纯度较高但浓度较低。处理 6 的叶片用方法一提取的基因组 DNA 在电泳中检测不到整齐明亮的条带,浓缩 5 倍后可以检测到模糊的条带,说明提取的基因组 DNA 浓度和纯度都很低。使用方法二可提取到纯度较高但浓度较低的基因组 DNA。



注:M,DL 2 000 DNA marker;1~6:处理 1~6 样品。

Note: M,DL 2 000 DNA marker;1~6: Treatment 1~6 samples.

图 1 石榴基因组 DNA 检测结果

Fig. 1 Test result of genomic DNA of pomegranate

2.3 SRAP-PCR 扩增检测

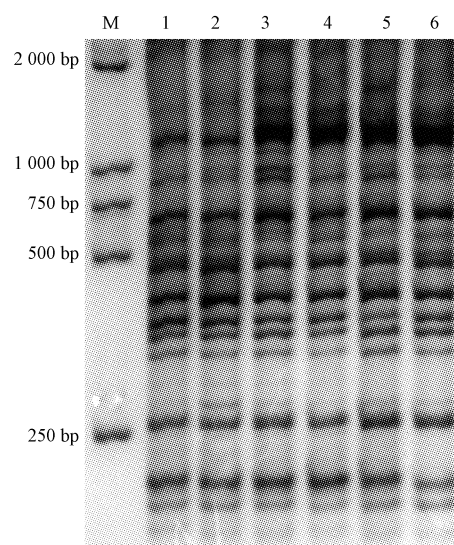
以 1.5 μ L 基因组 DNA 作为模板进行 SARP 扩增,取 8 μ L PCR 产物于 8% 的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳。由图 2 可知,不同处理方法均可得到丰富清晰的条带,扩增效果理想,证实提取的基因组 DNA 质量较好。

3 讨论

3.1 成熟石榴叶片 DNA 提取方法

该试验对使用台式低速离心机(室温下最高转速 5 000 r/min)大量提取基因组 DNA 方法(方法一)进行了探索,结果表明,采用普通的低速离心机除硅胶干燥保存方法外,其它保存方法均可提取纯度较高的基因组 DNA。改良的 CTAB 法前几步离心均需用到大容量高速冷冻离心机,此设备价格昂贵,一些普通教学实验室并不具备,该试验方法一使用台式低速离心机,降低了基因组 DNA 大量提取对试验设备的要求。

硅胶干燥后的叶片用方法一提取基因组 DNA 浓度较低,且提取的基因组 DNA 用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳未能检测出来,浓缩 5 倍后可看到模糊的条带。为了提高硅胶干燥后的石榴秋梢叶片基因组 DNA 的提取质量和浓度,该试验在方法一的基础上进行了优化(方法二),



注:M,DL 2 000 DNA Marker;1~6,处理 1~6 样品。

Note: M,DL 2 000 DNA Marker;1~6: Treatment 1~6 samples.

图 2 石榴 DNA 的 SRAP-PCR 扩增图谱

Fig. 2 SRAP results of genomic DNA of pomegranate

主要优化步骤和注意事项如下。第一,采用液氮进行充分研磨(切勿在无液氮的情况下对样品进行研磨),样品充分研磨后呈圆滑细小的粉末状,颜色开始由绿偏白,并在磨样前加入 4% 的 PVP 和 0.02 g 抗坏血酸,若 PVP 含量大于 4% 会导致裂解液密度过高,水浴裂解离心后试管上层会有绿色漂浮物,增加吸上清的难度,若 PVP 含量低则多酚不易除去;第二,在含有少量液氮的情况时将粉末转移至 65℃ 预热的提取缓冲液中,并立刻与缓冲液充分混匀,可有效防止叶片内的基因组 DNA 的降解和酚类物质发生褐变;第三,适当加大提取缓冲液量,因硅胶干燥叶片吸水性较强,易沉淀管底或凝结成块状,故 65℃ 水浴的前 10 min 必须每隔 1~2 min 轻轻上下颠倒混匀,之后每隔 5~10 min 上下颠倒混匀,防止沉淀结块状不利于细胞的裂解;第四,在预冷的异丙醇沉淀后,沉淀晾干后,TE 溶液多加一些,可加至 250 μ L,使沉淀完全溶解后再加入 RNaseA,有利于基因组 DNA 中的 RNA 消化完全;第五,异丙醇沉淀后,增加一次酚:氯仿:异戊醇抽提;第六,在预冷的无水乙醇沉淀后,由于硅胶干燥保存叶片提取的基因组 DNA 浓度较低,故将沉淀溶于 30 μ L TE 溶液中-20℃ 保存。

3.2 用于基因组 DNA 提取的石榴叶片保存方法

硅胶干燥法保存植物材料用于基因组 DNA 提取是否可行因物种不同而存在差异。胡翔宇等^[9]研究结果表明采用硅胶干燥法保存的五层林叶片 DNA 含量迅速下降。李志真等^[10]用硅胶干燥法保存光皮桦叶片,能提到含量较低的 DNA,但以此模板扩增,不能获得 RAPD 扩增图谱。靖相等^[11]采用硅胶干燥法保存腊梅叶片,

提取到纯度高、无降解的基因组 DNA,但得率约为鲜叶的 1/3。吕杰等^[12]、李莉等^[13]对胡杨、串杆枣的研究表明,硅胶干燥法保存的叶片能提取到纯度和得率与鲜叶相当的 DNA。该试验结果表明,与新鲜叶片相比,硅胶干燥保存的石榴叶片基因组 DNA 提取比较困难。对提取方法改良后,可以提取到纯度较高但得率略低的基因组 DNA。而且以此 DNA 为模板,可获得清晰的 SRAP-PCR 扩增图谱。

该试验中 6 个处理的叶片均可提取到纯度较高的基因组 DNA,但与新鲜叶片提取基因组 DNA 的浓度相比较,−70℃ 与 4℃ 保存石榴叶片提取的基因组 DNA 无明显差异,−20℃ 保存 7、14 d 的叶片基因组 DNA 含量下降。硅胶干燥保存石榴叶片的基因组 DNA 浓度最低。由以上结果可知,若条件允许,新鲜叶片、4℃ 保存 5 d 和 −70℃ 保存 6 个月都是比较好的石榴叶片保存方法。如果没有超低温冰箱,−20℃ 可以保存石榴叶片 14 d。长距离采样时,液氮罐携带及补充液氮都极不方便,低温环境也难以长时间保持,所以硅胶干燥保存样品也是可行的,但此法提取的基因组 DNA 浓度较低,采样时应加大采样量。

参考文献

- [1] 董周永,郭松年,赵国建,等. 石榴果皮提取物抑菌活性研究[J]. 西北植物学报,2008,28(3):582-587.
- [2] 郑菊映,卢成瑜,杨权生,等. 番石榴叶治疗小儿轮状病毒肠炎的临床疗效观察[J]. 现代中西医结合杂志,2010,19(2):140-141.
- [3] 杨建宇,陈韵,郑春兰,等. 石榴的生物活性及其抗炎和抗肿瘤作用[J]. 云南大学学报(自然科学版),2008,30(S1):430-438.
- [4] 王婧茹,赵晶晶,叶春玲,等. 番石榴叶总三萜对 2 型糖尿病大鼠的降血糖和血脂作用[J]. 中国病理生理杂志,2012,28(6):1109-1113.
- [5] 冯立娟,陶吉寒,尹燕雷,等. 石榴功能物质鞣花酸研究进展[J]. 食品科学,2014,35(23):325-330.
- [6] 王富荣,赵剑波,章镇,等. 适于 AFLP 分析用的桃成熟叶片 DNA 提取方法[J]. 果树学报,2006(4):638-641.
- [7] MOHAMMAD H S, MAJID T, BADRALDIN E S. Use of SRAP markers to assess genetic diversity and population structure of wild, cultivated, and ornamental pomegranates (*Punica granatum* L.) in different regions of Iran[J]. Plant Syst Evol, 2012, 298: 1141-1149.
- [8] LI G, QUIROS C F. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction; its application to mapping and gene tagging in Brassica[J]. Theor Appl Genet, 2001, 103: 455-461.
- [9] 胡翔宇,丁琼,宋希强,等. 2 种保存方法对五层兰基因组 DNA 提取质量的影响[J]. 热带作物学报,2014,35(8):1546-1550.
- [10] 李志真,谢一青,黄儒珠,等. 不同保存方法对光皮桦总 DNA 提取效果的影响[J]. 分子植物育种,2006,4(1):131-134.
- [11] 靖相密,褚云霞,汤庚国,等. 不同保存方法对蜡梅总 DNA 提取效果的影响及 ISSR-PCR 验证[J]. 分子植物育种,2008,6(2):387-392.
- [12] 吕杰,马媛,金湘,等. 硅胶干燥胡杨叶片 DNA 提取与 RAPD 反应体系的建立[J]. 北方园艺,2011(14):131-134.
- [13] 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.

Effect of Different Preservation Methods on Genomic DNA Extraction of Pomegranate

CHEN Yun^{1,2}, GAO Yuanqing¹, WANG Jilian^{1,2}, MA Liufeng^{1,2}

(1. College of Biology and Geography Science, Kashgar University, Kashgar, Xinjiang 844006; 2. The Key Laboratory of Ecology and Biological Resource in Yarkant Oasis at Colleges and Universities Under the Department of Education of Xinjiang Uygur Autonomous Region, Kashgar, Xinjiang 844006)

Abstract: Taking leaves of *Punica granatum* L. as materials, six methods of preserving fresh leaves were designed, genomic DNA was extracted by improved CTAB method, the effect of different preserving methods on genomic DNA extraction was studied. The results showed that the DNA extracted from leaves stored about 6 months at the −70℃ and 5 days at 4℃ could get the same high quality comparing with the fresh leaves. Genomic DNA also could be extracted from sample stored 7 and 14 days at −20℃, but the concentration was slightly lower than that extracted from fresh leaves. However, DNA from silica gel-dried sample was not obtained by the same way. After optimization of the DNA extraction method, the high-purity DNA from silica gel-dried sample was got, but the concentration of DNA were about 50% comparing with fresh leaves. Genomic DNA extracted from samples preserved as the above-mentioned six methods could meet the demands for SRAP amplification. Clear and perfect SRAP amplification patterns were obtained.

Keywords: *Punica granatum* L.; preserved methods; DNA extraction