

# 适于 SSR 分析的树莓基因组 DNA 的快速提取

张玉平<sup>1,2</sup>, 金万梅<sup>2</sup>, 许奕华<sup>3</sup>, 崔秋华<sup>2</sup>, 潘青华<sup>2</sup>, 李少宁<sup>2</sup>

(1. 中国农业大学 农学与生物技术学院, 北京 100094; 2. 北京市农林科学院 林业果树研究所, 100093; 3. 北京市农林科学院科研处, 北京 100089)

**摘要:** 通过改良 CTAB 法对不同品种的树莓幼嫩叶片进行 DNA 提取, 并对得到的 DNA 进行了电泳检测、含量测定和 SSR 分析。结果表明: 该方法所提 DNA 的纯度和产率都较高,  $OD_{260}/OD_{280}$  比值均介于 1.7~1.9 之间,  $OD_{260}/OD_{230}$  比值介于 2.0~2.5 之间, 无降解现象, RNA 去除干净, 产率均在 50~130  $\mu\text{g}/\text{mL}$  之间。经 SSR-PCR 分析条带清晰, 多态性好, 说明此方法提取的树莓基因组 DNA 完全适于 SSR 分析。

**关键词:** 树莓; DNA 提取; SSR

**中图分类号:** S 663.203.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2009)10-0068-03

树莓为蔷薇科(Rosaceae)悬钩子属(*Rubus* L.)植物<sup>[1]</sup>, 果实营养十分丰富, 含有大量人体所需的糖分、有机酸、氨基酸、维生素及多种微量元素, 尤其是富含抗衰老物质 Ve、SOD、 $\gamma$ -氨基丁酸及抗癌物质鞣花酸, 在医药、化妆、保健、食品加工等方面有着广泛的用途<sup>[2]</sup>。目前生产上的栽培品种主要由国外引进, 很多品种的表现不如原产地, 而且品种混乱, 因此, 开展树莓品种选育工作的研究势在必行。我国悬钩子属植物野生资源十分丰富, 已发表的种类有 201 个种, 98 变种<sup>[3]</sup>, 长期野生状态造成遗传关系复杂, 加上树莓存在无融合生殖特性, 给常规杂交育种带来了难题, 利用分子生物学手段研究树莓遗传多样性和其亲缘关系将推动我国杂交育种工作的进程。

采用分子手段研究我国悬钩子属植物的遗传基础, 首先获得高质量的 DNA 是利用分子标记技术进行研究的重要环节之一<sup>[3-8]</sup>。目前国内在树莓上利用分子水平的研究还很少, 该试验主要对树莓基因组 DNA 提取进行研究, 建立高质量 DNA 提取及 SSR 检测体系, 为品种资源的开发和利用奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

从田间(北京市农林科学院树莓资源圃及中国林业科学院生态研究所顺义树莓基地)采集不同品种的树莓幼嫩叶片, 将其放入冰壶中带回实验室, 然后用清水冲洗干净, 吸干表面水分后放入 $-80^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存备用。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 DNA 提取 称取幼嫩叶片 1.0 g, 放入在 $-20^{\circ}\text{C}$

冰箱中充分预冷的瓷质研钵中, 加入液氮充分研磨至粉末状, 研磨过程中不断添加液氮, 勿使其干。把研磨粉末装入 2 mL 离心管中, 加 1~1.5 mL 去糖缓冲液(1 mol/L NaCl, 0.4 mol/L 葡萄糖, 2% PVP 40 000, 0.1 mol/L Tris-HCl), 5 000 rpm 离心 10 min, 观察上清液颜色及黏度, 到颜色变白, 清澈透明时即可, 一般需要 1~2 次。弃去上清液, 加入 $65^{\circ}\text{C}$ 预热的 CTAB 提取缓冲液 0.8 mL (2% CTAB, 2% PVP 40 000, 1.4 mol/L NaCl, 0.02 mol/L EDTA, 0.1 mol/L Tris-HCl),  $65^{\circ}\text{C}$ 水浴 60 min, 其间轻轻摇匀数次, 12 000 rpm 离心 15 min, 取上清液。加入等体积氯仿:异戊醇(24:1), 混匀, 12 000 rpm 离心 10 min, 取上清。如果上清液颜色浑浊或有颜色, 需延长离心时间, 再加入等体积氯仿:异戊醇(24:1)抽提 1 次。在吸取上清液时应仔细观察上下 2 层的界面, 不可将杂质吸出。加入 2 倍体积 $-20^{\circ}\text{C}$ 预冷的无水乙醇和 1/10 体积的 3 mol/L 的 NaAc, 轻轻颠倒混匀, 肉眼可以观察到白色丝状或絮状沉淀。 $-20^{\circ}\text{C}$ 静置 20~30 min, 然后 12 000 rpm 离心 15 min, 此时可看到白色 DNA 沉淀于离心管底部。轻轻弃去上清液, 用适量预冷 75%乙醇清洗沉淀 3 次。将沉淀在室温下干燥 2~3 h, 直到闻不到乙醇气味。然后溶于 30~50  $\mu\text{L}$  TE (Tris-HCl 10 mol/L, EDTA 1 mol/L, pH 8.0)中。加入 1%体积 10 mg/mL RNase 于 $37^{\circ}\text{C}$ 保温 60 min。

**1.2.2 DNA 质量检测方法** DNA 纯度和产率检测: DNA 样品按 25 倍稀释后, 测定 260 nm 和 280 nm 处的紫外吸收值, 计算出  $OD_{260}/OD_{280}$  和  $OD_{260}/OD_{230}$  的值, 若  $OD_{260}/OD_{280}$  值介于 1.7~1.9 之间,  $OD_{260}/OD_{230}$  在 2.0~2.5 之间, 则表明 DNA 纯度较好。按照 1 个  $OD_{260}$  值相当于 50 ng/ $\mu\text{L}$  和稀释倍数来换算 DNA 的浓度, 并计算 DNA 的产率。DNA 的完整性检测: 取 2  $\mu\text{L}$  DNA 原液加 3  $\mu\text{L}$  溴酚兰指示剂, 枪头反复吸 3 次混匀, 在 0.7%

第一作者简介: 张玉平(1972-), 女, 在读硕士, 副研究员, 研究方向为树莓资源与育种。E-mail: zhyp7204@yahoo.com.cn

收稿日期: 2009-05-20

的琼脂糖凝胶(含 EB)上电泳, 点样要快, 避免样品在凝胶中逸散。电压 110 V, 时间 50 min, 在紫外凝胶成像系统下检测其完整性及 RNA 去除情况, 并拍照。PCR 扩增: SSR 扩增在美国 MJ 公司的 PTC-100 型 PCR 仪上进行。25  $\mu$ L 反应体系含有: 10 mM Tris-HCl(pH 8.3), 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM dNTPs, 0.8  $\mu$ M 引物(Graham J 等<sup>[9]</sup>设计的 Rubus 116a)。P1: 5'CCAACCCAAAAC-CTTCAAC3'和 P2: 5'GTTTEGGCATGGCCT TTTAT 3'(上海生工生物技术有限公司北京合成部), 0.5 U Taq DNA 聚合酶(上述药品均来自北京天根生化科技有限公司), 100  $\mu$ g/mL 的模板 DNA, 扩增程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 45 s, 51~60 $^{\circ}$ C 复性 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 共 30 个循环, 最后在 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。

2 结果与分析

2.1 DNA 纯度和产率的测定

采用该试验方法重复抽提所获得的基因组 DNA 的紫外分析结果见表 1, 由表 1 可看出, 改进 CTAB 法从树莓幼嫩叶片中提取出了高质量的基因组 DNA, 每一样品的 OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 比值都介于 1.7~1.9 之间, OD<sub>260</sub>/OD<sub>230</sub> 比值介于 2.0~2.5 之间, 所提取的 DNA 均为白色絮状沉淀, 干后较透明, 说明基本无蛋白质、RNA、多糖和酚类等杂质的污染, 且无残余的盐存在, 纯度较好。各品种 DNA 产率较高, 均在 50~130  $\mu$ g/mL 之间。

表 1 不同树莓品种幼嫩叶片基因组 DNA 紫外分析结果

Table 1 UV scanning results of genomic DNA from young leaves of different bramble cultivars						
编号 Code	OD <sub>260nm</sub>	OD <sub>280nm</sub>	OD <sub>230nm</sub>	OD <sub>260</sub> / OD <sub>280</sub>	OD <sub>260</sub> / OD <sub>230</sub>	产率 Production / $\mu$ g $\cdot$ mL <sup>-1</sup>
1	0.2457	0.1368	0.1154	1.80	2.13	122.9
2	0.1905	0.1015	0.0880	1.88	2.17	95.3
3	0.1383	0.0739	0.0671	1.87	2.06	69.1
4	0.2253	0.1234	0.1103	1.83	2.04	112.7
5	0.2383	0.1294	0.1097	1.84	2.17	119.2
6	0.2360	0.1278	0.1113	1.85	2.12	118.0
7	0.2330	0.1248	0.1093	1.87	2.13	116.5

2.2 DNA 电泳检测

不同品种树莓 DNA 提取原液的琼脂糖凝胶电泳分析如图 1 所示, 各品种 DNA 主带清晰, 无弥散带和明显的 RNA 带, 说明蛋白质、多糖、RNA 等杂质去除比较完全, 纯度较高, 完整性也较好。这与紫外分光光度计的定量分析结果相一致。

2.3 SSR 扩增

为了进一步验证改进 CTAB 法对树莓幼嫩叶片提取的 DNA 的效果, 将样品 DNA 稀释至 100  $\mu$ g/mL, 进行 PCR 扩增, 扩增产物在 2% 琼脂糖凝胶上电泳(见图 2)。结果表明, 24 个不同品种 DNA 样本均扩增出较清晰的条带, 其中 15、16、21、24 这 4 个品种为黑莓, 条带最

为清晰, 片段大小在 500~750 bp, 其它为单季或双季红莓, 分别为 1 或 2 条带, 片段大小 180~350 bp, 说明得到的 DNA 质量好, 纯度高, 基本满足 SSR 分析的要求。

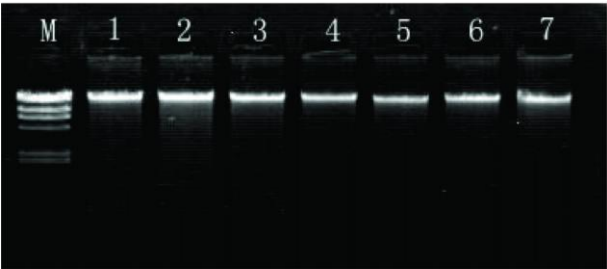


图 1 树莓基因组 DNA 的琼脂糖电泳检测图  
Fig. 1 Agarose gel electrophoresis analysis of genomic DNA on bramble



图 2 树莓基因组 DNA 的 SSR-PCR 检测图  
Fig. 2 SSR-PCR results of genomic DNA on bramble

3 讨论

DNA 提取是进行分子生物学研究最基本的步骤与环节, 其质量的好坏直接关系到试验的成败<sup>[10]</sup>。目前, 从植物中提取 DNA 主要采用 CTAB 法, 在此基础上根据具体材料加以改进。树莓叶片富含多糖、酚类、单宁等物质, 该试验的最初阶段, 采用常规 CTAB 法提取, 但是提取到的 DNA 大多呈粘稠状, 且为浅褐色沉淀。多糖类物质易与 DNA 形成黏稠的胶状物, 给 DNA 的分离和纯化带来困难, 多酚类物质不仅易被氧化褐变, 而且还可抑制 Taq DNA 聚合酶的活性, 从而影响 PCR 扩增反应。为此, 参照王富荣等的方法<sup>[11]</sup>, 根据细胞区室化原理, 即多糖和多酚类物质及其它杂质与 DNA 相互隔离的特性, 在加 CTAB 裂解液之前, 先用一种能维持细胞核内外渗透平衡的提取缓冲液进行抽提, 这样可在细胞核裂解前将细胞间和细胞质中的多糖及酚类杂质去除, 避免 DNA 受大量杂质的污染<sup>[12-13]</sup>。为了有效地去除多糖和多酚类等物质的干扰, 提取缓冲液中除含有维持渗透平衡的葡萄糖外, 还加入了 2% 的可溶性 PVP 和 1 mol/L 的 NaCl。2% 的可溶性 PVP 可与酚类物质结合形成水不溶性的复合物<sup>[14]</sup>, 有效地防止了提取过程中组织褐化现象的产生; 1 mol/L NaCl 有助于多糖类物质的

溶解<sup>[5]</sup>, 这样明显降低了多糖及酚类物质等杂质对 DNA 提取的影响。在高离子强度的溶液中, CTAB 与蛋白质和多聚糖形成复合物, 通过氯仿、异戊醇抽提, 去除蛋白、多糖、酚类等杂质后再加入乙醇沉淀 DNA, 进而达到了分离纯化 DNA 的目的。

此外, 在提取过程中必须注意的, 一是快速且充分研磨, 此步是获得高纯度和高产率 DNA 的前提; 二是在用氯仿: 异戊醇(24:1)抽提时一定要仔细, 注意切勿将中间层的杂质析出, 该步是获得高纯度 DNA 的关键。

总之, 通过此方法提取的 60 余个树莓品种基因组 DNA, 纯度较高, 完整性较好, 完全可以满足 SSR 遗传分析。

### 参考文献

- [1] Crandall P C. The management and marketing of raspberries and blackberries[M]. Food Products Press, 1994.
- [2] 桂明珠, 胡宝忠. 小浆果栽培生物学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2002.
- [3] 佟兆国, 王富荣, 章镇. 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.
- [4] 卞贵建, 路艳, 周庆阳. 用于 RAPD 分析的树莓基因组 DNA 提取初报[J]. 广东农业科学, 2007(3): 36-38.
- [5] Fang G, Hammar Rebecca R. A quick and inexpensive method for removing polysaccharide from plant genomic DNA[J]. BioTechniques, 1992, 13

(1): 52-56.

- [6] 艾呈祥, 刘庆忠. 甜樱桃 DNA 的快速提取法[J]. 落叶果树, 2006(2): 4-5.
- [7] 张伟, 谢南锦, 宋显军, 等. 适于 SSR 分析的大豆干种子的 DNA 快速提取[J]. 华北农学报, 2007, 22(2): 133-135.
- [8] 杨丽, 王玉柱, 孙浩元, 等. 扁桃基因组 DNA 的提取[J]. 北方园艺, 2008(2): 210-211.
- [9] Graham J, Smith K, Woodhead M, et al. The construction of a genetic linkage map of red raspberry (*Rubus idaeus* subsp. *idaeus*) based on AFLPs, genomic SSR and EST-SSR markers[J]. Theor Appl Genet, 2004, 109: 740-749.
- [10] 王艳梅, 程丽莉, 翟明普, 等. 中国榛属植物 DNA 提取与 SSR 初步分析[J]. 河南师范大学学报, 2007, 35(2): 129-132.
- [11] 王富荣, 佟兆国, 章镇, 等. 野生桃幼叶 DNA 提取方法的改良研究[J]. 江苏农业科学, 2006(5): 66-69.
- [12] 陈大明, 张上隆, 金勇丰. 一种木本果树基因组 DNA 提取方法研究[J]. 浙江农业大学学报, 1997, 23(6): 621-624.
- [13] 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.
- [14] 罗志勇, 周钢, 陈汀晖, 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.
- [15] 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: 68-107.

(致谢: 中国林业科学院张清华研究员为该试验提供了部分材料, 在此表示感谢。)

## Rapid Extraction of Genome DNA from Bramble for SSR Analysis

ZHANG Yu-ping<sup>1,2</sup>, JIN Wan-mei<sup>2</sup>, XU Yi-hua<sup>3</sup>, CUI Qiu-hua<sup>2</sup>, PAN Qin-hua<sup>2</sup>, LI Shao-ning<sup>2</sup>

(1. College of Agronomy and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100094, China; 2. Beijing Institute of Forestry and Pomology, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Science, Beijing 100093, China; 3. Scientific Research Department, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Science, Beijing 100089, China)

**Abstract:** The genomic DNA samples of young leaves of different bramble cultivars were extracted by improved CTAB method, and the purity and quantity of each DNA obtained was evaluated by agarose gel electrophoresis, UV scanning and SSR analysis. The results showed, the genomic DNA extracted by this method was pure, integral, the value of OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> was 1.7 to 1.9, and the value of OD<sub>260</sub>/OD<sub>230</sub> was 2.0 to 2.5, degradation was nearly free, the RNA was eliminated completely, the production was 50 to 130 μg/mL. SSR-PCR analysis indicated the primer produced clear polymorphic patterns. Therefore this method could be used for extracting ideal DNA samples and suitable for SSR.

**Key words:** Bramble; DNA extraction; SSR