

# 观赏凤梨 DNA 提取方法研究

沈晓岚<sup>1,2</sup>, 葛亚英<sup>2</sup>, 俞信英<sup>2</sup>, 王伟勇<sup>2</sup>, 毛碧增<sup>1</sup>

(1. 浙江大学 农业与生物技术学院 生物技术研究所, 浙江 杭州 310029; 2. 浙江省农业科学院 花卉研究开发中心, 浙江 萧山 311202)

**摘要:** 观赏凤梨(*Bromelia ceae*)叶片呈革质化且多纤维, 含大量次生代谢产物, 常常导致提取的 DNA 产量低、质量差, 影响后续的酶切和 PCR 扩增。针对观赏凤梨多个属的植物, 通过多种不同因素包括提取液、提取部位、研磨方法、沉淀时间等的对比, 对观赏凤梨的基因组 DNA 提取方法进行研究, 成功地掌握了高效的凤梨叶片 DNA 提取方法, 为凤梨后期分子标记等基因组研究打下一定的基础。

**关键词:** 凤梨; DNA 提取方法

中图分类号: S 685.99 文献标识码: A 文章编号: 1001-0009(2009)12-0114-04

制备高质量的基因组 DNA 是进行分子标记、基因克隆、基因组文库和遗传连锁图谱构建等分子生物学研究工作的前提条件。目前已发展出多种方法, 成功从植物叶片、愈伤组织、组培苗、果实、韧皮部等组织器官中提出 DNA。但是在具体操作时, 由于不同植物甚至同一种类的植物组织来源、部位、形态等外在性质的不同以及化学成分、组织结构等内在特点的差异, 在提取基因组 DNA 的时候需要选择不同的方法或者做一些特殊的处理<sup>[1]</sup>。

目前关于观赏凤梨 DNA 提取的报道比较少, 只有在同科的菠萝上有过相关的研究, 观赏凤梨叶片呈革质化且蜡质层厚, 富含纤维、多糖、多酚及其它次生代谢产物<sup>[2]</sup>, 相对来说提取 DNA 的难度要大于大多数禾谷类及蔬菜类植物, 分离出的 DNA 由于多酚被氧化成棕褐色, 多糖等物质与 DNA 结合产生粘稠的胶状物<sup>[3]</sup>, 常常导致获得的 DNA 产量低、质量差, 影响后续的酶切和 PCR 扩增。现针对观赏凤梨多个属的植物, 通过多种不同因素包括提取液、提取部位、研磨方法、沉淀时间等的对比, 对观赏凤梨的基因组 DNA 提取方法进行研究, 并对提取产物进行了琼脂糖凝胶电泳检测、OD 比值检测及酶切连接预扩等分析验证, 成功地掌握了提取高质量的观赏凤梨 DNA 的方法, 为后期凤梨分子标记等其它研究打下了基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试材料来自花卉研究开发中心凤梨种质资源圃,

选取粉菠萝(*Aechmea fasciata* cv. Variegata)、名宝剑(*Vriesea tiffany*)、罗娜星(*Guzmania grand Prix*)、新丹尼斯(*Guzmania wendy*)、*Aechmea victoriana* var. *discolor*、*Neoregelia tristis* x 'Marie' 等 22 份材料, 分属 8 个不同属。

### 1.2 主要试剂及仪器

CTAB、SDS、葡萄糖、PVP、 $\beta$ -巯基乙醇、EDTA 和 Tris 均购于上海生物工程公司; 其它试剂为国产分析纯。所用离心机为 Beckman coulter 公司的 Allegra 64R centrifuge; 恒温水浴锅为上海精宏实验设备有限公司 DK-S24 型; 核酸蛋白测定仪为 beckman coulter 公司的 UV-800; 琼脂糖凝胶电泳仪为北京市六一仪器厂 DYY-II 型; PCR 仪为美国 BID-RAD 公司的 mylyder 型; 聚丙烯酰胺凝胶电泳仪为 Bio-Rad 公司 PAC-3000 型, 电泳槽为 C. B. S. 公司 EPS-6000 II 型, 凝胶成像系统为 Bio-Rad 公司的 Gel Doc 2000 型。

### 1.3 DNA 提取方法

主要参照 Murry 和 Thompson 的方法<sup>[4]</sup>, 并根据刘卫国<sup>[2]</sup>、张如莲<sup>[5]</sup>、陈秀蕙<sup>[6]</sup> 等方法进行简化改良, 取新鲜或冰冻保存的凤梨叶片组织, 加入不溶性的 PVP, 在液氮中研成粉末, 转入预冷离心管, 加入预热至 65℃ 的提取缓冲液, 摇匀后 65℃ 水浴 60 min, 12 000 rpm、4℃ 离心 8 min 后, 将上清液转入另一干净的离心管中, 加入等体积氯仿: 异戊醇(24:1)混匀并上下颠倒数次, 静置后 12 000 rpm、4℃ 离心 10 min, 如果上清混浊, 则再加氯仿: 异戊醇(24:1)抽提 1 次, 取上清液转入另一离心管, 加入 5 mol/L NaCl 和冷冻的异丙醇, 充分混匀, 静置沉淀, 8 000 rpm、15℃ 离心 8 min, 去上清得到白色 DNA, 加 75% 的乙醇漂洗 2~3 次, 风干后加入 100  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O 和 1.2  $\mu$ L RNaseA (10 mg/mL), 37℃ 温浴 45~60 min, 4℃ 保存备用。

第一作者简介: 沈晓岚(1980-), 女, 本科, 助理研究员, 现从事观赏凤梨育种方面的研究工作。E-mail: angalla@163.com.

基金项目: 浙江省科技厅资助项目(2008C22011)。

收稿日期: 2009-06-25

现对其中的一些关键因素及技术参数进行多种设置比较,包括研磨方法:研钵研磨、离心管筷子研磨以及钻头研磨;不同部位的比较:嫩叶、成熟叶和花苞片;不同量的比较:2 mL 管和 10 mL 管;不同提取液的比较:CTAB、SDS、NaHSO<sub>3</sub>和 NaOH;沉淀时间的比较:30 min 和放置过夜等。

1.4 DNA 检测方法

琼脂糖凝胶电泳检测:采用 1.0%的琼脂糖凝胶进行电泳,电压为 3~5 V/cm,每点样孔点样 100~200 ng,电泳缓冲液为 1× TBE,待溴酚蓝跑至离点样孔 2/3 处,停止电泳,并在紫外透射仪下检测 DNA 降解情况和 RNA 消化情况。

OD 值检测:DNA 样品按一定倍数(15~40 倍)稀释后,测定其在 260 nm 和 280 nm 处的紫外吸收值,计算出 D260 nm/D280 nm 的比值,若 D260 nm/D280 nm 值介于 1.8~2.0 之间,则表明 DNA 纯度较好。按照 1 个 D260 nm 值相当于 50 ng/ $\mu$ L 和稀释倍数来换算 DNA 的浓度,并计算 DNA 的产率。

2 结果与分析

2.1 选取材料的差异

2.1.1 不同品种 初期用普通 2 mL 离心管 CTAB 法提取分属 8 个属的 17 种观赏凤梨材料,从提取的 DNA 电泳凝胶结果(见图 1)来看,分属粉菠萝属的 4 个品种(图 1 中的 1、2、15、16)、凤梨属的 1 个品种(图 1 中的 10)、水塔花属的 2 个品种(图 1 中的 3、4),条带均不明显,普遍产量较低;姬凤梨属的 2 个品种(图 1 中的 5、6)、擎天凤梨属的 2 个品种(图 1 中的 7、8)和铁兰属的 2 个品种(图 1 中 12、14)的条带比较弱,其中擎天凤梨属和铁兰属的 2 个品种表现比较不一致,属间差异颇大;属于莺哥凤梨属的 2 个品种(图 1 中的 11、13)和彩叶凤梨属的 2 个品种(图 1 中的 9、17)都得到了纯度产量均高的 DNA,相对比较容易。为进一步探索不同属间差异如此之大的原因,在对提取方法进行调整后,进一步选取了初期试验中最难提取的粉菠萝属、不稳定的擎天凤梨属和比较容易提取的莺哥凤梨属的 3 个品种作为对比,对获得的 DNA 进行凝胶电泳和测 OD 值检测。从凝胶电泳结果来看(见图 2 中的 a 和 c),属于莺哥凤梨属的名宝剑条带最亮,其次是属于擎天凤梨属的罗娜星,属于粉菠萝属的粉菠萝亮度最弱。从 OD 比值来看(见表 1),3 个品种差异并不大,但是从产率来看,差距比较大,在 CTAB 法中,名宝剑产率达到 200  $\mu$ g/g,高出粉菠萝和罗娜星 2 倍之多,在 NaHSO<sub>3</sub>法中,名宝剑的产率也是最高的,最低是粉菠萝,罗娜星居中。不同属之间 DNA 产率差距如此之大,究其原因可能是因为不同属的材料在多糖、蛋白质等次生物质含量上的不同,导致了 DNA 的纯度和产量在不同材料间存在着差别。另

外,粉菠萝叶片正面背面都附大量的毛,极有可能也是其产率不高的原因之一。

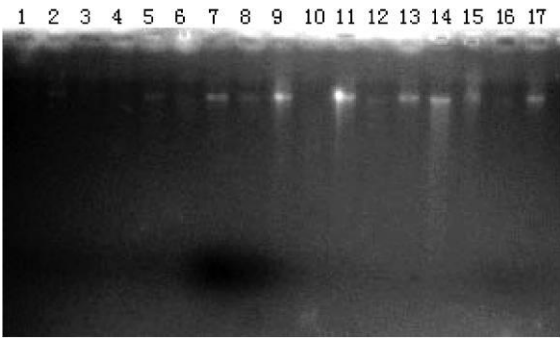


图 1 17 种观赏凤梨 DNA 凝胶电泳结果

2.1.2 不同植株和不同部位 小苗与中苗较成品更容易提取,组培苗则更好。其中从嫩叶、成熟叶、花苞片的比较来看,差距并不大,嫩叶稍好一些。选取嫩叶叶鞘白色部分虽然色素物质干扰少,方便研磨,但极易褐化,造成杂质,最好能现取现提。

2.1.3 选取量的比较 对于提取 DNA 比较容易的莺哥凤梨属和彩叶凤梨属植株来说,使用 2 mL 离心管提取也可以得到质与量均可的 DNA,而对于比较难提的粉菠萝属、凤梨属、姬凤梨属和水塔花属,用 2 mL 离心管就很难得到足够的 DNA 量,必须使用 10 mL 离心管来提取才能获取需要的 DNA 量。

2.2 提取方法的比较

2.2.1 不同提取液 采用了 4 种提取液 CTAB、SDS、NaHSO<sub>3</sub>和 NaOH 进行比较。从电泳结果(见图 2)来看,4 种提取液中,CTAB 和 NaHSO<sub>3</sub>法取得的 DNA 条带都比较明晰,2 个重复比较一致,从 3 个品种的亮度来看,粉菠萝和罗娜星的亮度基本差不多,名宝剑条带最亮,说明这 2 种方法都能获得稳定的 DNA 量;而 SDS 法完全看不到条带,NaOH 法比较不稳定,只有粉菠萝和一个罗娜星出现了条带,其中粉菠萝的 2 个条带比较亮但拖尾严重。从 OD 比值和产率(表 1)来看,CTAB 法得到的 OD 比值都在 1.9 左右,产率也比较高,都在 60  $\mu$ g/g 以上,其中名宝剑的产率更在 200  $\mu$ g/g 以上;NaHSO<sub>3</sub>法得到的 OD 比值基本都在 1.8 左右,产率比较稳定;NaOH 法的 OD 比值只有 1.0 左右,说明杂质较多,产率也浮动很大不稳定;而 SDS 法电泳结果没有条带,所以 OD 比值也不具意义。综合来看,CTAB 和 NaHSO<sub>3</sub>法都能够获得足够的 DNA 量,纯度也比较好,NaOH 表现不稳定,纯度也不够,而 SDS 完全不适用于观赏凤梨的 DNA 提取。

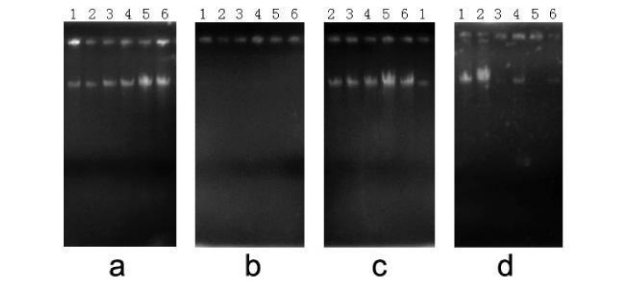


图2 4种方法提取3种凤梨DNA凝胶电泳结果  
注 a 为CTAB法, b 为SDS法, c 为NaHSO<sub>3</sub>法, d 为NaOH法; 1、2 为粉菠萝, 3、4 为罗娜星, 5、6 为名宝剑。

表1 4种方法提取凤梨DNA的OD值比较

方法	编号	260nm	280nm	260/280	产率/μg·g <sup>-1</sup>
CTAB 法	a1	0.5377	0.2819	1.9078	64.52
	a2	0.1970	0.1035	1.9034	23.64
	a3	0.5265	0.2759	1.9083	63.18
	a4	0.8896	0.4665	1.9068	106.75
	a5	1.8491	0.9989	1.8511	221.89
	a6	1.7394	0.9260	1.8783	208.73
SDS 法	b1	0.0180	0.0156	1.1541	2.16
	b2	0.1003	0.0588	1.7066	12.04
	b3	0.3965	0.2109	1.8805	47.58
	b4	0.0096	0.0077	1.2436	1.15
	b5	0.0519	0.0298	1.7447	6.23
	b6	0.1383	0.0733	1.8861	16.60
NaHSO <sub>3</sub> 法	c1	0.2424	0.1382	1.7547	29.09
	c2	0.2273	0.1309	1.7369	27.28
	c3	0.4056	0.2275	1.7828	48.67
	c4	0.5137	0.2768	1.8562	61.64
	c5	0.4676	0.2523	1.8533	56.11
	c6	0.5631	0.3094	1.8203	67.57
NaOH 法	d1	0.1482	0.1570	0.9439	17.78
	d2	0.3650	0.2933	1.2443	43.80
	d3	0.0617	0.0585	1.0541	7.40
	d4	0.6540	0.5920	1.1047	78.48
	d5	0.1993	0.2136	0.9331	23.92
	d6	0.6896	0.6628	1.0405	82.75

注 a 为CTAB法, b 为SDS法, c 为NaHSO<sub>3</sub>法, d 为NaOH法; 1、2 为粉菠萝, 3、4 为罗娜星, 5、6 为名宝剑。

2.2.2 研磨 先后采用了研钵研磨、离心管筷子研磨以及钻头研磨, 其中由于凤梨叶片较硬, 筷子研磨粉碎程度不够且速度慢, 不适用于凤梨叶片, 而研钵研磨与钻头研磨从提取结果来看差别并不大, 说明研钵研磨的粉碎程度已经足够。另外, 在试验过程中发现在研磨中添加PVP, 在提取液中添加β-巯基乙醇, 都是比较有效遏止叶片的褐化的办法, 能够提高DNA的质量和产率。

2.2.3 抽提与沉淀 在抽提过程中, 用氯仿:异戊醇(24:1)抽提2次的结果比较好, 纯度要高; 而沉淀时间, 选择罗娜星、粉菠萝和名宝剑为材料, 通过凝胶电泳, 如图3所示, G1、A1、V1是沉淀30 min后离心清洗的产物, G2、A2、V2则是沉淀放置过夜后再离心清洗获得的DNA, 可以发现G2、A2、V2的条带亮度比G1、A1、V1要

亮的多, 说明沉淀放置过夜比沉淀30 min产量要高很多。在后期的提取过程中均采用60 min沉淀, 能够取得比较高的DNA产量。

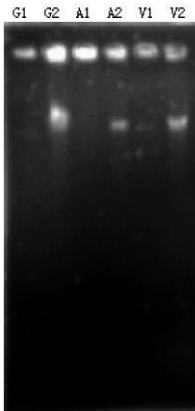


图3 沉淀时间的比较

注: 其中G为罗娜星, A为粉菠萝, V为名宝剑; 1为沉淀30 min, 2为沉淀放置过夜(约12 h)。

3 讨论

凤梨科的植物种类繁多, 各个属和品种间差异颇大, 对一些较易获得DNA的属的品种, 如莺哥凤梨属或彩叶凤梨属, 可以采用简单的2 mL CTAB或者NaHSO<sub>3</sub>提取法, 但要想在多个属之间获得稳定高效的DNA, 最好采用10 mL离心管, 选取嫩叶叶鞘白色部分, 采用研钵或者钻头研磨, 选择CTAB或者NaHSO<sub>3</sub>提取液, 用氯仿:异戊醇(24:1)抽提2次, 沉淀时间则要适当延长。在对4种提取液的对比中发现CTAB和NaHSO<sub>3</sub>的表现都比较好, 而从成本来说, NaHSO<sub>3</sub>要比CTAB低的多, 所以在大批量的提取中, 除了常规使用较多的CTAB外, 也可以考虑使用NaHSO<sub>3</sub>提取液。

参考文献

[1] Csakl U M, Bastian H, Brettschneider R, et al. Comparative analysis of different DNA extraction protocols. A fast, universal maxi2preparation of high quality plant DNA for genetic evaluation and phylogenetic studies [J]. Plant Molecular Biology Reporter, 1998 61: 69-86.

[2] 刘卫国, 易干军, 张秋明, 等. 菠萝DNA的提取及AFLP反应体系的建立[J]. 果树学报 2006 23(1): 51-54.

[3] 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(25): 7789-7791.

[4] Murry H G, Thompson M F. Rapids isolation of high molecular weight plant DNA [J]. Nucleic Acids Research, 1980 8: 4321-4325.

[5] 张如莲, 洪彩香, 傅小霞, 等. 菠萝DNA提取方法的研究[J]. 热带农业科学, 2006(1): 8-10.

[6] 陈秀慧, 何焕新, 曾辉. 菠萝DNA导入黄瓜的初步研究[J]. 海南大学学报(自然科学版), 1998(1): 62-68.

# 二种槭树有效获得无菌试管苗的研究

叶景丰<sup>1</sup>, 陈 罡<sup>1</sup>, 马冬菁<sup>1</sup>, 潘文利<sup>1</sup>, 范俊岗<sup>1</sup>, 祁 爽<sup>2</sup>

(1. 辽宁省林业科学研究所, 辽宁 沈阳 110032; 2. 辽宁省生态公益林项目中心, 辽宁 沈阳 110036)

**摘 要:**以挪威槭的成熟种子、自由人槭的顶芽、幼嫩茎段为外植体, 研究了 0.1% 升汞不同消毒时间、不同培养条件、不同培养基对 2 种槭树有效获得无菌试管苗的影响。结果表明: 挪威槭种子用 0.1% 升汞消毒 8 min, 在 MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.2 mg/L 的培养基上, 黑暗条件、温度 24~26℃下, 有效的获得了无菌试管苗; 自由人槭以顶芽为外植体, 0.1% 升汞消毒 6 min, 在 MS+6-BA 0.5(0.2)mg/L+NAA 0.2 mg/L 培养基上, 光照 3 000~5 000 lx、温度 24~26℃下, 同样有效的获得了无菌试管苗。

**关键词:** 槭树; 外植体; 消毒时间; 培养基; 培养条件  
**中图分类号:** S 792.35 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2009)12-0117-03

槭树植物是槭树属(*Acer*)的泛称, 其木材质地坚硬, 材质细密, 是良好的家具、农具、枕木及建筑用材, 树冠冠幅较大, 树姿优美, 叶形秀丽, 秋季树叶渐变为红色或黄色, 为著名的秋色叶树种, 是理想的行道树或城市绿化庭园树种, 在各地风景园林中得到普遍应用<sup>[1-3]</sup>。挪威槭(*Acer platanoides* Linnd)和自由人槭(*Acer freemanii* Autumn Blaze)是由北美引进的槭树中的经典品种, 该试验介绍这 2 种槭树组织培养初代培养的研究, 有效的获得了 2 种槭树的无菌试管苗, 为这 2 种槭树的组织培养快繁技术研究提供了参考。

## 1 材料与方法

选取饱满的挪威槭种子和自由人槭顶芽、幼嫩茎

段, 用清水冲洗 2~3 h, 在超净工作台上, 去除挪威槭种子外种皮, 剪取自由人槭顶芽和幼嫩茎段, 75% 酒精浸润 30 s, 无菌水冲洗 2~3 次, 0.1% 升汞消毒 4~12 min, 清水冲洗 3~4 次, 接种于添加 2 种不同植物生长调节剂的 2 种不同培养基中(培养基添加蔗糖 30 g/L、琼脂 6 g/L, pH 调至 5.8, 选用正交试验表 L<sub>4</sub>(2<sup>3</sup>)和 L<sub>8</sub>(2<sup>7</sup>), 试验因素和水平见表 1), 放置在温度 22~28℃, 光照条件分别为 3 000~5 000 lx 光照和黑暗的环境中培养, 重复 3 次, 1 周后统计无菌率, 2 周后, 去除污染中毒的统计萌发率, 4 周后统计萌发芽的成苗率。

表 1 试验因素与水平设计

水平	6-BA/mg · L <sup>-1</sup>	NAA/mg · L <sup>-1</sup>	培养基	外植体
1	0.5	0.2	MS	顶芽
2	0.2	0.1	B5	幼嫩茎段

## 2 结果与分析

### 2.1 升汞不同消毒时间对无菌率和中毒率的影响

## Explore About the Method for Extracting DNA of Ornamental Bromelia

SHEN Xiao-lan<sup>1, 2</sup>, GE Ya-ying<sup>2</sup>, YU Xin-ying<sup>2</sup>, WANG Wei-yong<sup>2</sup>, MAO Bi-zeng<sup>1</sup>

(1. Institute of Biotechnology, College of Agriculture and Biotechnology, Zhejiang University, Hangzhou, Zhejiang 310029, China; 2. Zhejiang Academy of Agriculture Science Flower Research Center, Xiaoshan, Zhejiang 311202, China)

**Abstract:** The leaves of ornamental Bromelia plants were coriaceous and rich in fibre and secondary metabolism compounds, which lead the DNA extraction unefficient and low quality, and influence the following enzyme digestion and PCR amplification. We chose several genuses of Bromelia plant, use different part of the matierials, compared with different buffer solutions, trituration methods and deposition time, and summarized a efficient method of DNA extraction for Bromelia plants.

**Key words:** Bromeliaceae; DNA extraction