

一种高质量葡萄基因组 DNA 提取方法

徐美隆¹, 章 雨², 倪细炉³

(1. 国家经济林木种苗快繁工程技术研究中心, 宁夏 银川 750004; 2. Center for Grapevine Biotechnology,

William H. Darr School of Agriculture, Missouri State University, Mountain Grove, MO, USA 65711;

3. 种苗生物工程国家重点实验室, 宁夏 银川 750004)

摘 要:针对葡萄组织中多酚、多糖类物质含量较高的特点,对比研究了利用植物总 DNA 提取试剂盒和改良 CTAB 法提取葡萄总 DNA。结果表明:改良的 CTAB 法能够从不同葡萄品种和不同生长时期的叶片中获得高质量、完整性好的总 DNA,其 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 介于 1.7~1.9 之间,无降解现象,RNA 去除干净,完全适于进行 PCR 和酶切等研究。

关键词:葡萄;DNA 提取;PCR;酶切

中图分类号:S 663.103.6 文献标识码:A 文章编号:1001-0009(2011)15-0172-03

葡萄是世界上种植面积最大的水果,占全球水果种植面积的 10% 以上^[1]。近年来,分子标记技术在葡萄育种辅助选择^[2]、葡萄种类和品种鉴定^[3]、遗传分析^[4]等方面逐步得到了应用。然而,所有的这些分子技术都需要高质量的基因组 DNA,尽管葡萄 DNA 提取的方法已经有了较多的报道^[5-7],但多数都是以幼嫩叶片为材料,由于成熟叶片中含有丰富的多酚、多糖和单宁等粘性物质,从而导致 DNA 提取的难度增加,同时由于品种间的差异,也导致了不同葡萄品种提取的 DNA 质量存在明显差异。现以不同的葡萄品种、不同生长时期的叶片为材料,通过与商品试剂盒比较,获得一种得率高、稳定性好、实用性广的葡萄基因组 DNA 提取方法,为开展葡萄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

葡萄品种“赤霞珠”和‘Norton’的成熟叶片和幼嫩叶片,于 2010 年 12 月分别采集于美国密苏里州立大学果树试验站实验温室。

1.2 试验方法

1.2.1 DNA 提取方法 试剂盒法:采用 QIAGEN 公司 DNA 提取试剂盒, DNA 提取方法完全按照试剂盒使用说明书操作。改良 CTAB 法:称取葡萄叶片 1 g,

加液氮研磨成粉末,放入 50 mL 离心管中,加入 10 mL 提取液(20 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl(pH 8.0), 1.4 M NaCl, 2% CTAB, 1.5% SDS, 1% β-mercaptoethanol),再加入 400 mg PVPP,充分混匀,60~65℃ 水浴 25 min,加入 10 mL 氯仿:异戊醇=24:1,充分混匀,室温下 6 000 r/min 离心 15 min,取上清液,加入 0.7 体积的 5 M NaCl,混匀后,4℃,10 000 r/min 离心 30 min,取上清液,加入 2/3 倍体积的异丙醇,-20℃ 冰浴 30 min,4℃,10 000 r/min 离心 20 min,弃上清液,70% 酒精清洗沉淀物 2 次,1 000 μL 无菌去离子水溶解 DNA,加入 10 μL(10 U/μL) RNase,37℃ 水浴 30 min,酚:氯仿=1:1 抽提 2 次,加 2/3 体积异丙醇和 0.1 体积 NaOAc,-20℃ 冰浴 30 min,4℃ 条件下,10 000 r/min 离心 20 min,弃上清液,70% 酒精清洗 2 次,室温干燥后,400 μL TE 溶解 DNA,置于-20℃ 冰箱中保存备用。

1.2.2 DNA 质量检测 DNA 纯度及产率测定:将提取的 DNA 样品(5 μL)用去离子水稀释至 100 μL 后,测定样品液在 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 的比值,并根据 OD₂₆₀=1.0 时溶液浓度为 50 μg/mL 计算产率。DNA 分子完整性的检测:分别取 5 μL DNA 溶液样品于 1.0% 琼脂糖上电泳,电压 80 V,时间 60 min,凝胶成像仪上进行观察并照相,以检测不同葡萄 DNA 的完整性。DNA 样品用于 PCR 扩增的适应性:取 1 μL DNA 溶液作为模板,根据葡萄 actin 基因特异序列设计引物 GAI-F:5'-CCATTCGGTTCAGTTTAT-3'; GAI-R:5'-TAGTGATTCTTCGTCCC-3',PCR 反应体系为:H₂O 15.8 μL,5×Green buffer 5 μL,dNTP 1 μL,primer(GAI-F) 1 μL,primer(GAI-R) 1 μL,GoTaq 0.251 μL,模板 1 μL。PCR 反应程序为:95℃ 2 min,

第一作者简介:徐美隆(1979-),男,助理研究员,现主要从事植物生物技术研究工作。E-mail:xm1106007@yahoo.com.cn。

基金项目:宁夏回族自治区科技攻关项目国际科技合作专项资助项目;宁夏自然科学基金资助项目(NZ09193)。

收稿日期:2011-05-04

95°C 30 s, 52°C 30 s, 72°C 1.5 min, 35 cycles, 72°C 10 min, 4°C forever。取 5 μ L 扩增产物于 1% 琼脂糖上电泳, 电压 80 V, 电泳时间 60 min, 凝胶成像仪上进行观察并照相。DNA 样品用于酶切的适应性: 分别取 500 ng 总 DNA 溶液作为模板进行酶切, 酶切反应体系: 内切酶 *EcoRV* 用量为 5 个单位, 5 \times 缓冲液 4 μ L, 加去离子水至 20 μ L。酶切温度: 37°C, 酶切时间: 2 h。取酶切产物于 1% 琼脂糖上电泳, 电压 80 V, 电泳时间 60 min, 凝胶成像仪上进行观察并照相。

2 结果与分析

2.1 DNA 纯度和产率

2 种方法从 2 个不同葡萄品种的不同生长期叶片中提取 DNA 的效果具有明显差异(表 1), 无论是“赤霞珠”还是“Norton”, 从葡萄嫩叶中提取的 DNA 产率均高于成熟叶片; 而不同方法之间, 利用试剂盒提取的总 DNA 的产率明显低于改良后的 CTAB 法, 且利用试剂盒提取的 DNA 中除了从“赤霞珠”嫩叶中提取的 DNA 的 OD_{260}/OD_{280} 值为 1.82 外, 其它材料中提取的 DNA 的 $OD_{260}/OD_{280} \leq 1.48$, 而利用改良 CTAB 法提取的 DNA, $1.74 \leq OD_{260}/OD_{280} \leq 1.85$, 说明该方法在不同品种和不同生长期的叶片中提取的 DNA 的纯度较好。

表 1 不同方法从不同葡萄品种不同生长期叶片中提取的 DNA 比较

方法	样品	浓度/ μ g \cdot mL ⁻¹	产率/ μ g	OD_{260}/OD_{280}
试剂盒法	赤霞珠成熟叶	59.6	11.92	1.34
	赤霞珠嫩叶	137.7	27.54	1.82
	Norton 成熟叶	16.6	3.32	1.31
	Norton 嫩叶	74.2	14.84	1.48
新方法	赤霞珠成熟叶	196.9	39.38	1.78
	赤霞珠嫩叶	607.2	121.44	1.84
	Norton 成熟叶	78.8	15.76	1.74
	Norton 嫩叶	241.7	48.34	1.85

2.2 2 种提取方法的 DNA 完整性

DNA 样品经琼脂糖凝胶电泳后可见(图 1), 利用试剂盒法只有从“赤霞珠”嫩叶中提出的 DNA 能得到清晰的电泳条带, 完整性较好, 从“Norton”嫩叶中提出的 DNA 虽然也能见到电泳条带, 但条带不清晰, 说明 DNA 完整性较差, 而 2 个品种的成熟叶中均未有明显的电泳条带。利用改良 CTAB 法在不同材料中提取的 DNA 都能得到清晰电泳条带, 且没有拖尾现象, 说明该方法提取的葡萄 DNA 完整性较好, 无将建现象, RNA 去除干净。虽然电泳前上样的体积相等(5 μ L), 但电泳条带的亮度却差异明显, 来自嫩叶的 DNA 电泳条带明显亮于来自成熟叶片的 DNA 电泳条带, 这与 DNA 浓度检测的结果相一致。

2.3 DNA 样品对 PCR 扩增和酶切的适应性

利用不同方法从不同葡萄品种、不同生长时期叶片中提取的 DNA 为模板, 通过对葡萄 *actin* 基因的 PCR 扩增, 其结果如图 2 所示, 试剂盒提取的 DNA 中, 只有“赤霞珠”嫩叶的 DNA 满足 PCR 反应的要求, 能扩增出符合预期大小的约 490 bp 的片段, 而改良 CTAB 法提取的所有的 DNA 都满足 PCR 反应的要求。同时, 不同 DNA 经 *EcoRV* 酶切(图 3), 利用试剂盒提取的葡萄 DNA, 只有从“赤霞珠”嫩叶中提取的 DNA 酶切图谱呈弥散状, 符合进一步的分子操作要求, 其它的均不符合进一步分子操作要求, 而利用改良 CTAB 法提取的葡萄 DNA, 所有的酶切图谱都呈弥散状, 符合进一步的分子操作要求。

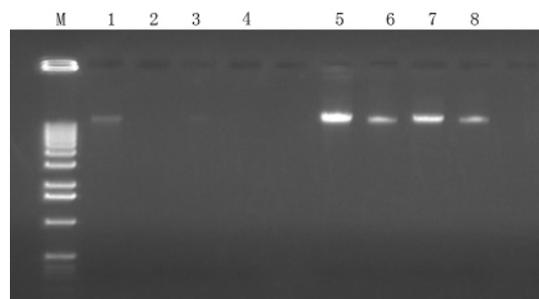


图 1 不同 DNA 电泳图

注: 1, 2, 3, 4: 利用试剂盒提取的 DNA; 5, 6, 7, 8: 利用新方法提取的 DNA; 1, 5: 从赤霞珠嫩叶中提取的 DNA; 2, 6: 从赤霞珠成熟叶片中提取的 DNA; 3, 7: 从 Norton 嫩叶中提取的 DNA; 4, 8: 从 Norton 成熟叶片中提取的 DNA。下同。

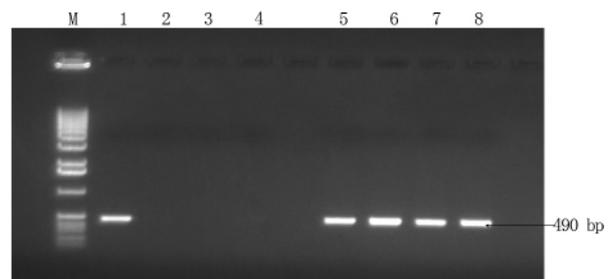


图 2 不同 DNA PCR 扩增产物电泳图

3 讨论与结论

多糖、多酚等物质在 DNA 提取过程中容易与 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^[8]。由于葡萄组织中酚类物质和多糖含量较高, 且随着葡萄叶片生长, 多酚和多糖的含量也随之增加^[9]。因此, 利用不同生长时期的植物组织提取 DNA 的难易程度具有明显的差别, 利用成熟组织提取 DNA 的难度大于幼嫩组织。同一植物不同品种之间提取 DNA 的难易程度也存在差异性, 抗性较强

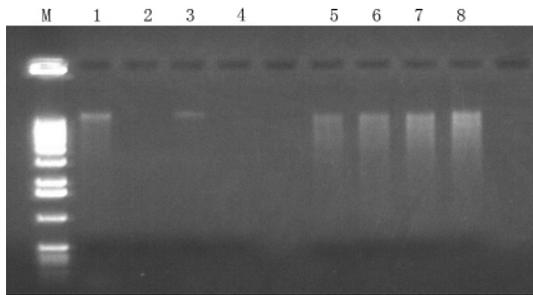


图3 不同DNA酶切产物电泳图

的品种叶片中由于多酚类物质含量比抗性较弱的品种高^[10],往往导致提取DNA的难度较大。试验中选用的葡萄品种“赤霞珠”为欧亚品种,其抗病性和抗寒性等都低于美洲品种‘Norton’,因此,从“赤霞珠”叶片中提取DNA的难度低于‘Norton’。

该研究针对葡萄叶片多糖、多酚、单宁等物质含量偏高,尤其是利用抗性较强的品种成熟叶片提取DNA难度较大的情况,通过一系列措施,有效控制了葡萄叶片中多糖、多酚、单宁等物质对DNA提取的影响。首先是提取液中加入CTAB,并在利用异丙醇沉淀DNA的前加入了高浓度的NaCl,可去除多糖,这是因为在高盐条件下,多糖可与高浓度的CTAB结合形成沉淀^[11],并通过离心去除多糖;其次, β -巯基乙醇和PVPP的组合也有效避免了DNA在抽提过程中受多酚物质的影响,因为PVPP是一种高分子合成树脂,能络合多酚物质,防止酚类化合物氧化成醌类,具有抗氧化作用^[12], β -巯基乙醇的巯基能与酚类物质竞争氧,有效避免酚类物质氧化成醌类^[13];再次,在DNA纯化过程中,通过加入RNase,并2次利用酚:氯仿=1:1进行

抽提,可有效去除DNA中的RNA和蛋白质杂质。总之,该方法是一种适合葡萄基因组DNA提取的高效方法,提取的DNA能满足进一步分子操作的要求。

参考文献

- [1] 田东,冯建英,陈旭,等.世界葡萄产业生产及贸易形势分析[J].世界农业,2010(6):46-50.
- [2] 张剑侠,王勇,王跃进,等.利用分子标记对无核抗病葡萄杂交后代的辅助选[J].东北农业大学学报,2010,41(6):55-63.
- [3] 王姣,刘崇怀,樊秀彩,等.葡萄种类和品种鉴定技术研究进展[J].植物遗传资源学报,2008,9(3):401-405.
- [4] 杨亚州,王跃进,张剑侠,等.中国葡萄属野生种抗旱基因的分子标记及遗传分析[J].园艺学报,2007,34(5):1087-1092.
- [5] Muhammad, Ye G N, Norman, et al. A Simple and Efficient Method for DNA Extraction from Grapevine Cultivars and Vitis Species[J]. Plant Molecular Biology Reporter, 1994, 12(1): 6-13.
- [6] 王晶晶,吴森林,张付春,等.葡萄基因组DNA的提取及RAPD反应体系的优化[J].新疆农业科学,2010,47(6):1066-1070.
- [7] 田淑芬,李树海,高杨.玫瑰香葡萄不同时期叶片提取DNA纯度的比较[J].天津农业科学,2003,9(2):5-7.
- [8] 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.
- [9] 张今今,王跃进,王西平,等.葡萄总RNA提取方法的研究[J].果树学报,2003,20(3):178-181.
- [11] 冯丽贞,陈友吾,郭文硕.植物次生物质与锥栗对栗疫病抗性之间的关系[J].福建林学院学报,1999,19(1):81-83.
- [12] 萨姆布鲁克J,拉塞尔D W.分子克隆实验指南[M].3版.黄培堂,译.北京:科学出版社,2002.
- [13] 薛应龙.植物生理学实验手册[M].上海:上海科学技术出版社,1985.
- [14] 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.

A High-quality Extraction Method for Genomic DNA of Grapevine

XU Mei-long¹, ZHANG Yu², NI Xi-lu³

(1. The National Center of Research and Engineering Technology of Economic Forest Tree Speedy Propagation, Yinchuan, Ningxia 750004; 2. Center for Grapevine Biotechnology, William H. Darr School of Agriculture, Missouri State University, Mountain Grove, MO 65711; 3. The State Key Laboratory of the Seedling Bioengineering, Yinchuan, Ningxia 750004)

Abstract: Extracting high-quality DNA from grapevine tissues were particularly difficult due to high levels of polyphenolics and polysaccharides, commercial total DNA extraction kit and a improved CTAB method were applied to isolate DNA. The results showed that the improved CTAB method isolate high purity and integrity DNA from different varieties and different growing stages of the leaves. The ratio of $OD_{260}/OD_{280} = 1.7 \sim 1.9$. Non-degradation phenomenon took place, and RNA removed clearly. The DNA was suitable for PCR and enzyme digestion.

Key words: grapevine; isolating DNA; PCR; enzyme digestion