

连晓东,谭 彬,郑先波,等. 适于 SSR 分析的不同生长型桃幼叶基因组 DNA 提取方法[J]. 江苏农业科学,2013,41(5):30-32.

# 适于 SSR 分析的不同生长型桃幼叶基因组 DNA 提取方法

连晓东,谭 彬,郑先波,叶 霞,冯建灿

(河南农业大学园艺学院,河南郑州 450002)

**摘要:**以 6 种不同生长型桃幼叶为材料,为适应 SSR 分析要求,对常规 CTAB 法、改进 CTAB 法、常规 SDS 法以及 SDS-CTAB 结合法 4 种基因组 DNA 提取方法的效果进行了比较研究。结果表明:常规 CTAB 法所提取的 DNA 呈黏稠状的浅褐色沉淀,难以溶解;常规 SDS 法和 SDS-CTAB 结合法提取的桃基因组 DNA 浓度较低,在品种间差异较大;而改进 CTAB 法提取 DNA 完整性较好, $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$  值介于 1.8~2.0, RNA 去除干净,其 SSR 分析(引物 CPPCT26)条带清晰,多态性好,表明此方法提取的不同生长型桃幼叶基因组 DNA 完全适于 SSR 分析。

**关键词:**桃;生长型;幼嫩叶片;DNA 提取;改进 CTAB 法

**中图分类号:** Q781 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)05-0030-03

桃原产于中国,我国不仅是桃的种内多样性中心,而且也是整个桃属植物的多样性中心。桃树生长型资源丰富,据相关报道,主要有开张型(普通型)、矮化型、紧凑型、垂枝型、柱型和直立型 6 种类型<sup>[1]</sup>。近年来,果树矮化密植栽培因结果早、品质好、管理方便、品种更新快等优点,已成为果树种植业发展的趋势。因此,开展桃树生长型研究,培育短枝型品种和矮化砧木已成为桃育种的主要目标之一<sup>[2]</sup>。目前,我国桃研究主要集中在对不同生长习性桃树特征分析及遗传研究上,相关基因的标记、定位也已开始<sup>[3]</sup>,但由于资源匮乏,研究进展相对缓慢,还不能满足生产的需要。

简单序列重复(simple sequence repeats, SSR)标记以其多态性高、重复性高、数量丰富、共显性和对基因组有很好的覆盖性等特点<sup>[4]</sup>,目前已在桃种质资源遗传多样性评价、遗传连锁图谱构建、功能基因定位及分子辅助育种等方面发挥重要作用<sup>[5-7]</sup>。进行分子研究的关键步骤之一就是制备高质量的基因组 DNA。笔者在相关研究<sup>[8-11]</sup>的基础上,进行了适用于 SSR 分析的不同生长型桃幼叶 DNA 不同提取方法的研究,

成功获得了高质量的桃基因组 DNA 和清晰的 SSR 谱带,为 SSR 技术有效地用于桃种质资源的研究奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

以中国农业科学院郑州果树研究所桃国家种质资源圃中不同生长型的 6 个桃品种为试验材料(表 1),取生长季节新梢刚展开的幼叶,放入液氮中带回实验室,置于 -70℃ 的超低温冰箱中保存备用。试验所用试剂 CTAB、SDS、PVP、 $\beta$ -巯基乙醇、EDTA、Tris-HCl、氯仿、异戊醇、 $\text{MgCl}_2$ 、dNTP、*Taq* 聚合酶等均购于上海生物工程公司。

表 1 供试材料

编号	生长型	品种
1	矮化型	粉寿星
2	柱型	帚形山桃
3	直立型	红花山桃
4	紧凑型	紫罗曼
5	开张型	大久保
6	垂枝型	红垂枝

### 1.2 方法

#### 1.2.1 基因组 DNA 的提取

1.2.1.1 常规 CTAB 法 取适量桃幼叶叶片,去中脉,加液氮迅速研磨后称取 0.15 g 左右,转移至含有 600  $\mu\text{L}$  常规

及其与产仔数的关联分析[J]. 云南农业大学学报,2009,24(3): 389-393,424.

[10] Linville R C, Pomp D, Johnson R K, et al. Candidate gene analysis for loci affecting litter size and ovulation rate in swine[J]. J Anim Sci, 2001, 79(1): 60-67.

[11] Santana B A A, Biase F H, Antunes R C, et al. Association of the estrogen receptor gene *Pvu* II restriction polymorphism with expected progeny differences for reproductive and performance traits in swine herds in Brazil[J]. Genet Mol Biol, 2006, 29(2): 273-277.

收稿日期:2013-03-05

基金项目:国家自然科学基金青年基金(编号:31201590)。

作者简介:连晓东(1987—),男,河南郑县人,硕士研究生,研究方向为桃生物技术与遗传育种。E-mail: lxd487978@163.com。

通信作者:冯建灿,博士,教授,研究方向为果树和经济林栽培及良种选育。E-mail: jcfeng@henau.edu.cn。

[6] 魏丕芳,刘娟娟,曾勇庆,等. 八个猪种 *ESR* 和 *FSHB* 基因的遗传变异及其产仔性能关系的研究[J]. 山东农业大学学报:自然科学版,2008,39(1):44-48.

[7] 刘娟娟,曾勇庆,魏述东,等. 8 个猪种 *ESR* 和 *FSHB* 基因合并基因型与繁殖性状关系的研究[J]. 畜牧兽医学报,2009,40(3): 291-295.

[8] 陈克飞,黄路生,李 宁,等. 猪雌激素受体(*ESR*)基因对产仔数性状的影响[J]. 遗传学报,2000,27(10):853-857.

[9] 鲁绍雄,胡晓湘,连林生,等. 撒坝猪 *ESR* 和 *FSH- $\beta$*  基因多态性

CTAB 裂解液[ 100 mmol/L Tris - HCl ( pH 值 8.0 )、20 mmol/L EDTA ( pH 值 8.0 )、1.4 mol/L NaCl、20 g/L CTAB、20 g/L PVP、2%β - 巯基乙醇 ( 体积比 PVP - 巯基乙醇 ) ]的 1.5 mL 离心管中,65 ℃水浴 1 h,期间颠倒混匀 3 次;水浴后,加入等体积的氯仿 - 异戊醇(24 : 1,体积比),轻轻摇匀(5 ~ 10 min),10 000 r/min 常温离心 15 min;吸取上清液于另一离心管中,再加入等体积的氯仿 - 异戊醇(24 : 1,体积比),轻轻摇匀(5 ~ 10 min),10 000 r/min 常温离心 15 min;吸取上清液于另一离心管中,加入 1/2 体积 5 mol/L NaCl,混匀后加入 2 倍体积 - 20 ℃预冷的无水乙醇,颠倒混匀, - 20 ℃静置 30 min;10 000 r/min 常温离心 15 min,弃去上清液;用 75% 乙醇冲洗沉淀 2 ~ 3 次;室温风干 2 h 左右,加入 1 μL RNase 和 30 μL 灭菌双蒸水,10 000 r/min 常温离心 15 min 后 37 ℃温浴 1 h, - 20 ℃保存备用。

1.2.1.2 改进 CTAB 法 改进 CTAB 法粗提步骤与常规 CTAB 法相同,待沉淀加入 1 μL RNase 和 30 μL 灭菌双蒸水 37 ℃温浴 1 h 后,加入灭菌双蒸水至 300 μL,再加入等体积的酚 - 氯仿 - 异戊醇(25 : 24 : 1,体积比),轻轻混匀,1 0000 r/min 常温离心 15 min;取上清液于另一离心管中,加入 1/10 体积 3 mol/L NaAc ( pH 值 5.2 )溶液,混匀后加入 2 倍体积 - 20 ℃预冷的无水乙醇,颠倒混匀, - 20 ℃静置 30 min;10 000 r/min 常温离心 15 min,弃上清液;用 75% 乙醇冲洗沉淀 2 ~ 3 次,室温风干 2 h 左右,溶于 30 μL 灭菌双蒸水中, - 20℃保存备用。

1.2.1.3 常规 SDS 法 取适量桃幼叶叶片,去中脉,加液氮迅速研磨后称取 0.15 g 左右,转移至含有 600 μL 常规 SDS 裂解液[ 100 mmol/L Tris - HCl ( pH 值 8.0 )、20 mmol/L EDTA ( pH 值 8.0 )、1.4 mol/L NaCl、15 g/L SDS、2%β - 巯基乙醇 ( V/V )、20 g/L PVP ]的 1.5 mL 离心管中,其余操作步骤同改进 CTAB 法。

1.2.1.4 SDS - CTAB 结合法 取适量桃幼叶叶片,去中脉,加液氮迅速研磨后称取 0.15 g 左右,转移至含有 600 μL 常规 SDS 裂解液的 1.5 mL 离心管中,65 ℃水浴 1 h 后,加 1/10 体积的 65 ℃预热的 CTAB - NaCl ( 0.7 mol/L NaCl、100 g/L CTAB )溶液,颠倒混匀后,其余操作步骤同改进 CTAB 法。

1.2.2 DNA 的检测

1.2.2.1 DNA 的纯度和浓度检测 将 4 种方法提取的 DNA 样品按一定倍数稀释后,测定其在 260 nm 和 280 nm 处的紫外吸收值 *D*,用  $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$  的比值表示 DNA 样品的纯度,若  $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$  值介于 1.8 ~ 2.0 之间,则表示 DNA 纯度较好。根据稀释倍数按照 1 个  $D_{260\text{ nm}}$  值相当于 50 ng 来计算 DNA 的浓度;DNA 的浓度 ( ng/μL ) =  $D_{260\text{ nm}} \times 50 \times$  稀释倍数。

1.2.2.2 DNA 的电泳检测 分别取 6 μL DNA 提取原液,在 1% 琼脂糖凝胶[ 含 0.5 μg/mL 的 EB ( 溴化乙锭 ) ]中电泳,电泳缓冲液为 0.5 × TBE,电压 80 V,电泳约 1 h 后,在紫外凝胶成像系统下检测其完整性及 RNA 消化情况,并拍照。

1.2.3 SSR 分析 引物序列引自世界蔷薇网 ( <http://www.bioinfo.wsu.edu/gdr> ),由上海生物工程公司合成,序列为 CPPCT26 ( F: AGACGCAOCACCCAACTAC; R: CATTACAT-CACCGCCAACAA ) 和 P09 ( F: TTCTAATCTGGGCTATGGCG; R: GAAGTTCACATTACGACAGGG )。PCR 扩增体系、PAGE

电泳及检测参考熊明国提供的方法<sup>[12]</sup>。

2 结果与分析

2.1 不同提取方法对桃幼叶 DNA 纯度和产率的影响

4 种方法均能提取出 6 种生长型桃幼叶基因组 DNA,但纯度和产率有较明显的差异 ( 表 2 )。常规 CTAB 法提取的 DNA 浓度明显高于其他 3 种方法,6 个品种平均达 5 225 ng/μL,但由于  $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$  值低于 1.8,且常规 CTAB 法所提取的 DNA 呈黏稠状的浅褐色沉淀,难以溶解。其他 3 种方法所提取的 DNA 浓度均明显低于常规 CTAB 法,分析是由于常规 CTAB 法只用氯仿 - 异戊醇(24 : 1,体积比)抽提 2 次,其他 3 种方法用氯仿 - 异戊醇(24 : 1,体积比)抽提 2 次后用酚 - 氯仿 - 异戊醇(25 : 24 : 1,体积比)再抽提 1 次,导致 DNA 产率下降所致。其中改进 CTAB 法所提取 DNA 浓度均高于常规 SDS 法和 SDS - CTAB 结合法,6 个品种平均达 3 312 ng/μL,提取的 DNA 的  $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$  值为 1.859 ( 介于 1.8 ~ 2.0 之间 ),纯度明显高于其他 3 种方法。

表 2 不同方法提取桃幼叶基因组 DNA 紫外分析结果

方法	桃品种	<i>D</i> <sub>260 nm</sub>	<i>D</i> <sub>280 nm</sub>	<i>D</i> <sub>260 nm</sub> / <i>D</i> <sub>280 nm</sub>	DNA 浓度 ( ng/μL )
常规 CTAB 法	红寿星	0.181	0.108	1.675	5 430
	帚形山桃	0.166	0.092	1.805	4 980
	红花山桃	0.155	0.085	1.824	4 650
	紫罗曼	0.153	0.0870	1.759	4 590
	大久保	0.208	0.112	1.857	6 240
	红垂枝	0.182	0.100	1.820	5 460
	平均			1.787	5 225
常规 SDS 法	红寿星	0.064	0.037	1.730	1 920
	帚形山桃	0.108	0.061	1.770	3 250
	红花山桃	0.061	0.036	1.694	1 830
	紫罗曼	0.063	0.036	1.750	1 890
	大久保	0.096	0.056	1.714	2 880
	红垂枝	0.110	0.067	1.642	3 300
	平均			1.717	2 510
改进 CTAB 法	红寿星	0.136	0.072	1.889	4 080
	帚形山桃	0.108	0.059	1.830	3 250
	红花山桃	0.037	0.020	1.850	1 110
	紫罗曼	0.135	0.075	1.800	4 050
	大久保	0.129	0.066	1.955	3 870
	红垂枝	0.117	0.064	1.828	3 510
	平均			1.859	3 312
SDS - CTAB 结 合法	红寿星	0.160	0.089	1.798	4 800
	帚形山桃	0.078	0.041	1.902	2 340
	红花山桃	0.042	0.024	1.750	1 260
	紫罗曼	0.049	0.029	1.690	1 470
	大久保	0.092	0.061	1.508	2 760
	红垂枝	0.075	0.037	2.027	2 250
	平均			1.780	2 480

2.2 不同方法提取的 DNA 电泳检测

从 DNA 提取样品琼脂糖凝胶电泳分析图谱 ( 图 1 ) 可以看出,4 种方法均能提取出较完整的桃幼叶基因组 DNA;但是不同提取方法所提取的 DNA 电泳谱带亮度不同,其中常规 CTAB 法提取的 DNA 电泳谱带最亮,与其他 3 种方法相比,

改进 CTAB 法所提取的 DNA 主带清晰,拖尾现象不明显。因此,结合 DNA 紫外检测和电泳检测的结果,从 DNA 纯度和产率两方面综合考虑,改进 CTAB 法是桃幼叶基因组 DNA 提取较适宜方法。

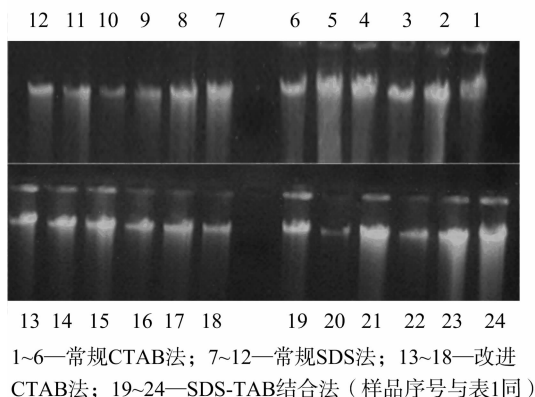


图1 4种方法提取的桃幼叶基因组DNA电泳图谱

### 2.3 SSR 分析

为了验证改进 CTAB 法提取的 DNA 样品用于 SSR 反应的适用性,用 2 对 SSR 引物(CPPCT26 和 P09)对不同生长型桃的 6 个样品进行 SSR 试验(图 2),SSR 分析结果表明,在不同材料间和不同引物组合下都能得到稳定、清晰、分辨率高的条带,其中引物 CPPCT26 在不同材料间表现多态性。表明改进 CTAB 法提取的桃基因组 DNA 质量好、纯度高,适于 SSR 分析。

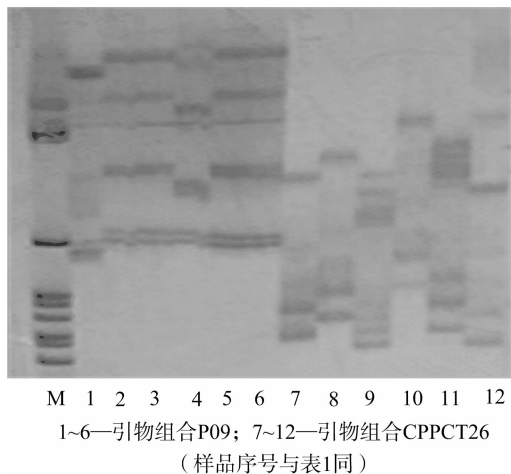


图2 不同生长型桃SSR分析PAGE电泳图谱

### 3 结论与讨论

采用 4 种不同方法提取不同生长型桃幼叶基因组 DNA,结果表明,4 种方法中改进 CTAB 法提取 DNA 完整性较好,纯度高,其 SSR 分析条带清晰,多态性好,说明此方法是一种有效提取不同生长型桃幼叶高质量基因组 DNA 的方法,提取的不同生长型桃幼叶基因组 DNA 完全适于 SSR 分析。

桃叶片中含有大量的多糖、蛋白质、多酚和色素等次生代谢物,叶片越老次生代谢物质含量就越高,给 DNA 的提取带来一定难度<sup>[12]</sup>。其中多糖类物质易与 DNA 形成黏稠的胶状

物,给 DNA 的分离和纯化带来困难,多酚类物质极易被氧化褐变,选择适宜的 DNA 提取方法尤为重要。前人研究表明,NaCl 有助于多糖类物质的溶解<sup>[13]</sup>;PVP 可络合多酚物质以防止其氧化使 DNA 褐化<sup>[14]</sup>;苯酚是强烈的蛋白质变性剂,能有效使蛋白质变性而除去<sup>[15]</sup>。我们将本试验提取缓冲液中 NaCl 浓度提高到 1.4 mol/L 以有效去除多糖;同时加入 20 g/L PVP 络合多酚物质以防止其氧化导致 DNA 褐化。此外,除常规 CTAB 法外,其他 3 种方法均增加 1 次酚-氯仿-异戊醇混合液抽提,目的是有效去除叶片中残留的蛋白质。

改进 CTAB 法是一种有效提取高质量桃幼叶基因组 DNA 的方法,笔者用该方法已提取 50 余份桃基因组 DNA,利用已收集和开发的桃 EST-SSR 引物进行分析,为进行桃种质资源系统进化和亲缘关系演化奠定基础。

### 参考文献:

- [1]牛 良,王志强,刘淑娥,等. 桃树不同生长型及其研究进展[J]. 果树学报,2004,21(4):354-359.
- [2]李 靖,王 政,方 庆,等. 桃豫农矮化砧木 1 号的矮化机制[J]. 果树学报,2007,24(5):589-594.
- [3]Scorza R, Mdlinceenco L, Albert G. Testing a microsatellite marker for selection of columnar habit peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] [J]. Acta Hort,2002(592):285-289.
- [4]Varshney R K, Graner A, Sorrells ME. Genic microsatellite markers in plants: features and applications [J]. Trends in Biotechnology, 2005, 23(1):48-55.
- [5]俞明亮,马瑞娟,许建兰,等. 桃种间亲缘关系的 SSR 鉴定[J]. 果树学报,2004,21(2):106-112.
- [6]Ogundiwin E A, Peace C P, Gradziel T M, et al. A fruit quality gene map of *Prunus* [J]. BMC Genomics, 2009, 10:587-599.
- [7]Zhebentyayeva T N, Jiwan D, Jun J H, et al. Exploitation of structural and functional genomics databases for gene identification in peach [J]. Acta Hort,2007(738):711-717.
- [8]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.
- [9]韩世明,王志强,牛 良,等. 半矮生桃基因组 DNA 的提取及 SSR-PCR 反应体系的优化[J]. 江苏农业科学,2010(1):34-36.
- [10]王富荣,赵剑波,章 镇,等. 适于 AFLP 分析的桃成熟叶片 DNA 提取方法[J]. 果树学报,2006,23(4):638-641.
- [11]李 静,李荣钦,王 朝,等. 光核桃叶片 DNA 提取条件的优化[J]. 经济林研究,2012,30(3):80-83.
- [12]熊明国. 桃豫农矮砧 1 号离体快繁体系的研究和 SSR-PCR 反应体系的优化[D]. 郑州:河南农业大学,2011:19-20.
- [13]Fang G, Hammar S, Grumet R. A quick and inexpensive method for removing polysaccharides from plant genomic DNA [J]. Biofeedback, 1992, 13(1):52-56.
- [14]罗志勇,周 钢,陈 汀,等. 高质量植物基因组 DNA 技术的研究[J]. 湖南医科大学学报,2001,26(2):178-180.
- [15]Cheng Y J, Guo W W, Yi H L, et al. An efficient protocol for genomic DNA extraction from *Citrus* species [J]. Plant Mol Biol Rep, 2003, 21:177a-177g.