

刘钰娇,杨金凤,赵璐,等. 苹果树木质部及韧皮部组织基因组 DNA 的提取及质量检测[J]. 江苏农业科学,2015,43(4):36-38.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.04.011

苹果树木质部及韧皮部组织基因组 DNA 的提取及质量检测

刘钰娇,杨金凤,赵璐,王亚南,胡同乐,王树桐,曹克强

(河北农业大学植物保护学院,河北保定 071000)

摘要:苹果树木质部及韧皮部中含有大量的酚类、多糖等次生代谢物质,严重影响基因组 DNA 提取的得率和纯度。采用 3 种不同方法,即改良的 CTAB 法、快速盐提法、试剂盒法,从苹果树木质部及韧皮部提取基因组 DNA,并通过琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度法检测所提取基因组 DNA 的质量。结果表明,改良的 CTAB 法提取的组织基因组 DNA 不论是浓度、质量还是随机引物 PCR 扩增效果均能够满足进一步分子试验需要,而改进的快速盐提法和试剂盒法提取得率太低,不能用于分子生物学研究。因此改良的 CTAB 法是适合苹果树木质部及韧皮部组织基因组 DNA 提取的最佳方法。

关键词:苹果;韧皮部;木质部;基因组 DNA;提取

中图分类号: S436.611 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)04-0036-03

苹果属于蔷薇科(Rosacea)仁果亚科(Pomoidea)苹果属(*Malus* Mill.)植物,在我国有悠久的栽培历史。最新的统计数据显示,2012 年,我国苹果栽培面积达到 206 万 hm^2 ,产量 3 700 万 t,我国已经成为世界上最大的苹果生产国^[1]。我国苹果上的枝干病害如苹果树腐烂病、轮纹病等严重影响苹果树的生长及产量,从分子水平研究枝干病害对病害的正确诊断、病菌的分布以及有效防治策略的制定有十分重要的意义。植物 DNA 的提取方法在很多文献中都有大量报道^[2-5],而苹果树木质部及韧皮部中含有大量的酚类、多糖等次生代谢物质,严重影响基因组 DNA 提取的得率和纯度。本试验对改良的 CTAB 法、快速盐提法、试剂盒法这 3 种提取总 DNA 的方法进行比较分析,试图确立适于苹果树木质部及韧皮部基因组 DNA 提取的最佳方法,以便于进行枝干病害的分子生物学研究。

1 材料与方法

1.1 试验材料

苹果木质部及韧皮部材料采自河北农业大学植物病害流行与综合防治试验园,分别取富士苹果树的主干、1 年生枝条、2 年生枝条和 3 年生枝条的木质部及韧皮部,放入保鲜袋中并尽快带回实验室,放于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱中保存,备用。

1.2 方法

1.2.1 改良的 CTAB 法^[6] 将样品加入适量的石英砂,加液氮研磨,取适量植物组织粉状装入 2 mL 无菌的离心管中备用。向离心管中加入 $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预热的 2% CTAB 抽提缓冲液

[1.4 mol/L NaCl,1 mol/L Tris-HCl(pH 值 8.0),20 mmol/L EDTA,2% CTAB,2% PVPP,2% β -巯基乙醇]650 μL ,涡旋混匀, $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴 1 h,每隔 10 min 轻轻颠倒离心管 1 次,使研磨后的粉末和抽提缓冲液充分混匀。向离心管中加入 650 μL 的酚-氯仿-异戊醇(体积比 25:24:1),涡旋混匀,并于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 15 min。将上清液转移至一个新的离心管中,向其中加入等体积的氯仿混均匀,于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 10 min。吸取上清液转移至另一新的离心管中,向其中加入 60 μL 的 3 mol/L NaAc,和 200 μL 异丙醇,混合均匀, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 放置 1 h,12 000 r/min 离心 10 min,倒出上清液。用 300 μL 冷冻保存 70% 乙醇清洗沉淀 2 次,无水乙醇冲洗 1 次,最后于室温条件下干燥,向离心管中加入 100 μL TE(pH 值 8.0), $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 放置过夜待 DNA 完全溶解,于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.2.2 改进的快速盐提法^[7] 在样品中加入适量的石英砂,加液氮研磨,取适量粉状植物组织装入 2 mL 无菌的离心管中备用。每管加入提取缓冲液(1.0 mol/L NaCl,100 mmol/L Tris-HCl,pH 值 8.0),50 mmol/L EDTA(pH 值 8.0)400 μL ,用塑料棒旋转碾碎后加 40 μL 20% SDS,振荡混匀 30 s。将样品放于 $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水中温育 2 h,向每管加入 300 μL 6 mol/L NaCl,振荡混匀 30 s。12 000 r/min 离心 10 min,将上清转入干净的离心管中,加入等体积预冷的异丙醇,轻柔混匀后 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱放置 1 h。12 000 r/min 离心 10 min,小心将上清液倒出,分别用 70% 乙醇和纯乙醇各洗 1 次后,晾干。将 DNA 样品溶解于 100 μL 灭菌的蒸馏水中, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存,备用。

1.2.3 试剂盒法 采用植物组织基因组 DNA 提取试剂盒(Easy Pure Plant Genomic DNA Kit,北京全式金生物公司)进行木质部和韧皮部组织基因组 DNA 的提取,严格按照试剂盒说明书上提供的方法进行操作,最后提取的基因组 DNA 于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存,备用。

1.3 DNA 的质量检测

1.3.1 DNA 浓度的测定和纯度检测 采用 K5500 超微量紫外分光光度计进行浓度测定及纯度检测。DNA 样品的浓度

收稿日期:2014-06-25

基金项目:公益性行业(农业)科技专项(编号:201203034、200903004);国家苹果现代产业技术体系项目(编号:CARS-28)。
作者简介:刘钰娇(1988—),女,河北无极人,硕士研究生,主要从事植物病害流行与综合防治研究。Tel:(0312)7520192;E-mail:liuyujiaolong@126.com。

通信作者:王亚南,女,博士,副教授,主要从事分子植物病理学研究。
Tel:(0312)7528157;E-mail:wyn3215347@163.com。

一般可根据其在 260 nm 的吸光度来确定,纯度检测通过 $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 来确定。

1.3.2 DNA 质量的琼脂糖凝胶电泳检测 分别取 5 μL DNA 样品和 1 μL 的 6 \times Loading buffer,混匀后经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测,检测使用 Marker 为宝生物工程(大连)有限公司的 DL2000 DNA Marker,电泳电压为 110 V,时间为 40 min。电泳结束后进行溴化乙锭(EB)染色,最后经 SYNGENE 凝胶成像仪观察照相。

1.3.3 随机引物 PCR 扩增 随机引物扩增反应使用 30 μL 反应体系(2 \times EsTaq MasterMix 15 μL ,引物 1 μL ,DNA 模板 1 μL ,ddH₂O 13 μL)。其中,随机引物为上海生工生物工程技术有限公司 2 000 多条引物中随机挑选的 1 条。扩增程序:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,35 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 90 s,共 40 个循环;最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

2 结果与分析

2.1 DNA 浓度的测定和纯度检测

由表 1 可以看出,改良的 CTAB 法提取 DNA 的浓度基本

能满足 PCR 要求,而改进的快速盐提法和试剂盒法提取效果很差,提取 DNA 得率太低或无法提出,因而无法进行后续分子生物学试验。从表 2 可以看出,改良的 CTAB 法提取 DNA 的 $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 为 2.06 ~ 2.29,这表明 DNA 受损程度不高且比较纯,蛋白质、酚类及多糖等杂质去除效果较好,但 $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 大于 1.9,表明可能有 RNA,要求严格的分子生物学试验可以加一步去除 RNA 的操作。改进的快速盐提法和试剂盒法提取 DNA 的 $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 均小于 1.6,甚至有的为负数,这表明蛋白质或酚类污染严重,或是未提出 DNA。综上,改良的 CTAB 法是适合苹果树木质部及韧皮部组织基因组 DNA 提取的最佳方法。

表 1 苹果树木质部及韧皮部组织提取 DNA 浓度检测

组织部位	提取的 DNA 浓度(ng/ μL)					
	改良的 CTAB 法		改进的快速盐提法		试剂盒法	
	木质部	韧皮部	木质部	韧皮部	木质部	韧皮部
主干	102.1	256.6	12.0	16.2	3.3	7.5
3 年生枝条	178.4	376.5	34.9	46.7	4.4	11.2
2 年生枝条	228.5	566.2	42.6	69.2	1.6	9.5
1 年生枝条	418.2	734.5	92.3	97.7	8.2	18.9

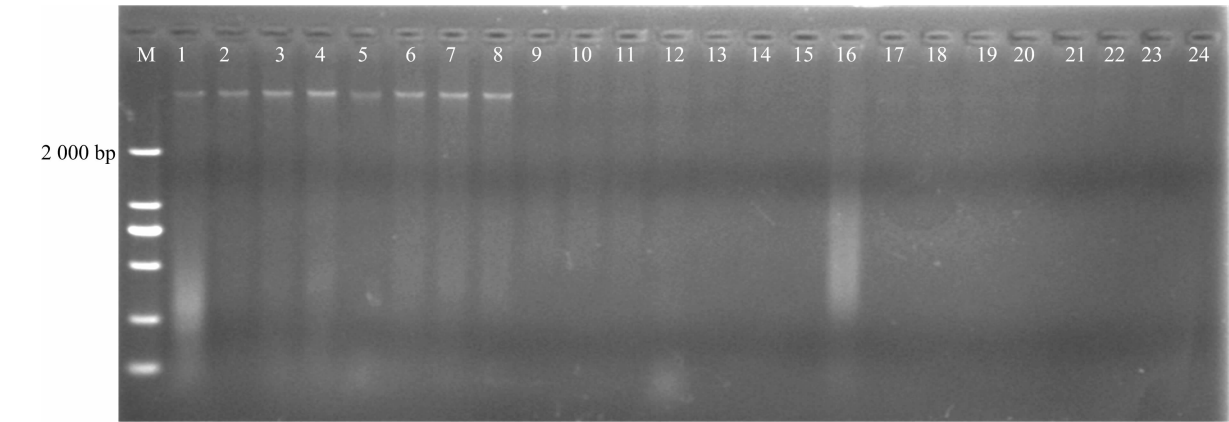
表 2 苹果树木质部及韧皮部组织提取 DNA 纯度检测

组织部位	$D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$					
	改良的 CTAB 法		改进的快速盐提法		试剂盒法	
	木质部	韧皮部	木质部	韧皮部	木质部	韧皮部
主干	2.29	2.23	1.6	1.0	0.8	0.97
3 年生枝条	2.11	2.06	0.5	0.5	1.2	-3.70
2 年生枝条	2.15	2.12	1.1	0.5	0.6	1.10
1 年生枝条	2.10	2.09	1.3	0.6	1.4	1.30

2.2 DNA 质量的琼脂糖凝胶电泳检测

从图 1 可以看出,用改良的 CTAB 法提取的组织基因组 DNA 可以看到均有大于 2 000 bp 的条带,但条带亮度均比 Marker 要暗,说明所提基因组 DNA 浓度均偏低,从条带亮度

也大致可以看出主干的木质部以及韧皮部的基因组 DNA 提取质量低于枝条组织;而改进的快速盐提法以及试剂盒法提取的基因组 DNA 均未有明显条带,有的泳道可以隐约看到条带,说明提取质量太差或未成功提取到。



M: DL2000DNA marker; 1~4泳道:改良的 CTAB 法提取的主干、3 年生枝条、2 年生枝条和 1 年生枝条的木质部基因组 DNA; 5~8泳道:改良的 CTAB 法提取的主干、3 年生枝条、2 年生枝条和 1 年生枝条的韧皮部基因组 DNA; 9~16泳道:改进的快速盐提法提取的组织基因组 DNA,依次与泳道 1~8 对应; 17~24泳道:试剂盒法提取的组织基因组 DNA,依次与泳道 1~8 对应

图1 不同方法苹果树木质部及韧皮部组织提取基因组 DNA 琼脂糖凝胶电泳结果

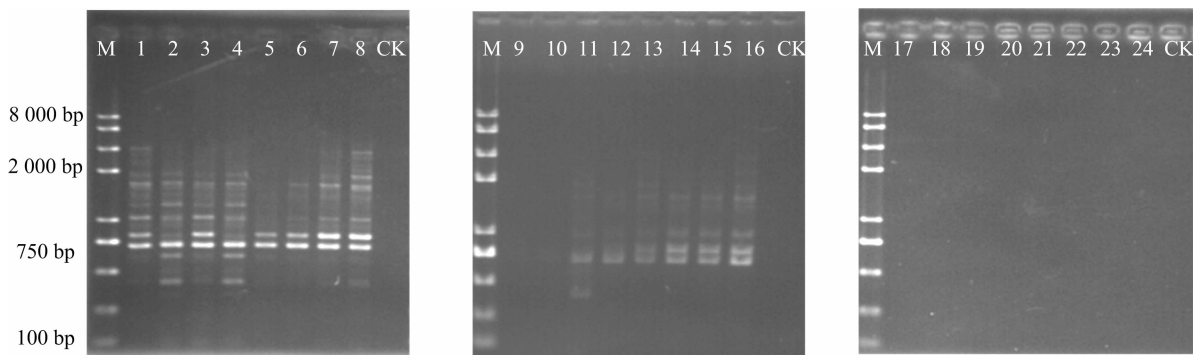
2.3 随机引物 PCR 扩增

从图 2 可以看出,用改良的 CTAB 法提取的苹果树木质

部及韧皮部组织基因组 DNA 进行随机引物的 PCR 反应获得了清晰稳定的条带,进行重复试验,均获得了较好的扩增,表

明该方法提取的基因组 DNA 适合进一步的分子分析。从图 3 可以看出,改进的快速盐法提取的组织基因组 DNA 进行随机引物的 PCR 反应,部分组织也获得了条带,但条带模糊且重复性不好,因而不太适合进一步的分子分析。从图 4 可

以看出,试剂盒法提取的组织基因组 DNA 进行的随机引物 PCR 反应均未获得任何条带,表明此方法可能未提取到 DNA。



M: 图1、图2、图3均为Trans2K Plus II DNA marker; 1~24泳道同图1, CK为水的阴性对照(没有DNA模板)

图2 改良的CTAB法提取基因组 DNA 的随机引物扩增图谱

图3 改进的快速盐法提取基因组 DNA 的随机引物扩增图谱

图4 试剂盒法提取基因组 DNA 的随机引物扩增图谱

3 讨论

高质量 DNA 要求尽量保持核酸分子完整性、高分子量,无明显降解现象;还要求纯度高,尽量去除酚类等严重干扰酶作用的杂质;此外要求获取效率高,能够达到试验要求的浓度^[8]。苹果树木质部及韧皮部中含有大量的酚类、多糖等次生代谢物质,严重影响基因组 DNA 提取的得率和纯度。CTAB 提取液中加入的 PVPP 具有酰胺键,可吸附多酚分子上的氢氧基从而形成氢键,可以吸附多酚,其中加入的 β -巯基乙醇是一种还原剂,可防止细胞内物质发生褐变,因此,本试验采用的改良的 CTAB 法获得了较好的提取效果,此外泳道下边无拖尾,无小片段产物,说明未有 RNA 污染,这可能是由于提取完 DNA 后未及时进行电泳检测,RNA 可能已经降解。改进的盐法中加入的 1.0 mol/L NaCl 在减少 DNA 降解的同时可以清除严重降解的 DNA^[9];EDTA 可以整合金属离子,酶不能与金属离子结合,否则就失去了活性,核酸酶类也是如此,所以 EDTA 可避免提取 DNA 时核酸酶类污染造成 DNA 的降解。但该方法依旧未获得高质量的 DNA,虽避免了使用酚/氯仿抽提,减少了酚/氯仿对试验人员的伤害,但提取效果不佳,不建议使用该方法进行苹果树木质部及韧皮部的基因组 DNA 提取。试剂盒法为公司开发的便捷型产品,对一般植物组织可能通用性较强,但是对于苹果树的木质部和韧皮部针对性太差,无法提取到高质量的基因组 DNA。

杨英军等采用 CTAB 法和 SDS 法从落叶果树韧皮部提取 DNA,认为 SDS 法总体上优于 CTAB 法^[10],但王富荣等^[11]以及王飞等^[12]分别采用 CTAB 法提取桃韧皮部 DNA 和果梅休眠枝韧皮部 DNA 均获得了良好的提取效果,这可能是由于不同的果树组织中的代谢产物有差别。本试验采用 3 种不同的提取方法进行比较,最终确定改良的 CTAB 法是较适合苹果树木质部及韧皮部组织基因组 DNA 提取的方法,但是该方法所采用的试剂如 β -巯基乙醇、酚/氯仿等均对人体有轻微伤

害,因此在提取 DNA 过程中,一定要注意佩戴口罩和手套,尽量减小对试验人员的伤害。

参考文献:

- [1] Faostat. The agricultural production indices[EB/OL]. [2014-06-08]. <http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/download/Q/QC/E>.
- [2] 卢扬江,郑康乐. 提取水稻 DNA 的一种简易方法[J]. 中国水稻科学,1992,6(1):47-48.
- [3] 汤文开,谭新,张辉,等. 一种快速简单高效提取植物 DNA 的方法[J]. 华中师范大学学报:自然科学版,2007,41(3):447-449.
- [4] 张磊,任贤. 枸杞基因组 DNA 的提取及 RAPD 反应体系的优化[J]. 安徽农业科学,2009,37(30):14611-14613,14634.
- [5] 邹喻苹,汪小全,雷一丁,等. 几种濒危植物及其近缘类群总 DNA 的提取与鉴定[J]. 植物学报,1994,36(7):528-533,578.
- [6] Zang R, Yin Z Y, Ke X W, et al. A nested PCR assay for detecting *Valsa mali* var. *mali* in different tissues of apple trees[J]. Plant Disease,2012,96(11):1645-1652.
- [7] Aljanabi S M, Martinez I. Universal and rapid salt-extraction of high alitygenomic DNA for PCR-based techniques[J]. Nucleic Acids Research,1997,25(22):4692-4693.
- [8] 李登科,黄丛林,田建保,等. 高质量枣树基因组 DNA 提取方法的研究[J]. 分子植物育种,2005,3(4):579-583.
- [9] 彭玉华,王晓琳. 以 PCR 为目的的大豆叶片 DNA 快速分离方法[J]. 中国油料,1996,18(4):34-36.
- [10] 杨英军,耿森,李爱江. 从落叶果树韧皮部提取 DNA[J]. 分子植物育种,2006,4(增刊2):142-146.
- [11] 王富荣,何华平,赵剑波,等. 适于 AFLP 分析用的桃韧皮部 DNA 提取方法[J]. 安徽农业科学,2011,39(16):9503-9504,9521.
- [12] 王飞,沈玉英,佟兆国,等. 一种果梅休眠枝韧皮部 DNA 提取方法[J]. 上海农业学报,2011,27(1):55-59.