

潘远健, 金 刚, 谢振华, 等. 一种快速提取微藻完整叶绿体及其 DNA 的方法[J]. 江苏农业科学, 2016, 44(2): 66–69.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.02.018

# 一种快速提取微藻完整叶绿体及其 DNA 的方法

潘远健<sup>1,3</sup>, 金 刚<sup>1</sup>, 谢振华<sup>2</sup>, 代建国<sup>1</sup>, 王 妍<sup>1</sup>, 栾崇林<sup>1</sup>, 于化泓<sup>3</sup>

(1. 深圳职业技术学院/深圳市大规模细胞培养技术和细胞资源库公共技术服务平台, 广东深圳 518055;

2. 清华大学深圳研究生院, 广东深圳 518055; 3. 南昌大学生命科学与食品工程学院, 江西南昌 330031)

**摘要:**利用高盐结合 SDS 裂解法, 对杜氏盐藻、湛江叉鞭金藻、球等鞭金藻叶绿体及其 DNA 进行分离和提取。经超声波匀浆后差速离心, 可获得比较完整的叶绿体, 再经有机试剂萃取, 可得到产率较高、纯度较好的叶绿体 DNA, 经 PCR 扩增得到清晰的条带。本试验方法快速简便, DNA 质量可以满足后续分子生物学操作需要。

**关键词:**微藻; 叶绿体; 叶绿体 DNA; 提取方法

**中图分类号:** Q244; S917 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)02-0066-03

叶绿体是绿色植物进行光合作用的细胞器。20 世纪初, 学者根据植物叶片的花斑现象具有母性遗传的特性, 推断在叶绿体上或许存在核外的遗传因子。20 世纪 60 年代初, 随着电镜技术与分子生物学技术的发展, 叶绿体基因组的存在由 Gupta 等证实<sup>[1]</sup>。目前, 叶绿体 DNA (cpDNA) 被广泛应用于细胞质遗传、植物系统发育、植物雄性不育、亲缘关系、叶绿体转基因等研究中。微藻作为水体生态系统重要的初级生产者及潜在的外源基因表达载体, 研究其叶绿体和 cpDNA 功能、结构特征, 对于叶绿体表达体系构建具有重要作用。因此, 快速、简便地获得质纯、量大 cpDNA 是许多工作的前提。目前, 获得微藻完整叶绿体和纯度高、浓度大的微藻 cpDNA 存在一定困难, 主要原因是微藻种类繁多, 每种微藻有其生物学特点, 缺乏通用方法; 叶绿体 DNA 含量较少, 在提取过程中存在诸多干扰因素 (核 DNA、RNA、蛋白质等)。

提取植物 cpDNA 的传统方法有 CsCl<sub>2</sub> 梯度离心及 DNase I 结合蔗糖梯度离心等, 这些方法操作较繁琐, 不易同时获得理想的产率、纯度。20 世纪 80 年代至今, 在非藻类植物叶绿体提取、微藻叶绿体分离技术等方面研究成果较多<sup>[2-9]</sup>。本研究在前人研究的基础上作了一些改进 (如离心时间和速度、藻体破碎方法、叶绿体破碎时间、DNA 分离时的离心速度和时间等), 提取杜氏盐藻 (*Dunaliella salina*)、湛江叉鞭金藻 (*Dicrateria Zhanjiangensis*)、球等鞭金藻 (*Isochrysis galbana*) 的完整叶绿体, 结果较为满意。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

杜氏盐藻、湛江叉鞭金藻、球等鞭金藻由笔者所在实验室

收稿日期: 2015-01-15

基金项目: 广东省深圳市科技项目 (编号: JC201005280534A、JCY20130331151022276); 广东省自然科学基金 (编号: 10151805501000007)。

作者简介: 潘远健 (1987—), 男, 广西梧州人, 硕士研究生, 从事基因调控研究。E-mail: wenrenzhiying@163.com。

通信作者: 金 刚, 博士, 教授, 主要从事水生生物学研究。E-mail: jingang@szpt.edu.cn。

培养。

### 1.2 试剂配制<sup>[7]</sup>

缓冲液 A: 400 mmol/L 蔗糖、50 mmol/L Tris-HCl (pH 值 8.0)、20 mmol/L EDTA-Na<sub>2</sub>、0.2% BSA、0.2% 巯基乙醇 (现用现加); 缓冲液 B: 400 mmol/L 蔗糖、50 mmol/L Tris-HCl (pH 值 8.0)、0.1% BSA; 缓冲液 C: 1.25 mol/L NaCl、50 mmol/L EDTA、50 mmol/L Tris-HCl (pH 值 8.0); 缓冲液 D: 100 mmol/L Tris-HCl (pH 值 7.8)、50 mmol/L EDTA、100 mmol/L NaCl、0.2% 巯基乙醇 (现用现加)。试验所用试剂蛋白酶 K、DNase I、DNA Maker 等购于宝生物工程 (大连) 有限公司。

### 1.3 分离叶绿体和提取 cpDNA<sup>[9]</sup>

把生长到对数期的微藻置于 0~4 ℃ 暗处理 24 h。将暗处理后的 500 mL 藻液分装到 50 mL 离心管中, 4 ℃ 下 5 500 r/min 离心 2 min 收集藻细胞 (沉淀), 弃上清。往以上所得沉淀加入 30 mL 缓冲液 A, 冰上破碎 1.5 min 得藻体破碎液。将藻体破碎液用 6 层滤网 (300 目) 过滤, 滤液倒入离心管中, 4 ℃ 1 000 r/min 离心 20 min, 收集上清。将上清液在 4 ℃ 4 000 r/min 离心 20 min, 弃上清, 将沉淀保存于 4 ℃ 冰箱备用。DNA 酶去核处理: 往上一步所得沉淀中加入 200 μL 缓冲液 B、2.5 μL DNase-I、40 μL 0.2 mol/L MgCl<sub>2</sub>, 37 ℃ 静置 15 min。加入 200 μL 0.4 mol/L EDTA-Na<sub>2</sub>, 再加入缓冲液 C, 4 ℃ 4 000 r/min 离心 20 min, 弃上清。在上一步所得沉淀中加入 600 μL 预冷的缓冲液 D, 30 μL 20% SDS (终浓度 1%), 2.5 μL 蛋白酶 K (始浓度为 1 mg/mL), 60 ℃ 水浴 2 h。冷却后加入等体积的酚: 氯仿: 异戊醇 (25: 24: 1) 混合液, 4 ℃ 10 000~12 000 r/min 离心 10 min, 取上清。上清液加入等体积的氯仿: 异戊醇 = 24: 1, 4 ℃ 10 000~12 000 r/min 离心 10 min, 取上清。上清加入 1/5 体积的 3 mol/L NaAc 及 2 倍体积预冷的无水乙醇, -80 ℃ 放置 1 h, 然后 4 ℃ 下 12 000 r/min 离心 10 min, 弃上清。加入预冷的 75% 乙醇, 10 000 r/min 离心 10 min 洗涤 1~2 次 (此步骤要特别小心, 重悬 DNA 时动作要轻缓。操作太剧烈会机械断裂 cpDNA)。倒立 EP 管, 自然晾干或置于超净台风干。加入 30~40 μL 1×TE, -20 ℃ 保存。

1.4 蔗糖密度梯度法分离球等边金藻、杜氏盐藻叶绿体 DNA

参考曲京东的蔗糖梯度离心法<sup>[9]</sup>分离球等边金藻、杜氏盐藻叶绿体 DNA,其中 2 个蔗糖梯度分别为 40%、60%。采用紫外分光光度法检测 cpDNA 的浓度、纯度。

1.5 叶绿体 *rps2* 基因、*rbcL* 基因片段的扩增

为了验证所提取的 cpDNA 质量,参照 NCBI 上收录的杜氏盐藻 *rps2* 基因、球等鞭金藻 *rbcL* 基因序列设置 2 对引物:  
rps1:5′ - AGCAAGACGAATACGAGT - 3′, rps2:5′ - TTTACGA-

CAATTATACCG - 3′; *rbcL*1:5′ - AAGCCTCTAATGCAACAC - 3′, *rbcL*2: 5′ - CCACAACTGAAACGAAA - 3′。分别以所提取的杜氏盐藻、球等鞭金藻的 cpDNA 为模板,进行 PCR 扩增。反应体系如表 1 所示。

同时设置 1 个阴性对照,验证提取的 cpDNA 有无基因组 DNA 污染。利用盐藻基因组 DNA 的特异引物对:前:5′ - TGAGCCTGTGCGTGTTC - 3′;后:5′ - GGTGCTTGCCTGACTG - 3′,并以所提取的 cpDNA、基因组 DNA 作为模板(表 2)。

表 1 *rps2*、*rbcL* 基因的 PCR 反应体系

<i>rps2</i> 基因		<i>rbcL</i> 基因	
反应体系	反应程序	反应体系	反应程序
28 μL ddH <sub>2</sub> O	98 ℃ 2 min 10 s	28 μL ddH <sub>2</sub> O	98 ℃ 2 min 10 s
10 μL 5 × PS Buffer	98 ℃ 20 s	10 μL 5 × PS Buffer	98 ℃ 20 s
4 μL dNTP	50 ℃ 15 s	4 μL dNTP	52 ℃ 15 s
2 μL cpDNA	72 ℃ 2 min 10 s	2 μL cpDNA	72 ℃ 1 min 30 s
2 μL rps1	35 个循环	2 μL rbcL1	35 个循环
2 μL rps2	72 ℃ 6 min	2 μL rbcL2	72 ℃ 10 min
0.5 μL Primer star 酶	12 ℃ forever	0.5 μL Primer star 酶	12 ℃ forever
理论产物长度 2 019 bp		理论产物长度 1 280 bp	

表 2 *PTOX1* 基因的 PCR 反应条件

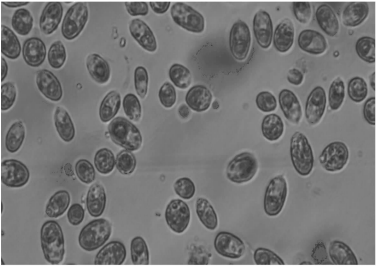
cpDNA 模板		基因组模板	
反应体系	反应程序	反应体系	反应程序
28 μL ddH <sub>2</sub> O	98 ℃ 2 min 10 s	28 μL ddH <sub>2</sub> O	98 ℃ 2 min 10 s
10 μL 5 × PS Buffer	98 ℃ 20 s	10 μL 5 × PS Buffer	98 ℃ 20 s
4 μL dNTP	54 ℃ 15 s	4 μL dNTP	54 ℃ 15 s
2 μL cpDNA	72 ℃ 1 min 30 s	2 μL cpDNA	72 ℃ 1 min 30 s
2 μL 前	35 个循环	2 μL 前	35 个循环
2 μL 后	72 ℃ 10 min	2 μL 后	72 ℃ 10 min
0.5 μL Primer star 酶	12 ℃ forever	0.5 μL Primer star 酶	12 ℃ forever
理论产物长度 1 496 bp		理论产物长度 1 496 bp	

2 结果与分析

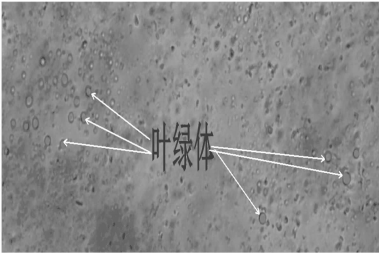
2.1 叶绿体显微观察

在叶绿体提取的不同阶段进行显微观察,以确定不同阶段叶绿体形态的变化。图 1 - a 是光学显微镜下完整的杜氏盐藻细胞,其形态呈梭形或球形,随其运动的改变而改变,细胞的一端几乎完全被叶绿体占据。图 1 - b 是经过超声波破

碎和差速离心后分离得到的杜氏盐藻完整叶绿体,在叶绿体周围可以看到光晕,说明所得叶绿体比较完整,外膜没有被破坏。图 1 - c 为蔗糖密度梯度离心所得叶绿体。图 2 - a 为湛江叉鞭金藻完整细胞,图 2 - b 是湛江叉鞭金藻完整的叶绿体。图 3 - a 为球等鞭金藻完整细胞,图 3 - b、图 3 - c 分别是球等鞭金藻完整叶绿体。



a. 油镜下完整的杜氏盐藻细胞(1 000×)



b. 差速离心分离所得的杜氏盐藻完整叶绿体(1 000×)



c. 蔗糖密度梯度分离所得的杜氏盐藻完整叶绿体(1 000×)

图1 杜氏盐藻及其完整的叶绿体

2.2 cpDNA 的电泳检测

将 2 种方法提取的 3 个不同海水藻提到的 cpDNA 进行

0.7% 琼脂糖凝胶电泳(110 V/mL,40 min,8 μL),得到整齐干净的条带,如图4所示。M为maker;1、3、4分别为差速离

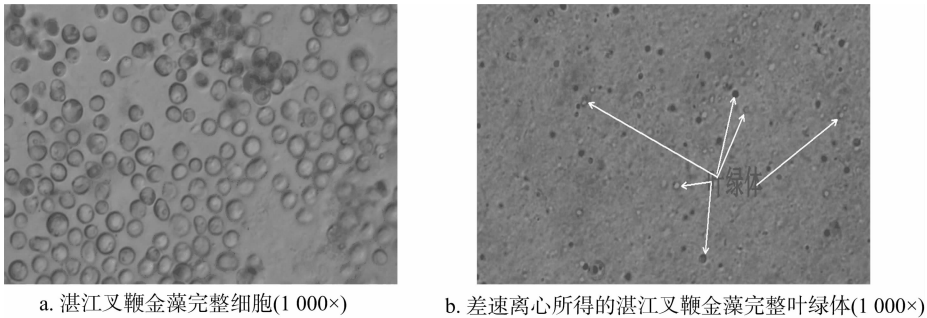


图2 湛江叉鞭金藻及其完整的叶绿体

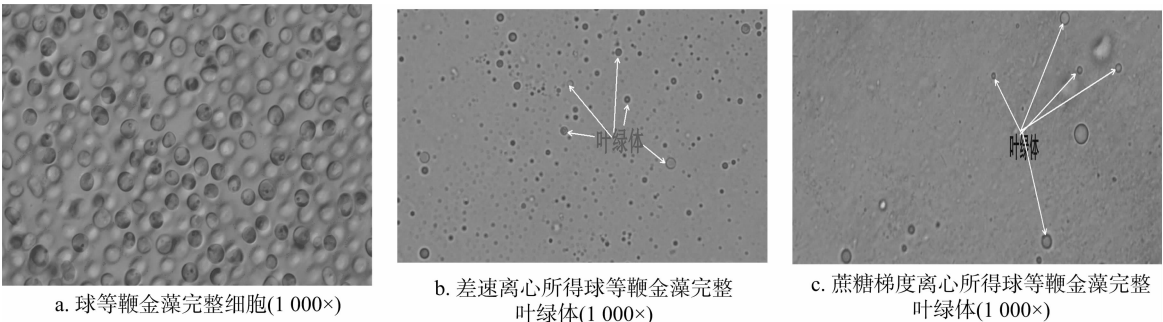


图3 球等鞭金藻及其完整的叶绿体

心所提取的杜氏盐藻 cpDNA、球等鞭金藻 cpDNA、湛江叉鞭金藻 cpDNA;2、5 分别为蔗糖梯度离心所得杜氏盐藻 cpDNA、球等鞭金藻 cpDNA。

2.3 分光光度计检测 cpDNA 的浓度和纯度

表 3 为快速分离法所得 cpDNA 纯度、浓度,表 4 为蔗糖密度梯度离心法所得 cpDNA 光密度结果。由表 3 可知,快速差速离心抽提到的 cpDNA 浓度约 2.80  $\mu\text{g/mL}$ , $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$

接近 1.8,说明其含量及纯度都较为理想,可用于后续分子操作。由表 4 可知,蔗糖密度梯度离心法提取的 cpDNA 浓度约 1.00  $\mu\text{g/mL}$ , $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$  约 1.6,这可能跟含有色素杂质等有关。

2.4 叶绿体 *rps2* 基因、*rbcL* 基因片段的扩增

*rps2*、*rbcL* 基因基因都在目的片段长度处显示出整齐干净的条带(图 5),第 3 泳道没有明显的条带,与预期结果一致。

表 3 快速分离法所得 cpDNA 的纯度、浓度

藻种	$D_{260\text{ nm}}$	$D_{280\text{ nm}}$	Bkg 320.0 nm	$D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$	稀释倍数	浓度 ( $\mu\text{g/mL}$ )
球等鞭金藻	0.058 9	0.033 8	0.184 2	1.742 6	1.000 0	2.772 3
湛江叉鞭金藻	0.056 6	0.031 8	0.195 8	1.780 1	1.000 0	2.831 4
杜氏盐藻	0.058 6	0.032 7	0.198 8	1.790 1	1.000 0	2.931 2

表 4 蔗糖密度梯度离心法所得 cpDNA 光密度结果

藻种	$D_{260\text{ nm}}$	$D_{280\text{ nm}}$	Bkg 320.0 nm	$D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$	稀释倍数	浓度 ( $\mu\text{g/mL}$ )
球等鞭金藻	0.669 8	0.648 2	0.149 8	1.503 3	1.000 0	0.967 8
杜氏盐藻	0.872 0	0.704 5	0.140 1	1.603 4	1.000 0	0.959 5

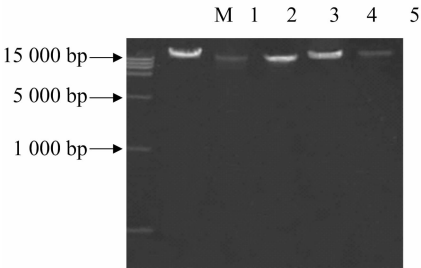
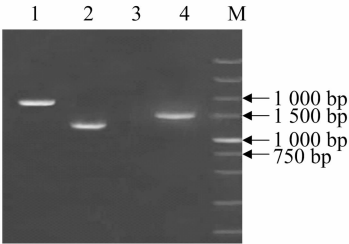


图4 3 种微藻 cpDNA 电泳图



1—*rps2*; 2—*rbcL*; 3、4—细胞核基因 *PTOX1*, 其中 3 为杜氏盐藻 cpDNA 作模板, 4 为杜氏盐藻总基因组作模板

图5 *rps2*、*rbcL* 基因片段扩增结果

翟立红,周兰庭,韩 鹏,等. 玉米穗行数基因的 QTL 定位与分析[J]. 江苏农业科学,2016,44(2):69-72.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.02.019

# 玉米穗行数基因的 QTL 定位与分析

翟立红<sup>1</sup>,周兰庭<sup>1</sup>,韩 鹏<sup>1</sup>,滕 峰<sup>1,2</sup>

(1. 湖北文理学院生物化学与分子生物学系,湖北襄阳 441053;2. 湖北腾龙种业有限公司,湖北利川 445400)

**摘要:**对玉米中控制穗行数的 QTL 进行定位和分析,为分子标记辅助选择育种提供理论基础。在一套以综 3 为遗传背景携带衡水 522 置换片段的染色体片段置换系群体进行 QTL 初步定位的基础上,以穗行数明显减少的置换系 SIL8 为材料,构建置换片段内的 F<sub>2</sub> 次级分离群体和跨叠系进行了穗行数基因的 QTL 定位。在 1.02 ~ 1.04 bin 区段存在控制玉米穗行数的 QTL,命名为 *qKRN1*。2 年的 QTL 定位及跨叠系分析结果将 *qKRN1* 锁定在分子标记 HND9 - umc1297 之间,遗传距离为 2.7cM,该穗行数 QTL 的鉴定,为进一步精细定位或克隆相应基因奠定了基础。

**关键词:**玉米;染色体片段置换系;穗行数;数量性状

**中图分类号:** S513.03 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)02-0069-04

玉米产量是玉米育种学家和遗传学家共同关注的性状,穗行数是一个重要的产量组成因子,与产量显著正相关,探明穗行数形成的遗传机理有助于玉米产量性状形成的遗传机理的阐述,为开展分子设计育种提供理论指导。玉米穗行数是一个数量性状,受到多基因的控制。随着分子标记技术的发展和玉米基因组测序结果的出现,在玉米全基因组内检测控

制产量相关 QTL 取得了一定进展。在 20 世纪 80—90 年代,Edwards 等就使用同工酶和 RFLP 标记开展玉米数量性状基因的研究<sup>[1-2]</sup>。随后 Veldboom 等报道了利用 RFLP 标记对玉米形态和产量性状进行 QTL 定位,鉴定了 23 个控制形态性状、35 个控制产量性状的 QTL,其中,在 1 S (bnl5.62, 1.02 bin)、2 S、4 S 和 4 L 上各鉴定了一个穗行数 QTL<sup>[3]</sup>。bnl5.62 附近的 QTL 也被 Austin 等所鉴定到,另外他们在其邻近的 umc157 附近还检测到一个穗行数 QTL<sup>[4]</sup>。杨俊品等以 4822 × 5003 的 166 个 F<sub>2,3</sub> 家系作为定位群体,共检测出 59 个分布于 10 个连锁群的 QTL,其中第 1、3 连锁群较多;在第一染色体的 bnlgl083(1.02 bin)、umc1035(1.06 bin)附近发现了 2 个穗行数 QTL<sup>[5]</sup>,这些 QTL 也与产量有关<sup>[6]</sup>。严建兵等分别利用综 3 × 87-1 的 F<sub>2,3</sub> 家系和 RIL 群体,发现 umc1122 ~ bnlgl558(1.06 bin) 为一个产量、行数和行粒数 QTL 簇, umc1169 ~ bnlgl1811(1.04 bin) 之间存在一个穗行数 QTL,

收稿日期:2015-09-07

基金项目:国家自然科学基金(编号:31501320);襄阳市研究与开发计划(编号:[2014]12-33);湖北文理学院博士科研启动基金(编号:31#);湖北省教育厅科学研究计划中青年人才项目(编号:Q20152601)。

作者简介:翟立红(1983—),女,河北邢台人,讲师,主要从事玉米遗传育种研究。E-mail:zlh\_0302@126.com。

通信作者:滕 峰,博士,助理研究员,主要从事玉米育种研究。E-mail:tobenumberone@yeah.net。

## 3 结论与讨论

开始分离叶绿体之前,把藻液在黑暗下低温静置 24 h,可以降低叶绿体中淀粉的含量,减少淀粉核对叶绿体膜的破坏性,有利于分离得到完整的叶绿体<sup>[9]</sup>。经差速离心以后分离到的叶绿体样品纯度虽然相对很高,但是仍有来自细胞核的污染。因此,本试验在保持叶绿体不破碎的前提下(低温下完整叶绿体比较稳定),在叶绿体样品中加入 DNase I 并于 37 ℃ 静置 15 min 以去除来自核 DNA 的潜在污染。在裂解叶绿体时先充分重悬,再加入 SDS,可提高叶绿体破碎效果,提高 cpDNA 得率。本研究结果表明,蔗糖梯度密度分离的叶绿体及其 cpDNA 浓度都比较低,此外,还存在着 2 个不同浓度的蔗糖缓冲液混合时间过长就会相溶在一起,提取的叶绿体层面比较窄,叶绿体得率低的弊端。*PTOX1* 基因在以 cpDNA 为模板时没有明显的条带,说明所得 DNA 纯度比较高。

## 参考文献:

[1] Gupta R, Golding G B. The origin of the eukaryotic cells[J]. Trends

in Biochemical Sciences, 1996, 21(5): 166-171.

[2] Bookjans G, Stumm B M, Henningsen. Preparation of chloroplast DNA from pea plastids isolated in a medium of high ionic strength [J]. Anal Biochem, 1984, 141: 244-247.

[3] 高 洁,孔繁瑞,李继耕. 油菜细胞质雄性不育系叶绿体 DNA 特异片段的分子克隆[J]. 遗传学报, 1987, 14(5): 337-343.

[4] 赵 衍,翁醒华,邹 勤,等. 水稻叶绿体基因文库的构建和精细限制图谱的制作[J]. 遗传学报, 1991, 18(2): 149-160.

[5] 龚小松,阎隆飞. 高等植物叶绿体 DNA 提纯方法的改进[J]. 科学通报, 1991, 36(6): 467-469.

[6] 崔彬彬,李 云,冯大领,等. 杨树叶绿体分离及叶绿体 DNA 提取方法的研究[J]. 保定师范专科学校学报, 2006, 19(2): 25-27.

[7] 袁进成,贾树利,刘颖慧. 一种快速提取谷子叶绿体 DNA 的方法[J]. 河北北方学院学报:自然科学版, 2008, 24(5): 22-24.

[8] Rowan B A, Bendich A J. Isolation, quantification, and analysis of chloroplast DNA[J]. Methods Mol Biol, 2011, 774: 151-170.

[9] 曲京东. 杜氏盐藻完整叶绿体的分离和叶绿体转化体系的构建[D]. 郑州:郑州大学, 2007.