

三倍体枇杷叶绿体 DNA 提取方法的优化^①

孙晓荣, 易鼎杰, 何桥, 梁国鲁

西南大学 园艺园林学院, 重庆 400716

摘要: 将三倍体枇杷叶片通过液氮研磨、差速离心与蔗糖密度梯度离心相结合的方法得到高纯度的叶绿体, 在光学显微镜和荧光显微镜下分别观察到椭圆形颗粒状和自发红色荧光的叶绿体. 提取的 cpDNA 经凝胶电泳检测, 完整性好, 纯度高, 无降解. 经紫外分光光度仪测定, 所得 cpDNA 浓度为 0.761 ng/ul.

关键词: 三倍体枇杷; 叶绿体; cpDNA

中图分类号: Q946-33

文献标志码: A

枇杷三倍体由于体细胞内染色体数目比二倍体增加一组, 座位在染色体上的优性基因也随之获得积加, 致使体细胞较二倍体枇杷体细胞大一倍以上, 这引起叶片的内部结构发生变化, 表现出叶形大, 叶片厚, 叶色浓绿, 叶绿体数目增多^[1]等. 其中叶绿体作为植物细胞器的重要组成部分和光合作用的器官, 在生物进化的漫长历史中发挥了重要作用^[2]. 叶绿体 DNA 种内的多态性对以叶绿体 DNA 为基础的系统发育关系的建立有影响^[3], 因此了解多倍体叶绿体 DNA 种内差异会得到可靠的系统演化关系.

枇杷叶片含有茸毛, 且较多的多酚、多糖等复杂的代谢物质^[4], 这些物质容易与 DNA 不可逆地粘附在一起而污染 DNA, 给叶绿体 DNA 的提取造成很大干扰. 本实验针对实验材料的特殊性, 对传统的叶绿体 DNA 提取方法进行了改良, 对枇杷叶绿体 DNA 的提取方法进行了优化, 以期提取高质量且完整的叶绿体 DNA, 为进一步进行 RAPD 研究奠定基础.

1 材料与方法

1.1 材料

三倍体枇杷新鲜叶片采自西南大学果树学重点实验室实验基地.

试剂为: (1)缓冲液 A(pH 3.6): 50 mmol/L Tris, 25 mmol/L EDTA- Na_2 , 1.25 mol/L NaCl, 0.25 mol/L 维生素 C; (2)缓冲液 B(pH 8.0): 50 mmol/L Tris, 25 mmol/L EDTA- Na_2 , 1.25 mol/L NaCl, 10 mmol/L 巯基乙醇, 0.1% BSA; (3)缓冲液 C(pH 8.0): 150 mmol/L NaCl, 100 mmol/L EDTA- Na ; (4)缓冲液 D(pH 8.0): 50 mmol/L Tris, 100 mmol/L EDTA- Na_2 .

1.2 方法

1.2.1 叶绿体的分离

取 50~100 g 三倍体枇杷鲜叶, 黑暗处理 24 h, 用清水洗去表面绒毛, 放入冰盒中; 去掉叶片主脉, 撕

① 收稿日期: 2011-06-17

基金项目: 重庆市教委“天然多倍体枇杷叶绿体基因组 DNA 的 RAPD 研究及差异片段的克隆”(KJ060312)项目基金资助.

作者简介: 孙晓荣(1985-), 女, 山西临汾人, 硕士研究生, 主要从事果树遗传育种与现代生物技术研究.

通信作者: 梁国鲁, 研究员, 博士生导师.

成 $1\sim 2\text{ cm}^2$ 大小放入液氮预冷的研钵中,快速研磨成粉末状;将研磨细的叶片粉末溶于 200 mL bufferA 中,用匀浆机进行匀浆 $5\sim 6$ 次,每次 10 s ;用 4 层纱布过滤,收集滤液(分装到 4 支 50 mL 离心管中), $4\text{ }^\circ\text{C}$ 下 $400\times g$ 离心 5 min ;吸取上清液,分别装于另一 50 mL 离心管中,尽量不要吸到杂质,于 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 下 $800\times g$ 离心 6 min ,弃掉上清液,收集沉淀.各管所得沉淀加 20 mL bufferB,毛笔悬浮,于 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 下 $800\times g$ 离心 6 min ,弃掉上清液,收集沉淀.沉淀用 bufferC 冲洗,毛笔悬浮,于 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 下 $800\times g$ 离心 6 min ,弃掉上清液,收集沉淀.沉淀再用 bufferD 冲洗,毛笔悬浮,得到叶绿体粗提液.吸取一滴粗提液在 40 倍光学显微镜下观察.

1.2.2 叶绿体的纯化

在 10 mL 离心管中依次缓慢加入 3 mL 52% 蔗糖溶液和 2.5 mL 30% 蔗糖溶液,再铺上 1.5 mL 叶绿体粗提液, $4\text{ }^\circ\text{C}$ 下 $2\,500\text{ r/min}$ 离心 45 min ,离心结果如图 1 所示,C 层为纯化的叶绿体;用 1 mL 枪头(前端剪一斜口)插入 C 层,吸取叶绿体,分别收集到两支 10 mL 离心管中.加 5 mL bufferD,毛笔悬浮,于 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 下 $800\times g$ 离心 6 min ,弃掉上清液,收集沉淀.取少许纯化后的沉淀在荧光显微镜下观察并拍照.

1.2.3 cpDNA 的提取与纯化

参照 T. Manitis, 岳强等的方法^[5-6],用 $50\text{ }\mu\text{g/mL}$ DNaseI 处理纯化的叶绿体沉淀, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 处理 1 h ,加入 EDTA 使其终浓度为 20 mmol/L ,用酚:氯仿 $5\,000\text{ r/min}$ 抽提 1 次,取上清液;加入 3% SDS 提取液悬浮,再加 $20\text{ }\mu\text{L}$ 蛋白酶 K(10 mg/mL)混匀,分装到 10 支 1.5 mL 离心管中,每管 $450\text{ }\mu\text{L}$, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 水浴 3 h ;此裂解液冰浴 15 s ,加 1 mL 5 mol/L KAC 冰浴 30 min ;加入等体积酚:氯仿:异戊醇($25:24:1$), $10\,000\text{ r/min}$ 离心 15 min ;小心吸取上清液于一新离心管中,加入等体积氯仿:异戊醇($24:1$), 1 mL CTAB/NaCl 抽提 1 次;上清液加入 $1/10\text{ V}$ 3 mol/L NaAC 和 $2/3\text{ V}$ 冷异戊醇, $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 过夜; $12\,000\times g$ 离心 30 min 收集沉淀, 70% 乙醇冲洗 2 次,晾干;加 $800\text{ }\mu\text{L}$ TE 缓冲液溶解沉淀,加入 $10\text{ }\mu\text{L}$ RNA 酶, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 孵育 1 h ;加入等体积氯仿:异戊醇($24:1$),抽提 2 次($12\,000\text{ rpm}$, 10 min),吸上清液于另一离心管中,加入等体积异丙醇 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 沉淀过夜, $12\,000\times g$, $4\text{ }^\circ\text{C}$ 下离心 10 min ,用 70% 乙醇洗涤沉淀 2 次,真空干燥,用 $50\text{ }\mu\text{L}$ 去离子水溶解, $4\text{ }^\circ\text{C}$ 保存.

1.3 cpDNA 检测

取 $5\text{ }\mu\text{L}$ cpDNA 进行 1% 琼脂糖电泳检测, 90 V 电泳 40 min ,用 BIO-RAD 公司凝胶电泳成像自动分析仪拍照记录.

紫外分光光度仪测 $\text{OD}_{260\text{ nm}}$ 和 $\text{OD}_{280\text{ nm}}$ 的值,并计算 cpDNA 的纯度.

2 结果与分析

2.1 枇杷叶绿体蔗糖梯度离心

从图 1 中可以看到,离心管中分层明显,A 层为脂质层,B 层为破碎的细胞组织,C 层为叶绿体层,D 层为密度较高的杂质.其中 C 层叶绿体数量比较多,分层明显说明用不同浓度的蔗糖溶液(52% , 30%),在 $2\,000\text{ r/min}$ 下离心,能很好地分离得到纯化的叶绿体.

2.2 叶绿体的检测

在普通显微镜下,叶绿体为椭圆或球形颗粒;在荧光显微镜下,叶绿素受激发光照射后可直接发出火红色荧光^[7].如图

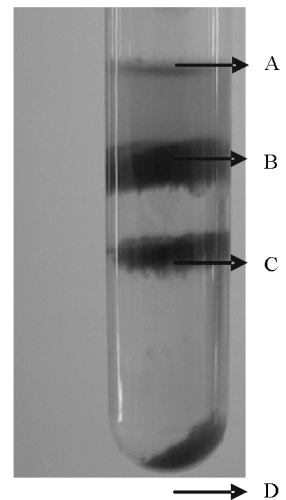


图 1 蔗糖密度梯度离心

2、3 所示,分离得到的叶绿体数量较多且完整,能满足后续实验的需求.

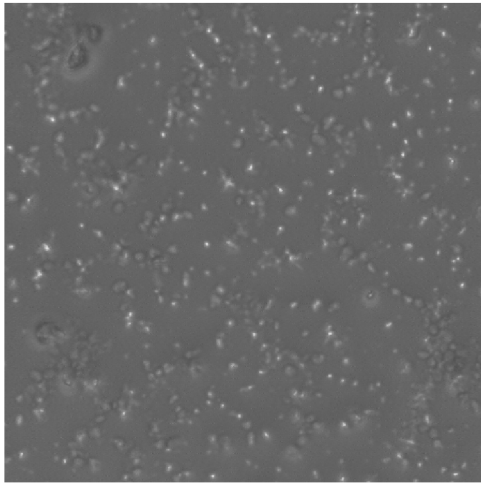


图 2 光学显微镜下观察的叶绿体

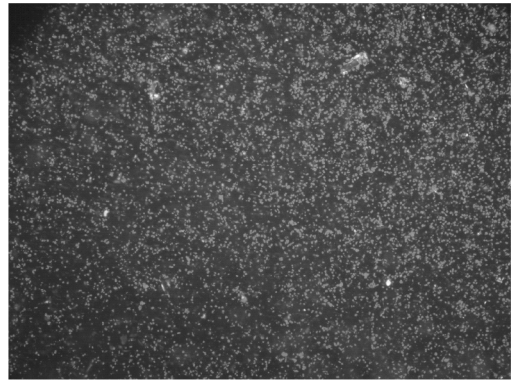


图 3 荧光显微镜观察的叶绿体

2.3 叶绿体 DNA 检测

2.3.1 叶绿体定性检测

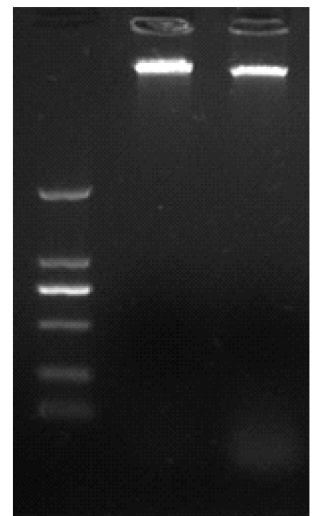
用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测结果如图 4 所示, 叶绿体基因组比总基因组小, 条带整齐清晰, 完整无降解.

2.3.2 叶绿体定量检测

用紫外分光光度仪, 测得叶绿体 DNA OD_{260 nm} 和 OD_{280 nm} 值如表 1, 并以总基因组 DNA 为对照.

表 1 枇杷叶绿体浓度检测及浓度

基因组	OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀	浓度 (ng/ul)
叶绿体 DNA	1.489	0.761
总 DNA	2.024	1.382



DL2000 总DNA cpDNA

图 4 cpDNA 电泳

3 讨 论

针对枇杷有茸毛, 且较多的多酚、多糖等次生物质, 本实验采用差速离心分离叶绿体, 使沉降系数不同的颗粒在不同的分离速度和离心时间下分批分离, 即在 $400 \times g$ 离心 5 min, 沉淀细胞核和细胞碎片, 所得上清液在 $800 \times g$ 离心 6 min 得到叶绿体沉淀, 结合蔗糖浓度梯度 (52%、30%) 离心 (图 1), 就可以较好地除去细胞核 DNA、线粒体及细胞碎片, 获得较高纯度的叶绿体, 这正是获得纯度较高 cpDNA 的关键因素之一^[8-9].

根据叶绿体为椭圆或球形颗粒及自发红色荧光的特征, 本实验进行了叶绿体纯度的检测, 此方法简便快捷, 效率高, 结果如图 2、3.

为了减少提取的枇杷 cpDNA 多糖的含量, 在水浴裂解后加入了 KAc 冰浴 30min, 这与基因组 DNA 提取方法相同, 不同的是, 在进行氯仿: 异戊醇抽提时加入了 1 mL CTAB/NaCl, 这很好地去除了多糖的污染. 为了排除核 DNA 及 RNA 对后续实验产生影响, 本实验纯化叶绿体 DNA 时进行了 DNA 酶和 RNA 酶处理, 电泳结果如图 4 所示, 无核 DNA 和 RNA 的污染, 获得的叶绿体 DNA 纯度高且无降解.

参考文献:

- [1] 王茜龄, 余茂德, 徐立, 等. 人工三倍体桑树新品系光合生理的研究 [J]. 西南大学学报: 自然科学版, 2008, 30(7): 93-97.

- [2] 邢少辰. 叶绿体基因组研究进展 [J]. 生物化学与生物物理进展, 2008, 35(1): 21-28.
- [3] 李晓贤, 周浙昆. 单子叶植物高级分类阶元系统演化: matK、rbcL 和 18S rDNA 序列的证据 [J]. 植物分类学报, 2007, 45(2): 113-133.
- [4] 杨 敏, 等. 枇杷基因组 DNA 和总 RNA 提取方法改良 [J]. 西南大学学报: 自然科学版, 2011, 33(1): 8-13
- [5] 岳 强. 小麦叶绿体 DNA 的提取与 p sbA 基因的扩散 [J]. 韶关大学学报: 自然科学版, 1994, 15(2): 92-95.
- [6] T. 马尼阿蒂斯 E F. 弗里奇 J. 分子克隆实验手册 [M]. 沈桂芳, 毛江森, 译. 杭州: 浙江科学技术出版社, 1987.
- [7] 徐基平. 新疆野生啤酒花叶绿体 DNA 的微卫星分析 [D]. 石河子: 石河子大学, 2008.
- [8] 张志良, 吴光耀. 植物生物化学技术和方法 [M]. 北京: 农业出版社, 1986.
- [9] RTCHWOOD D. Cent Rifugation [M]. England: Infromation Printing Limited, 1984 .

Optimization of the Methods for Extracting Triploid Locquat cpDNA

SUN Xiao-rong, YI Ding-jie, HE Qiao, LIANG Guo-lu

School of Horticulture and Landscape Architecture, Southwest University, Chongqing 400716, China

Abstract: High purity chloroplast of triploid loquat was extracted by grinding leaves in liquid nitrogen, combining of differential centrifugation ($400\times g$ centrifugal 5 min, $800\times g$ centrifugal 6 min) and sucrose density gradient (52%, 30%) centrifugation. Oval granular and spontaneous red fluorescence chloroplasts were observed under the optical microscope and the fluorescence microscope, respectively. Gel electrophoresis showed that the cpDNA thus extracted had good integrity and high purity and no degradation occurred. By UV spectrophotometry, the concentration of the cpDNA was $0.761\text{ ng}/\mu\text{l}$.

Key words: triploid loquat; chloroplast; cpDNA

责任编辑 欧 宾