黑龙江农业科学 2019(7):36-38
Heilongjiang Agricultural Sciences

http://www.haasep.cn
DOI:10.11942/j.issn1002-2767.2019.07.0036

杨运良,李建勋,丁宵,等.改良 CTAB 法提取红肉火龙果果实不同组织总 DNA 及质量检测[J].黑龙江农业科学,2019(7):36-38.

改良 CTAB 法提取红肉火龙果果实不同组织总 DNA 及质量检测

杨运良,李建勋,丁　宵,郭创业,董少鹏,段国琪,武宗信

(山西省农业科学院 棉花研究所,山西 运城 044000)

摘要:为探求红肉火龙果果实不同组织 DNA 含量情况,本研究以成熟期红肉火龙果果实为材料,采用改良 CTAB 法对火龙果果肉、果皮、种子进行总 DNA 提取。结果表明:红肉火龙果果肉、果皮、种子的 OD_{260}/OD_{280} 光吸收值分别为 1.982 7,1.984 4,1.997 5,均在 $1.8\leqslant OD_{260}/OD_{280}<2.0$,说明 DNA 纯度均很好。同一红肉火龙果果实不同组织中 DNA 浓度各不相同,其中种子中的 DNA 浓度为 0.135 $\mu g\cdot mL^{-1}$,含量最高,其次果皮中的 DNA 浓度 0.078 $\mu g\cdot mL^{-1}$,果肉中 DNA 浓度最低,为 0.036 $\mu g\cdot mL^{-1}$。

关键词:红肉火龙果;总 DNA;不同组织

火龙果,又称红龙果、仙蜜果、吉祥果、情人果等,属仙人掌科量天尺属(*Hylocereus undatus*)和蛇鞭柱属(*Seleniereus*)植物[1-2],原产于中美洲热带地区[3],主要分布在古巴[4]、墨西哥、哥斯达尼加、尼加拉瓜等国家和地区,除中美洲外,澳洲、亚洲的越南、泰国均有种植,大陆地区引种栽培要晚于台湾省,主要分布在广西、海南、贵州、广东、云南等南方省份,北方地区主要采用日光温室进行种植。

目前,各地栽培的火龙果以红肉火龙果为主,白肉火龙果逐渐被红肉火龙果取代,笔者在红肉火龙果引种研究中发现,同一红肉火龙果品种在不同地方有不同的命名,同一品系不同类型在产量、品质等方面表现出一定差异。为了进一步明确不同品种、同一品系不同类型红肉火龙果遗传差异,则需要借助 ISSR 分子标记进行遗传多样性和亲缘关系分析。但由于成熟期红肉火龙果果肉、果皮及种子中含有大量糖、蛋白质、酚类、膳食纤维等次生代谢物质,给 DNA 的提取带来不便,造成提取的 DNA 质量不高,无法进行 ISSR 分析。

本研究以成熟期红肉火龙果为试材,通过改良 CTAB 法进行总 DNA 提取,旨在探求红肉火龙果果肉、果皮及种子中 DNA 的含量情况,为进一步从分子遗传学角度进行红肉火龙果各类型遗传背景研究提供依据。

收稿日期:2019-02-23
基金项目:山西省科技厅面上青年基金项目(201701D221204);山西省农科院特色农业技术攻关项目(YGG17050)。
第一作者简介:杨运良(1986-),男,硕士,助理研究员,从事设施果树栽培及生理生化研究。E-mail:yyl_7514@163.com。

Comparison of Soybean Varieties in High Latitude and Cold Regions

CAI Xin-xin,TAN Juan,LYU Xiao-li,WANG Shu,ZHANG Qi-feng

(Heihe Branch of Heilongjiang Agricultural Sciences,Heihe 164300,China)

Abstract:In order to screen out soybean varieties suitable for cultivation in Heihe area,31 soybean varieties from all over the country were investigated for agronomic traits and yield with Heihe 43 as the control,providing a scientific and reliable basis for the breeding and promotion of new soybean varieties. The results showed that the yield of Jiuyan 26,Dongsheng 7,Hedou 1,Keshan 1,Heike 56,Nen′ao 4 and Heike 60 increased by 2.27%,2.62%,2.62%,6.11%,6.46%,7.50% and 14.48%,respectively. The yield of other varieties was lower than Heihe 43.

Keywords:high latitude cold region; soybean; varieties; agronomic characters; yield

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料 红肉火龙果果实材料采自山西省农业科学院棉花研究所南花农场，取成熟期的红肉火龙果果实，放入保鲜袋，快速带回实验室，进行 DNA 提取实验。

1.1.2 仪器 高速离心机（德国 Eppendorf）、移液枪（德国 Eppendorf）、紫外分光光度计（德国 Eppendorf BioPhotometer）、凝胶成像系统（北京六一）、恒温水浴锅（上海博讯）、电泳仪（北京六一）、电泳槽（北京六一）等。

1.1.3 试剂 NaCl、EDTA、Tris-HCl、CTAB、PVP-K30、DIECA、β-巯基乙醇、氯仿、异戊醇、异丙醇、NaAc、无水乙醇、RNaseA、琼脂粉、乙酸，所用试剂均为分析纯。

CTAB 缓冲液：1.4 mol·L^{-1} NaCl，0.02 mol·L^{-1} EDTA（pH8.0），0.1 mol·L^{-1} Tris-HCl（pH7.5），2%（w/v）十六烷基三甲基溴化铵（CTAB），2%（w/v）PVP-K30，0.1%（w/v）DIECA，2%（w/v）β-巯基乙醇，溶剂为去离子水。

1.2 方法

1.2.1 提取方法 参照常规 CTAB 法，进行改良，具体步骤如下：

（1）分别称取火龙果果肉、果皮、种子 0.3 g 为材料，加入液氮，充分研磨至细粉状，装入 2 mL 灭菌的离心管中。

（2）迅速加入 CTAB 缓冲液，充分摇匀，在 65 ℃水浴中反应 60 min，每隔 10 min 轻缓摇动，得到含有 DNA 的提取液Ⅰ。

（3）向反应后的 DNA 提取液Ⅰ中加入等体积的溶液 A，振荡混匀 1 min，10 000 r·min^{-1} 离心 10 min，得上清液Ⅰ；所述溶液 A 由氯仿∶异戊醇按照24∶1的体积比混合而成。

（4）向上清液Ⅰ中加入等体积的溶液 A，振荡混匀 3 min，10 000 r·min^{-1} 离心 10 min，得上清液Ⅱ。

（5）向上清液Ⅱ中缓慢加入 0.6 倍体积的－20 ℃预冷的异丙醇，水平摇动离心管，使其充分混匀，置于－20 ℃沉淀 30 min。

（6）于 4 ℃、10 000 r·min^{-1} 下离心 5 min，弃上清液，用 70%乙醇清洗沉淀 2 次，无水乙醇清洗沉淀 1 次，弃无水乙醇，干燥后得沉淀，即为 DNA。

（7）适量 TE 溶解液溶解沉淀 DNA，形成 DNA 溶解液Ⅰ。

（8）向 DNA 溶解液Ⅰ中加入 1%（v/v）RNaseA，37 ℃水浴 1 h。

（9）向 DNA 溶解液Ⅰ中加入等体积的溶液 A，振荡混匀 3 min，10 000 r·min^{-1} 离心 10min，得上清液Ⅲ。

（10）向上清液Ⅲ中加入 0.1 倍体积的3 mol·L^{-1} NaAc，然后缓慢加入 2 倍体积的－20 ℃预冷的无水乙醇，水平摇动离心管 5 min，形成絮状沉淀。

（11）于 4 ℃、10 000 r·min^{-1} 下离心 5 min，弃上清液，用 70%乙醇清洗沉淀 2 次，无水乙醇清洗沉淀 1 次，弃无水乙醇，干燥后得沉淀，即为 DNA。

（12）适量 TE 溶解液溶解沉淀 DNA，进行电泳检测，剩余 DNA 溶液保存于－20 ℃冰箱中备用。

1.2.2 DNA 纯度和浓度检测 取少量提取纯化后的火龙果果肉、果皮、种子 TE 溶解的 DNA 溶液，在紫外分光光度计下测定 OD_{260}/OD_{280} 比值，根据 OD_{260}/OD_{280} 值判断 DNA 纯度，当 $1.8 \leqslant OD_{260}/OD_{280} < 2.0$ 时，表明 DNA 纯度较好；根据 OD_{260} 的值，通过此公式：DNA 浓度（μg·mL^{-1}）＝OD_{260}×50×稀释倍数/1 000 计算 DNA 浓度。

1.2.3 DNA 质量电泳检测 分别取成熟期火龙果果肉、果皮、种子 DNA 提取液 5 μL 点样于 0.8%的琼脂糖凝胶中进行电泳，EB（溴化乙锭）染色，进行 DNA 质量检测，电泳缓冲液为 1×TAE，恒定电压 5 V·cm^{-1}，按凝胶的长度进行电泳，约 0.5 h 后，在紫外凝胶成像系统下观察并记录所提取 DNA 的质量、纯度及 RNA 的消化去除情况。

2 结果与分析

2.1 DNA 纯度和浓度检测结果

表 1 结果显示，红肉火龙果果肉、果皮、种子的 OD_{260}/OD_{280} 光吸收值分别为 1.982 7，1.984 4，1.997 5，均在 $1.8 \leqslant OD_{260}/OD_{280} < 2.0$，说明 DNA 纯度很好。同一红肉火龙果果实不同组织中 DNA 浓度各不相同，其中种子中的 DNA 浓度为 0.135 μg·mL^{-1}，含量最高，其次果皮中的 DNA 浓度 0.078 μg·mL^{-1}，DNA 浓度最低的是果肉，浓度为 0.036 μg·mL^{-1}。

2.2　DNA 质量的琼脂糖凝胶电泳检测

图 1 显示，通过琼脂糖凝胶电泳检测，DNA 条带清晰，泳道下边无拖尾，无小片段产物，RNA 消化彻底。

表 1　同一果实不同组织 DNA 检测数据

Table 1　DNA detection data of different tissues in the same fruit

指标 Index	果肉 Flesh	果皮 Peel	种子 Seed
OD_{260}	0.7217	1.5600	2.7000
OD_{280}	0.3640	0.7861	1.3517
OD_{260}/OD_{280}	1.9827	1.9844	1.9975
浓度 Concentration/($\mu g \cdot mL^{-1}$)	0.036	0.078	0.135

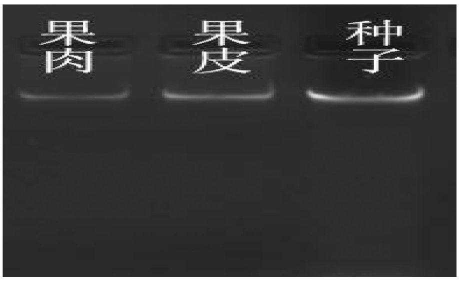

图 1　红肉火龙果果肉、果皮及种子的 DNA 电泳结果

Fig. 1　DNA electrophoresis results of flesh, peel and seed of pitaya

3　结论与讨论

3.1　红肉火龙果果实不同部位 DNA 质量浓度不同

通过改良 CTAB 法对红肉火龙果果肉、果皮、种子部位进行 DNA 提取，结果表明成熟期红肉火龙果果肉、果皮、种子均可有效提取 DNA，但提取的 DNA 质量浓度略有差异，如从种子中提取的 DNA 质量浓度 0.135 $\mu g \cdot mL^{-1}$，果皮中提取的 DNA 质量浓度 0.078 $\mu g \cdot mL^{-1}$，果肉中提取的 DNA 质量浓度 0.036 $\mu g \cdot mL^{-1}$，种子中 DNA 质量浓度大约是果皮中 DNA 质量浓度的 1.73 倍，果肉中 DNA 质量浓度的 3.75 倍；果皮中 DNA 质量浓度是果肉中 DNA 质量浓度的 2.17 倍。

3.2　改良 CTAB 法去除杂质效果好

成熟期红肉火龙果果实中含有较多的糖类、蛋白质、酚类等次生物质，严重影响 DNA 的提取质量和纯度。试验结果表明：通过改良 CTAB 法提取的红肉火龙果果肉、果皮、种子中的 DNA 浓度均超过 0.030 $\mu g \cdot mL^{-1}$，说明提取物中糖、蛋白质、多酚、酶等干扰物质去除较好，能够为进一步研究提供高质量的 DNA。

3.3　研磨及裂解时间非常关键

为了能够获得高质量的 DNA，红肉火龙果果肉、果皮、种子在研磨时应加入充足的液氮，并迅速研磨，使果肉、果皮呈粉色粉末，种子成白色粉末，研磨好后迅速转移至离心管中，迅速加入 CTAB 缓冲液，充分摇匀，在 65 ℃ 水浴中反应 60 min，进行裂解。裂解时间短，DNA 释放不完全，时间长 DNA 降解严重，因此，破壁好坏及细胞裂解时间长短对于 DNA 的得率至关重要。

参考文献：

[1]　邓仁菊，范建新，蔡永强．国内外火龙果研究进展及产业发展现状[J]．贵州农业科学，2011，39(6)：188-192.

[2]　朱英，陶刚，刘作易，等．火龙果基因组 DNA 提取的新方法[J]．问题探讨，2008，27(11)：111-112.

[3]　余志雄，欧高政，陈清西，等．火龙果 DNA 提取方法比较研究[J]．中国农学通报，2010，26(4)：300-303.

[4]　韦茜，蔡永强，金吉芬，等．CTAB 法提取火龙果基因组 DNA 的试验研究[J]．安徽农业科学，2008，36(13)：5325-5326.

Extraction and Quality Detection of Total DNA from Different Tissues of Red Dragon Fruit by Modified CTAB Method

YANG Yun-liang, LI Jian-xun, DING Xiao, , GUO Chuang-ye, DONG Shao-peng, DUAN Guo-qi, WU Zong-xin

(Cotton Research Institute, Shanxi Academy of Agricultural Sciences, Yuncheng 044000, China)

Abstract: In order to explore the content of DNA in different tissues of red dragon fruit, the total DNA of flesh, pericarp and seed of dragon fruit was extracted by modified CTAB method. The results showed that the OD_{260}/OD_{280} light absorption values of pulp, peel and seed were 1.982 7, 1.984 4 and 1.997 5 respectively, all of which were between $1.8 \leqslant OD_{260}/OD_{280} \leqslant 2.0$, indication that the purity of DNA was very good. The concentration of DNA in different tissues of the same red flesh dragon fruit was different, in which the concentration of DNA in seed was 0.135 $\mu g \cdot mL^{-1}$, and the concentration of DNA in pericarp was 0.078 $\mu g \cdot mL^{-1}$, the concentration of DNA in pulp was the lowest, 0.036 $\mu g \cdot mL^{-1}$.

Keywords: dragon fruit; total DNA; different tissues