

云南越桔资源 DNA 的提取及分析

王连润¹, 崔正菊², 刘家迅¹, 陶 磅¹, 万 红¹, 李卫芬¹, 潘丽云¹

(1. 云南省农业科学院 园艺作物研究所, 云南 昆明 650205; 2. 云南省农业科学院, 云南 昆明 650205)

摘要:为系统评价云南越桔属资源的遗传多样性及亲缘关系,以云南省农业科学院园艺作物研究所蓝莓试验基地保存的 13 份云南越桔属资源叶片为材料,采用 CTAB 提取方法,对越桔基因组 DNA 进行了提取,并对获得的 DNA 进行了琼脂糖凝胶电泳检测及含量测定分析。结果表明:11 份越桔叶片中提取出基因组 DNA,且 DNA 的纯度和完整性都较好,质量高, $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 的比值均在 1.8~2.0;2 份野生越桔材料未获得谱带。

关键词:越桔;基因组 DNA;提取

中图分类号:S663.9 **文献标识码:**A **文章编号:**1002-2767(2016)01-0023-03 DOI:10.11942/j.issn1002-2767.2016.01.0023

蓝莓(Blueberry),又称越桔、蓝浆果,为杜鹃花科(Ericaceae)越桔属(*Vaccinium* L.)植物,多年生落叶或常绿灌木。蓝莓以其风味独特、营养保健功能强日益受到人们的关注,被列入第三代水果行列。由于对其保健意义的科学论证,尤其是色素在保护视力上的作用,使蓝莓受到越来越广泛的重视^[1],联合国粮农组织将其列为人类五大健康食品之一^[2-3]。

成功提取并获得高质量的基因组 DNA 是进行果树种质资源遗传多样性、系统演化及亲缘关系等研究的基础。目前,已经报道越桔资源基因组 DNA 的提取一般采用植物基因组试剂盒提取^[4]、CTAB 法提取^[5]及改良 CTAB 法提取^[6-7]等方法,近年来,SSR、ISSR、SRAP 等分子标记技术已逐渐被应用于越橘品种鉴定、亲缘关系分析及遗传多样性研究等领域^[4,6,8]。本研究在借鉴前人研究的基础上,采用 CTAB 法对云南越桔属资源的 DNA 进行提取,并对提取产物进行了紫外、琼脂糖凝胶电泳检测分析,旨在确定 CTAB 法对于云南越桔属资源 DNA 提取的可行性,为系统评价云南越桔属资源的遗传多样性及亲缘关系等分子生物学研究,以及进一步开发利用资源奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

试验所用越桔材料采自云南省农业科学院园艺作物研究所试验基地,分别为 4 份越桔栽培种、5 份栽培品种的 2 年生实生苗及 4 份云南野生越桔材料。样品采集后装入泡沫冰盒中带回实验室,于-20℃冰箱中保存备用。

表 1 供试材料

Table 1 The experimental materials

编号 Code	种名	编号 Code	种名 Species
1	灿烂-3	8	云南越桔
2	灿烂-2	9	灿烂
3	灿烂-1	10	密斯黛
4	梯芙蓝	11	野生型-2
5	夏普蓝	12	野生型-1
6	夏普蓝-2	13	野生型-3
7	夏普蓝-1		

2×CTAB 提取缓冲液为:100 mmol·L⁻¹ Tris-HCl(pH 8.0),20 mmol·L⁻¹ EDTA(pH 8.0),1.4 mol·L⁻¹ NaCl,2% (w/v) CTAB,40 mmol·L⁻¹ β-巯基乙醇;TE 缓冲液:10 mmol·L⁻¹ Tris-HCl(pH7.4),1 mmol·L⁻¹ EDTA;氯仿-异戊醇(24:1),75% 乙醇,液氮;2 000 bp Marker,6×loading buffer,琼脂糖,TAE 缓冲液:Tris-base,0.5 mol·L⁻¹ EDTA,冰乙酸。主要仪器为:台式高速离心机,恒温水浴锅,紫外可见分光光度计,琼脂糖凝胶电泳仪,聚丙烯酰胺凝胶电泳仪,电泳槽,移液器。

收稿日期:2015-10-19

基金项目:云南省重点新产品开发计划资助项目(2013 BB011)

第一作者简介:王连润(1978-),女,云南省鹤庆县人,硕士,助理研究员,从事果树栽培及育种研究。

通讯作者:刘家迅(1967-),男,学士,副研究员,从事小浆果栽培及育种研究工作。

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取方法 CTAB 法参照《生物工程实验技术手册》中“植物 DNA 的 CTAB 提取法”进行^[9]。取 3~4 片越桔嫩叶置于研钵中,分 3 次加入液氮研磨至粉末状;将粉末置于 1.5 mL 的离心管中,用移液器加入 750 μ L 配置好的 3% CTAB 裂解液 [100 mmol \cdot L⁻¹ Tris-HCl (pH 8.0)、20 mmol \cdot L⁻¹ EDTA(pH 8.0)、1.4 mol \cdot L⁻¹ NaCl、2% CTAB(M/V)、5% β -巯基乙醇 (V/V)],混匀,65℃水浴 30 min;11 000 r \cdot min⁻¹,离心 5 min,取上清液;加入同体积的氯仿:异戊醇(24:1),轻摇 3 min;11 000 r \cdot min⁻¹,离心 5 min,取上清液;加入同体积的冰异丙醇,混匀,置于-20℃静置 30 min;11 000 r \cdot min⁻¹,离心 5 min,弃上清液;11 000 r \cdot min⁻¹,用 75%的乙醇离心 2 min,洗两次,超净台下吹干,并加入 60~100 μ L TE[(100 mmol \cdot L⁻¹ Tris-HCl(pH 8.0)、1.0 mol \cdot L⁻¹ EDTA(pH8.0)缓冲液]稀释,置于-20℃冰箱保存备用。

1.2.2 DNA 的检测方法 ①DNA 纯度和浓度检测。DNA 的纯度和浓度采用紫外分光光度计检测。取 2 μ L DNA 样品,加入 98 μ L TE 缓冲液,稀释至 50 倍,用 100 μ L TE 缓冲液作为对照,测定其在 260 及 280 nm 处的紫外吸收值,计算出 D_{260 nm}/D_{280 nm} 的比值。

② DNA 完整性检测。DNA 样品的完整性采用 1.5%琼脂糖凝胶电泳检测。取 5 μ L DNA 样品,加入 3 μ L 6 \times loading buffer 缓冲液,混匀后加入点样。在 1.0%琼脂糖(EB 染色)凝胶上电泳,电泳结束后置于自动凝胶成像仪中观察,拍照记录。

2 结果与分析

2.1 13 份云南越桔叶片 DNA 纯度和浓度的分析

从表 2 可知,CTAB 法从 13 份越桔资源中均提取出了基因组 DNA,11 份样品的 D_{260 nm}/D_{280 nm} 比值均介于 1.8~2.0。试验过程中发现提取的 DNA 均为白色絮状沉淀,溶液清亮,无黏稠感,表明蛋白质、RNA、多糖和酚类等杂质去除完全,对 DNA 样液未造成污染,DNA 纯度较高;野生型-1 和野生型-3 两份样品的 D_{260 nm}/D_{280 nm} 比值分别为 1.63 和 1.48,表明提取的 DNA 纯度较低,DNA 样液中可能存在蛋白质、RNA、多糖和酚类等杂

质的污染。表 2 结果显示,不同越桔材料提取的叶片 DNA 浓度差异较大,最高达 6.29 μ g $\cdot\mu$ L⁻¹,最低仅为 0.04 μ g $\cdot\mu$ L⁻¹,这种差异可能与不同越桔材料的叶片在成熟度方面,以及在多糖、蛋白质等次生物质含量方面存在差异等因素有关^[10]。

表 2 13 份越桔叶片基因组 DNA 紫外分析结果

Table 2 UV scanning results of genomic DNA from leaves of 13 blueberry species			
编号 Code	种名 Species	D ₂₆₀ /D ₂₈₀	DNA 浓度/(μ g $\cdot\mu$ L ⁻¹) DNA concentration
1	灿烂-3	2.02	1.41
2	灿烂-2	2.05	1.74
3	灿烂-1	2.06	3.55
4	梯芙蓝	2.07	3.86
5	夏普蓝	2.00	5.90
6	夏普蓝-2	1.99	0.71
7	夏普蓝-1	1.99	0.57
8	云南越桔	2.02	0.71
9	灿烂	2.06	2.06
10	密斯黛	1.97	6.29
11	野生型-2	2.02	0.59
12	野生型-1	1.63	0.11
13	野生型-3	1.48	0.04

2.2 11 份云南越桔叶片 DNA 的电泳分析

图 1 结果显示,采用 CTAB 法获得了 11 份越桔材料的 DNA 谱带,DNA 结构完整,带型较整齐,但 DNA 条带不够清晰,有少量杂质及降解迹象,且多数材料存在拖尾现象(供试材料中,野生型-1 和野生型-3 未获得谱带,已删除)。

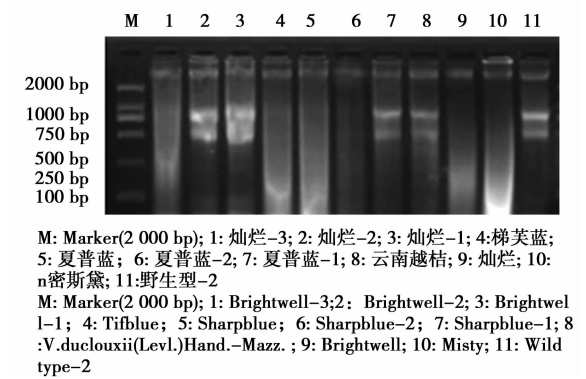


图 1 11 份云南越桔资源叶片基因组 DNA 电泳图谱
Fig. 1 Electrophoresis chart of DNA from leaves of 11 blueberry (Vaccinium spp.) species

3 结论与讨论

本研究中的 DNA 电泳图谱结果显示,野生型-1 和野生型-3 两份野生材料未获得清晰的谱带,表明提取的 DNA 产率极低,紫外分光光度计检测结果也证实了这一点。该两份野生材料为于 2014 年 4 月份从云南野外收集并盆栽的越桔资源,实验取样时植株尚未萌发新梢新叶,故采集了中老叶片,由此可见,采用 CTAB 法提取越桔叶片基因组 DNA 时材料必须为嫩叶,或采用该方法提取越桔基因组 DNA 只适用于幼嫩材料,这与徐娜等^[5]的结论一致。该两份野生叶片材料较老,提取的 DNA 产率极低,推测 DNA 样液中可能存在蛋白质、RNA、多糖和酚类等杂质的污染,具体原因有待于进一步的研究。

DNA 谱带出现拖尾现象,且谱带并不十分清晰,这可能与含有酚羟基的小分子次生代谢产物如黄酮、有机酸、鞣质等未彻底去除,氧化后与 DNA 结合,引起 DNA 降解或抑制了酶的活性有关,具体原因有待于进一步的研究。在今后云南越桔资源的 DNA 提取过程中,采取相应的措施对 CTAB 法进行改良,尽量使这些越桔叶片中含有的小分子次生代谢产物去除完全,或许能获得更清晰的 DNA 谱带,此方面的工作有待于进一步的开展。

紫外分光光度计检测研究结果表明,采用 CTAB 法提取的 DNA 可以满足越桔 PCR、SSR、SRAP 等一般分子生物学研究对 DNA 质量的要

求,但为了获得更高质量的 DNA,以及谱带更清晰、无“拖尾”现象等结果的 DNA 电泳图谱,实验过程中除取样时必须严格采集幼嫩叶片除外,还需要对 CTAB 法进行进一步的优化。本研究为云南越桔资源 DNA 提取方法和试验材料的选择提供了科学依据,为进一步开展云南越桔属资源的遗传多样性及亲缘关系等分子生物学研究奠定了基础。

参考文献:

- [1] 於虹,顾姻,贺善安.我国南方地区越橘栽培现状及发展展望[J].中国果树,2009(3):68-70,72.
- [2] 顾姻,贺善安.蓝浆果与蔓越桔[M].北京:中国农业出版社,2001.
- [3] 和加卫,徐中志,唐开学,等.云南越桔的组织培养[J].植物生理学通讯,2007,43(2):320.
- [4] 崔建民,刘红霞,邹荣仁,等.越橘种质资源遗传多样性和亲缘关系研究[J].果树学报,2010(3):373-378.
- [5] 徐娜,夏秀英,徐大可,等.越橘基因组的快速提取及分析[J].果树学报,2007,24(5):714-717.
- [6] 於虹,顾姻,贺善安,等.越橘品种的 ISSR 鉴定及其亲缘关系分析[J].吉林农业大学学报,2009,31(5):512-515.
- [7] 尹德洁,苏淑钗,刘肖,等.蓝莓 SRAP-PCR 反应体系的建立优化及引物筛选[J].东北林业大学学报,2013(2):35-39.
- [8] 尹德洁.蓝莓野生资源和 SRAP 遗传多样性研究[D].北京:北京林业大学,2012.
- [9] 栾雨时,包永明.生物工程实验技术手册[M].北京:化学工业出版社,2005:164-168.
- [10] 佟兆国,王富荣,章镇,等.一种从果树成熟叶片提取 DNA 的方法[J].果树学报,2008,25(1):122-125.

Analysis and Isolation of Genomic DNA of Blueberry (*Vaccinium* spp.) Resources in Yunnan

WANG Lian-run¹, CUI Zheng-ju², LIU Jia-xun¹, TAO Pang¹, WAN Hong¹, LI Wei-fen¹, PAN Li-yun¹

(1. Institute of Horticultural Crops, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Kunming 650205; 2. Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Kunming 650205)

Abstract: For system evaluation of genetic diversity and genetic relationship of blueberry resource, the genomic DNA of leaves of 13 blueberry (*Vaccinium* spp.) species were isolated by CTAB method, which from Institute of Horticultural Crops, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, and the purity and quality of each DNA obtained was evaluated by agarose gel electrophoresis and UV scanning. The results showed that the genomic DNA extracted from leaves of 11 blueberry (*Vaccinium* spp.) species by this method was pure, integral, the value of $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ was 1.80 to 2.0. Two wild species fail to get genomic DNA band.

Keywords: Blueberry (*Vaccinium* spp.); Genomic DNA; Isolation