

适合 MSAP 分析的核桃子叶 DNA 提取方法

周贝贝, 陈凌娜, 张俊佩, 裴东*

(中国林业科学研究院林业研究所, 林木遗传育种国家重点实验室, 北京 100091)

关键词: 核桃; 子叶; DNA 提取; 多糖; MSAP

中图分类号: S718.46

文献标识码: A

DNA Extraction Method of Walnut Cotyledon Suitable for MSAP Analysis

ZHOU Bei-bei, CHEN Ling-na, ZHANG Jun-pei, PEI Dong

(Research Institute of Forestry, Chinese Academy of Forestry, State Key Laboratory of Tree Genetics and Breeding of State Forestry Administration, Beijing 100091, China)

Abstract: To obtain high-quality DNA suitable for methylation-sensitive amplification polymorphism (MSAP), analysis, the mature cotyledon and tissue cultured cotyledon of walnut cultivar 'Liaoning-1' were used as the testing materials in the research of DNA isolation by 3 methods (SDS, high salt CTAB and modified high salt CTAB) and the mature leaf tissue was taken as the control. The concentration and intactness of the extracted DNA were determined using a spectrometer and by electrophoresis in 0.8% (w/v) agarose gels against standard solutions of lambda DNA. High quality DNA was extracted from leaf tissues using the high salt CTAB method and the modified high salt CTAB method. No detectable DNA was extracted from the mature cotyledon and cultured cotyledon using SDS method. The DNA with high quality but little quantity was extracted from the mature cotyledon but not the extract cultured cotyledon using the high salt CTAB method. The DNA with high quantity and quality suitable for MSAP analysis from both mature cotyledon and cultured cotyledon was extracted using the modified high salt CTAB method. The DNA extraction method of walnut cotyledon suitable for MSAP analysis was established, which could lay foundation for downstream molecular biology experiment and provide a reference to the polysaccharide removal research in DNA extraction procedure.

Key words: *Juglans regia*; cotyledon; DNA extraction; polysaccharide; MSAP

核桃(*Juglans regia* L.)营养价值高,含有丰富的脂肪酸和蛋白质^[1],子叶是核桃重要的营养储存器官,作为常用的实验材料,可用来组织培养进行生根实验等相关研究^[2-3]。MSAP是在 AFLP 基础上建立起来的在全基因组范围检测 5'-CCGG 位点的胞嘧啶甲基化变化的实验技术^[4],具有多态性高、无需预知 DNA 序列的优点,但其需要提取高质量的基因组 DNA,存在于 DNA 中的多糖等杂质会对酶切等

后续实验造成较大影响^[5]。目前,核桃组织全基因组 DNA 提取方法主要集中在叶片组织^[6-7]。雷玲等^[6]以 13 个河北核桃优系叶片为材料,比较了高盐低 pH 值法、SDS 法和 CTAB 法提取基因组 DNA 的效果,确定含 3% PVP 的高盐低 pH 值法为河北核桃叶片 DNA 提取的最适方法;然而,核桃子叶的 DNA 提取目前没有较为有效的方法。本试验以'辽宁 1 号'核桃品种近成熟子叶和经过组织培养的子叶为

收稿日期: 2012-11-05

基金项目: 林业公益性行业科研专项(201004048,4-46)

作者简介: 周贝贝(1985—),男,山东泰安人. 博士研究生,主要从事核桃生根调控机制方面的研究.

* 通讯作者: 研究员,博导,主要从事经济林研究. E-mail: peigu@caf.ac.cn

材料,以叶片为对照,研究 3 种不同的 DNA 提取方法(SDS、高盐 CTAB、改良高盐 CTAB)所提取 DNA 纯度、含量、多糖残留等方面的差别,以期找到适合 MSAP 分析的核桃子叶 DNA 提取方法,为以子叶为实验材料的分子生物学研究奠定基础,为深入研究 DNA 提取过程多糖的去除提供参考。

1 材料与方 法

1.1 材 料

实验材料为近成熟(雌花盛花后 130 d)的‘辽宁 1 号’核桃青果和核桃成熟叶片,于 2011 年 8 月 6 日采自河北农业大学核桃种质资源圃。采集后将种实保存于 4 ℃ 条件下备用,叶片经干冰保存带回实验室,置于 -20 ℃ 冰箱备用。核桃子叶采集根据周贝贝^[8]的方法,子叶的培养用 1/4DKW^[9] + 3 mg · L⁻¹ IBA 培养基,培养基分装到 50 mL 的三角瓶中,于培养的第 10 天进行采样。培养采用:将子叶平放于固体培养基上,每瓶接种 4 个外植体。培养条件为(25 ± 3) ℃,暗培养。

1.2 试 验 方 法

1.2.1 SDS 方法 SDS 方法参考 Goldenberger 等^[10]、Aljanabi 等^[11]、Rohland 等^[12]报道的方法。

1.2.2 高盐 CTAB 方法 高盐 CTAB 参考 Souza^[13]、Zhang 等^[14]报道的方法。

1.2.3 改良高盐 CTAB 方法 (1)称取 0.1 g 实验材料液氮研磨成粉末,放入 1.5 mL 离心管中。(2)加入 500 μL Extraction buffer(100 mmol Tris-HCl pH 值 8.0、0.35 mol sorbitol、5 mmol EDTA pH 值 8.0,用之前加 1% β-巯基乙醇),冰浴 10 min,4 ℃ 10 000 r · min⁻¹离心 10 min,重复 1 次。(3)去上清并用 500 μL Extraction buffer 悬浮沉淀,加入 350 μL 高盐

CTAB buffer(50 mmol · L⁻¹ Tris-HCl pH 值 8.0、4 mol · L⁻¹ NaCl、1.8% CTAB、25 mmol · L⁻¹ EDTA pH 值 8.0、5 mol · L⁻¹ PVP、25 mmol · L⁻¹ Na₂S₂O₅)和 30 μL Laurouyl Sarcosine,55 ℃ 温浴 60 min。(4)加入 30% 终浓度乙醇,等体积的酚/氯仿/异戊醇(25:24:1),混匀,10 000 r · min⁻¹离心 10 min,用氯仿/异戊醇重复 1 次。(5)转移上清到一新的离心管,加入 1/10 体积的 NaAc 和 2/3 体积异丙醇,混匀,-20 ℃ 放置 30 min。(6)8 000r · min⁻¹离心 10 min,弃上清。(7)70% 乙醇洗涤沉淀,弃乙醇,室温下微干,加入 100 μL TE 溶解 DNA。(8)加入终浓度 50 μg · μL⁻¹的 RNase,37 ℃ 保温 1 h。(9)DNA 溶液补足至 300 μL,加入终浓度 2 mol · L⁻¹的 NaAc 和等体积氯仿/异戊醇抽提 1 次。(10)上清液中加入 2/3 体积异丙醇,-20 ℃ 放置 30 min。(11)8 000 r · min⁻¹离心 10 min,弃上清。(12)70% 乙醇洗涤沉淀,自然干燥后溶于 20 μL TE 中。

1.2.4 DNA 检测 取 2 μL DNA 样品用 Nano 8 000 测定波长 260、280、230 nm 处的光吸收值(OD 值)、OD₂₆₀ \ OD₂₈₀ 比值、OD₂₆₀/OD₂₃₀ 比值和 DNA 浓度;取 3 μL DNA 在 0.8% 的琼脂糖凝胶、1 × TBE 缓冲液 3 v/cm 电压条件下电泳,以已知含量的 DNA Marker(鼎国生物工程公司)为对照,EB 染色 15 min,检测 DNA 的浓度和纯度,在 UVP 凝胶成像系统上观察和拍照。

1.2.5 DNA 的 MSAP 分析 DNA 的 MSAP 分析实验方法参考 Portis 等^[15] Peraza-Echeverria 等^[16]的方法,对基因组 DNA 进行酶切、连接、预扩增、选择性扩增,6% 聚丙烯酰胺凝胶电泳、银染染色、读带和数据整理,试验中所用接头、预扩、选择性扩增引物序列同 Zhang 等^[17]、Long 等^[18]实验所用引物(表 1)。

表 1 MSAP 分析的接头和引物序列

接头和引物(5'→3')	序列	
接头	<i>EcoR</i> I adaptors(Forward)	CTCGTAGACTGCGTACC
	<i>EcoR</i> I adaptors(Reverse)	AATFGGTACGCAGTCTAC
	<i>Hpa</i> II- <i>Msp</i> I adaptors(Forward)	GACGATGAGTCTAGAA
	<i>Hpa</i> II- <i>Msp</i> I adaptors(Reverse)	CGTCTAGACTCATC
预扩增引物(5'→3')	E + A	GACTGCGTACCAATTCA
	H/M + T	GATGAGTCTAGAACGGT
选扩增引物(5'→3')	E + AAC	GACTGCGTACCAATTCAAC
	E + AAG	GACTGCGTACCAATTCAAG
	E + ACA	GACTGCGTACCAATTCACAA
	H/M + TAC	GATGAGTCTAGAACGGTAC
	H/M + TAG	GATGAGTCTAGAACGGTAG

2 结果与分析

2.1 DNA 吸光值检测

SDS、高盐 CTAB、改良高盐 CTAB 3 种方法提取的核桃成熟子叶、组培子叶和成熟叶片 DNA 的吸光值检测结果见表 1。 OD_{260}/OD_{280} 用于评估 DNA 纯度,用 SDS 方法提取的核桃成熟子叶、组培子叶和成熟叶片 DNA 的 OD_{260}/OD_{280} 比值分别为 2.60、3.10 和 2.90,表明 DNA 降解较严重;用高盐 CTAB 方法提取的核桃成熟子叶、组培子叶和成熟叶片 DNA 的 OD_{260}/OD_{280} 比值分别为 2.02、1.93 和 1.82,表明所提取的成熟子叶和组培子叶 DNA 纯度较高,有轻度降解或 RNA 残留,成熟叶片 DNA 质量较好;用改良高盐 CTAB 方法提取的核桃成熟子叶、组培子叶和成熟叶片 DNA 的 OD_{260}/OD_{280} 比值分别为 1.79、1.81 和 1.80,表明 DNA 纯度较高。 OD_{260}/OD_{230} 用于评估碳水化合物、多肽、苯酚等杂质残留,用 SDS 方法提取的核桃成熟子叶、组培子叶和成熟叶片 DNA 的 OD_{260}/OD_{230} 比值分别为 1.32、1.16 和 1.23,表明多糖残留较多;高盐 CTAB 方法提取的核桃成熟子叶、组培子叶和成熟叶片 DNA 的 OD_{260}/OD_{230} 比值分别为 1.76、1.61 和 2.61,表明所提取的成熟子叶和组培子叶 DNA 多糖残留较多,成熟叶片 DNA 纯度较高,组织间差异较大;改良高盐 CTAB 方法提取的核桃成熟子叶、组培子叶和成熟叶片 DNA 的 OD_{260}/OD_{230} 比值分别为 2.56、2.48 和 2.52,表明 DNA 纯度较高,基本无多糖残留。对 DNA 的浓度检测而言,除 SDS 方法提取的 DNA 浓度很低 (60.53 、 30.64 、 $103.62 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) 外,其余 DNA 浓度均较高,适合分子生物学下游操作。

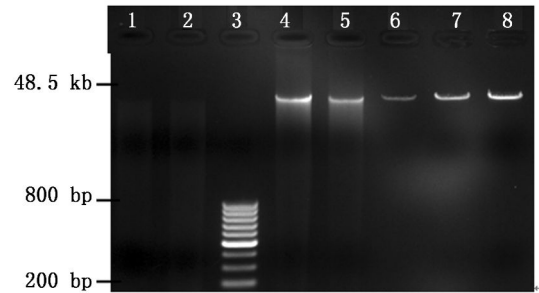
表 2 3 种方法提取的 DNA 吸光值检测结果

方法	材料	OD_{260}/OD_{280}	OD_{260}/OD_{230}	浓度/ $(\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1})$
SDS	成熟子叶	2.60	1.32	60.53
	组培子叶	3.10	1.16	30.64
	成熟叶片	2.90	1.23	103.62
高盐 CTAB	成熟子叶	2.02	1.76	763.64
	组培子叶	1.93	1.61	604.58
	成熟叶片	1.82	2.61	754.68
改良高盐 CTAB	成熟子叶	1.79	2.56	483.47
	组培子叶	1.81	2.48	636.96
	成熟叶片	1.80	2.52	805.16

2.2 DNA 电泳检测结果

DNA 电泳检测结果(图 1)中,SDS 方法提取的核桃成熟子叶和组培子叶 DNA 在泳道 1 和 2, DNA

条带不清晰,呈现弥散状,表明降解严重;高盐 CTAB 方法提取的核桃成熟子叶和组培子叶 DNA 在泳道 4 和 5, DNA 条带较亮,表明浓度较高,泳道呈轻微弥散状,有轻度 DNA 降解或有多糖等杂质残留;改良高盐 CTAB 方法提取的核桃成熟子叶和组培子叶 DNA 在泳道 6 和 7, DNA 条带较亮,表明浓度较高,泳道清晰, DNA 稳定,无多糖等杂质残留。对照条带较亮,泳道清晰,表明 DNA 质量较好。



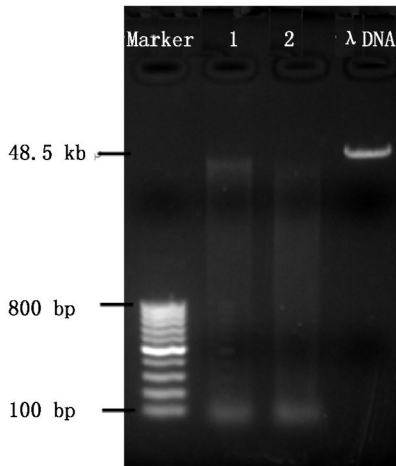
1 和 2 分别为 SDS 方法提取的成熟子叶和组培子叶 DNA; 3. DNA Marker; 4 和 5 分别为高盐 CTAB 方法提取的成熟子叶和组培子叶 DNA; 6 和 7 分别为改良高盐 CTAB 方法提取的成熟子叶和组培子叶 DNA; 8. 对照叶片组织提取的 DNA

图 1 3 种方法提取的 DNA 电泳结果

2.3 改良高盐 CTAB 提取的成熟子叶 DNA 的 MSAP 分析

吸光值比较和电泳检测表明:改良高盐 CTAB 方法提取的成熟子叶 DNA 质量较好,高盐 CTAB 方法提取的成熟子叶 DNA 有部分多糖的残留,为比较多糖残留对酶切的影响,本研究将 2 种 DNA 在 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 酶切 (*EcoR* I/*Msp* I) 2.5 h, 然后进行琼脂糖凝胶电泳检测(图 2)。泳道 1 为高盐 CTAB 提取的成熟子叶 DNA 酶切 (*EcoR* I/*Msp* I) 电泳图, λ DNA 所指示的 DNA 条带处 DNA 未完全降解,表明多糖残留对酶切有一定影响;泳道 2 为改良高盐 CTAB 提取的成熟子叶 DNA 酶切 (*EcoR* I/*Msp* I) 电泳图,泳道呈均匀弥散状, DNA 酶切完全。

为进一步验证改良高盐 CTAB 提取的成熟子叶 DNA 可用于 MSAP 分析,本研究对酶切产物进行了预扩增与选择性扩增,预扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳检测(图 3),对选择性扩增产物进行 5% 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测(图 4)。预扩增产物在 $200 \sim 1\,000 \text{ bp}$ 范围内呈弥散状分布,表明酶切连接效果较好;选择性扩增产物经变性聚丙烯酰胺凝胶电泳,4 对 MSAP 引物除引物 2 外,其余 3 对引物组合泳道均有清晰条带^[14],多态性均较高,表明用改



泳道 1 为高盐 CTAB 提取的成熟子叶 DNA 酶切 (*EcoRI*/*MspI*) 电泳图,泳道 2 为改良高盐 CTAB 提取的成熟子叶 DNA 酶切 (*EcoRI*/*MspI*) 电泳图

图 2 DNA 酶切电泳图

良高盐 CTAB 方法提取的成熟子叶 DNA 可用于 MSAP 分析^[17]。

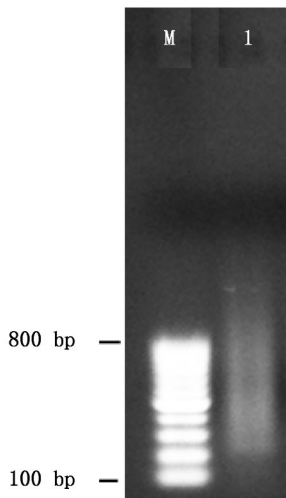


图 3 成熟子叶 DNA 预扩电泳图

3 结论与讨论

我国核桃种质资源丰富^[19],为核桃优良性状的形成规律、进化、生物多样性等相关研究提供了丰富的实验材料,而高质量的 DNA 是进行此类研究的基础。DNA 的提取主要有细胞壁和细胞膜破碎、抽提、沉淀和溶解 4 步^[20]。在提取步骤中,多糖的许多理化性质与核酸相似,用酚仿抽提、选择性沉淀等方法不能有效地去除多糖^[21]。目前,用于提取木本植物基因组 DNA 的方法主要有 CTAB 法、SDS 法和高盐低 pH 值法^[6-7,22]。SDS 法和高盐低 pH 值法得



泳道 1~4 为成熟子叶 DNA 以不同引物组合 (H/M + TTC-E + AAG, H/M + TTC-E + ACA, H/M + TTC-E + ACT, H/M + TTC-E + ACC) 扩增的产物

图 4 成熟子叶 DNA 引物筛选 MSAP 电泳图

到的 DNA 含杂质(糖类及酚类物质)较多,多糖、多酚、色素等会影响酶的活性,对分子生物学下游实验造成不利影响,限制了这 2 种方法在多糖多酚含量高的核桃组织 DNA 提取中的应用。CTAB 法所提 DNA 纯度高、分子量大,目前广泛应用于核桃叶片的 DNA 提取^[6-7,22]。

本研究中 SDS 提取的 DNA 降解较严重、含量低且有多糖等杂质残留,表明其应用于核桃子叶的 DNA 提取还需较大改进;高盐 CTAB 方法提取的 DNA 浓度较高,多糖残留较少,对下游的酶切有一定影响;改良高盐 CTAB 方法提取的 DNA 质量较高,经后续的酶切、扩增和电泳的分析表明,适合进行 MSAP 分析。核桃脂肪酸和蛋白质含量高,酚对蛋白的变性效果优于氯仿,为有效去除这 2 种物质,实验中抽提步骤加入酚/氯仿/异戊醇 (25:24:1),取得较好效果。前人对 DNA 提取过程中去除多糖残留的研究,进行了许多探索,Fang 等^[23]认为,高浓度的 NaCl 有助于去除多糖,Su 等^[24]使用 KAc 结合乙醇提取褐藻 RNA 去除多糖的效果明显,Lopez-Gomez 等^[25]采用加入 0.25 倍体积无水乙醇和 0.11 倍体积的 5 mol KAc 匀浆溶液去除多糖杂质,提取芒果中果皮的 RNA。本研究为彻底去除多糖,采用改良高盐 CTAB 方法并在抽提前加入 30% 终浓度乙醇^[26]和纯化步骤加入终浓度 2 mol 的 NaAc,结果表明,多糖的去除效果较高盐 CTAB 方法的好。

核桃多糖、多酚含量存在较大的组织差异性,子叶是其重要的营养储存器官,脂肪酸、蛋白质和多糖含量较高,本研究中采用酚/氯仿/异戊醇 (25:24:1) 进行抽提,酚是强烈的蛋白质变性剂,能有效去除蛋白质,氯仿有强烈的脂溶性,能有效去除脂类杂质,最后为去除核酸溶液中的残留酚用氯仿/异戊醇

(24:1)抽提1次。子叶经过组织培养后,脂肪酸会逐渐分解为多糖和单糖,同时会产生较多次生代谢物,本研究通过添加 β -巯基乙醇、PVP和 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ 抑制多酚等次生代谢物氧化,降低对DNA质量的影响,取得较好效果。成熟叶片组织的多糖含量较子叶低,脂肪酸和蛋白质含量较低,通过高盐CTAB和改良高盐CTAB均提取到纯度较高的DNA,而同样用高盐CTAB提取的子叶DNA有多糖残留,这与子叶中多糖含量较高有关,表明DNA提取方法的通用性受组织差异的影响,应根据不同组织建立或优化差异性的DNA提取方法,以适应特殊需要。

本研究找到了适合MSAP分析的核桃子叶DNA提取方法,为下游分子生物学实验奠定基础,同时可为其它木本植物DNA提取过程中多糖去除的研究提供参考。

参考文献:

- [1] Zwarts G S D M. Fatty acid content of New Zealand-grown walnuts (*Juglans regia* L.) [J]. International Journal of Food Sciences and Nutrition, 1999, 50(3): 189 - 194
- [2] 王清民. 核桃不定根发生调控的组织和免疫化学研究[D]. 北京:中国林业科学研究院,2007
- [3] 裴东,袁丽钗,谷瑞升,等. 核桃子叶不定根发生调控的研究[J]. 林业科学,2003, 39(6): 33 - 39
- [4] Noyer J L, Causse S, Tomekpe K, et al. A new image of plantain diversity assessed by SSR, AFLP and MSAP markers[J]. Genetica, 2005, 124(1): 61 - 69
- [5] Kaufman B, Richards S, Dierig D A. DNA isolation method for high polysaccharide *Lesquerella* species [J]. Industrial Crops and Products, 1999, 9(2): 111 - 114
- [6] 雷玲,王红霞,张志华,等. 河北核桃叶片DNA提取方法的比较[J]. 华北农学报,2010, 25(2): 145 - 148
- [7] 常月梅. 核桃总DNA提取方法研究[J]. 经济林研究,2005, 23(3): 34 - 35
- [8] 周贝贝,张俊佩,王伟,等. Fe^{3+} 浓度对核桃成熟子叶离体生根培养的影响[J]. 经济林研究,2011, 29(1): 124 - 127
- [9] Driver R, Child D, Gott R, et al. Science in Schools at age 15: Report No: 2 Report to the DES, DENI, and the Welsh Office on the 1981 survey of 15 year olds[M]. Great Britain: Welsh Office Dept of Education and Science, 1984
- [10] Goldenberger D, Perschil I, Ritzler M, et al. A simple "universal" DNA extraction procedure using SDS and proteinase K is compatible with direct PCR amplification. [J]. Genome Research, 1995, 4(6): 368 - 370
- [11] Rohland N, Hofreiter M. Comparison and optimization of ancient DNA extraction [J]. Biotechniques, 2007, 42(3): 343 - 352
- [12] Aljanabi S M, Martinez I. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques [J]. Nucleic acids research, 1997, 25(22): 4692 - 4693
- [13] Souza H, Muller L, Brandão R L, et al. Isolation of high quality and polysaccharide-free DNA from leaves of *Dimorphandra mollis* (Leguminosae), a tree from the Brazilian Cerrado [J]. Genetics and Molecular Research, 2012, 11(1): 756 - 764
- [14] Zhang M, Xu C, von Wettstein D, et al. Tissue-specific differences in cytosine methylation and their association with differential gene expression in sorghum [J]. Plant physiology, 2011, 156(4): 1955 - 1966
- [15] Portis E, Acquadro A, Comino C, et al. Analysis of DNA methylation during germination of pepper (*Capsicum annuum* L.) seeds using methylation-sensitive amplification polymorphism (MSAP) [J]. Plant Science, 2004, 166(1): 169 - 178
- [16] Peraza-Echeverria S, Herrera-Valencia V A, Kay A J. Detection of DNA methylation changes in micropropagated banana plants using methylation-sensitive amplification polymorphism (MSAP) [J]. Plant Science, 2001, 161(2): 359 - 367
- [17] Zhang M, Xu C, Yan H, et al. Limited tissue culture-induced mutations and linked epigenetic modifications in F1 hybrids of *Sorghum* pure lines are accompanied by increased transcription of DNA methyltransferases and 5-methylcytosine glycosylases [J]. The Plant Journal, 2009, 57(4): 666 - 679
- [18] Long L, Lin X, Zhai J, et al. Heritable alteration in DNA methylation pattern occurred specifically at mobile elements in rice plants following hydrostatic pressurization [J]. Biochemical and biophysical research communications, 2006, 340(2): 369 - 376
- [19] Ma Q, Zhang J, Pei D. Genetic Analysis of Walnut Cultivars in China Using Fluorescent Amplified Fragment Length Polymorphism [J]. Journal of the American Society for Horticultural Science, 2011, 136(6): 422 - 428
- [20] 陈庆山,刘春燕,吕东,等. 大豆DNA提取基本原理的探讨[J]. 东北农业大学学报,2004, 35(2): 254 - 256
- [21] Porebski S, Bailey L G, Baum B R. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components [J]. Plant Molecular Biology Reporter, 1997, 15(1): 8 - 15
- [22] 张丽,黄学琴,吴全忠,等. 黑核桃叶片基因组DNA提取方法比较研究[J]. 中国农学通报,2011, 27(28): 125 - 129
- [23] Fang G, Hammar S, Grumet R. A quick and inexpensive method for removing polysaccharides from plant genomic DNA. [J]. Biotechniques, 1992, 13(1): 52 - 56
- [24] Su X, Gibor A. A method for RNA isolation from marine macroalgae [J]. Analytical biochemistry, 1988, 174(2): 650 - 657
- [25] Lopez-Gomez R, Gomez-Lim M A. A method for extracting intact RNA from fruits rich in polysaccharides using ripe mango mesocarp [J]. HortScience, 1992, 27(5): 440 - 442
- [26] 詹亚光,曾凡锁. 富含多糖的白桦成熟叶片DNA的提取方法[J]. 东北林业大学学报,2005, 33(3): 24 - 25