

小麦叶绿体 DNA 提取方法研究

侯典云¹, 马占强¹, 徐虹², 郭蔼光²

(1. 河南科技大学 农学院, 河南 洛阳 471003; 2. 西北农林科技大学 生命科学学院, 陕西 杨凌 712100)

摘要: 以成熟的中国春小麦叶片为材料, 采用改进的高盐-低 pH 方法提取叶绿体 DNA, 经琼脂糖凝胶电泳和 PCR 扩增, 结果表明: 所提取的小麦叶绿体 DNA 纯度高 ($OD_{260/280} = 1.89$, $OD_{260/230} = 2.23$), 适于 PCR 反应、基因扩增和酶切鉴定等分子操作, 为深入研究小麦叶绿体基因组奠定了基础。

关键词: 小麦; 叶绿体 DNA; 提取方法; 高盐-低 pH 法

中图分类号: S512.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-3268(2011)10-0038-03

Study on Extraction Method of Wheat Chloroplast DNA

HOU Dian yun¹, MA Zhan qiang¹, XU Hong², GUO Ai guang²

(1. College of Agriculture, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003, China;

2. College of Life Sciences, Northwest A&F University, Yangling 712100, China)

Abstract: An improved high salt low-pH method was used to extract chloroplast DNA from leaf tissues of wheat cultivar Chinese spring. The agarose gel electrophoresis and PCR amplification showed that wheat chloroplast DNA of high purity ($OD_{260/280} = 1.89$, $OD_{260/230} = 2.23$) was obtained. The DNA was suitable to be used as template in PCR, gene amplification and enzyme digestion.

Key words: Wheat; Chloroplast DNA; Extraction method; High salt low-pH method

叶绿体是植物细胞中与光合作用直接相关的细胞器。作为半自主性细胞器, 它的形成是叶绿体基因组和核基因组相互作用的结果^[1], 也是植物细胞质遗传的重要单位, 在植物系统发育中具有广泛的作用^[2], 由于其特殊优势, 目前叶绿体 DNA 已在分子标记^[3]、核质互作和植物基因工程^[4]等研究中得到了广泛应用。提取高等植物叶绿体 DNA 常用的方法主要有蔗糖密度梯度离心法^[5]、DNase I 法^[6]和高盐-低 pH 法^[7]等。目前这些方法虽已在水稻^[8]、白菜^[9]等叶绿体 DNA 提取中得到了应用, 但小麦的叶绿体 DNA 提取至今没有十分有效的方法。本研究在改进 Gong 等^[10]方法的基础上, 对小麦叶绿体 DNA 提取技术进一步优化, 以期获得高纯度、高质量的小麦叶绿体 DNA, 为小麦叶绿体基因组研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 植物材料

供试材料为小麦品种中国春的叶片。

1.2 试剂和缓冲液

蛋白酶 K、Tris 饱和酚 (pH 8.0) 为北京鼎国公司产品, 氯仿、异戊醇、无水乙醇、醋酸铵等其他常规试剂均为国产分析纯。

提取缓冲液 A (pH 3.6): Tris-HCl 45 mmol/L, NaCl 1.25 mol/L, Vc 0.25 mol/L, EDTA 20 mmol/L; 提取缓冲液 B (pH 8.0): EDTA 25 mmol/L, β -巯基乙醇 10 mmol/L, Tris-HCl 45 mmol/L; 提取缓冲液 C (pH 8.0): NaCl 150 mmol/L, EDTA 80 mmol/L; 提取缓冲液 D (pH 8.0): Tris-HCl 50 mmol/L, EDTA 20 mmol/L。

收稿日期: 2011-03-06

基金项目: 教育部新世纪优秀人才支持计划 (02240601); 河南科技大学人才科学研究基金 (09001428); 河南科技大学青年科学基金 (2010QN0004); 河南科技大学实验技术开发基金项目 (SY1011043)

作者简介: 侯典云 (1975), 男, 河南濮阳人, 博士, 主要从事生化与分子生物学教学与研究工作。E-mail: dianyun518@163.com

©1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1.3 叶绿体的分离及检测

叶绿体分离采用高盐-低 pH 的方法,参照欧立军等^[8]和 Gong 等^[10]的方法并进行改进。取新鲜成熟的小麦叶片 10 g, 4℃ 黑暗饥饿 12 h, 用蒸馏水冲洗干净, 吸干水分, 去中脉, 剪碎放入匀浆器缸中, 加入预冷提取缓冲液 A 40 mL 高速匀浆, 用 2~3 层 74 μm 孔径的尼龙网过滤, 滤液装入预冷的 50 mL 离心管中, 静置 2 min, 4℃、1500 × g 离心 6 min, 弃上清, 沉淀中加入提取缓冲液 B 20 mL, 悬浮沉淀, 4℃、800 × g 离心 6 min, 倒掉上清, 沉淀用提取缓冲液 C 3 mL 悬浮, 4℃、800 × g 离心 6 min, 弃上清, 沉淀即为粗提叶绿体。用荧光显微镜检测叶绿体的完整性。

1.4 叶绿体 DNA 的提取与纯化

粗提叶绿体用 1.6 mL 提取缓冲液 D 悬浮、混匀, 加 10% SDS 至终质量分数为 2%, 加蛋白酶 K (5 mg/mL) 30 μL 至终质量浓度为 50 μg/μL, 37℃ 水浴 3~4 h, 加入 0.3 mol/L Tris 饱和酚 (pH 8.0) 3 mL 抽提 2 次, 每次 4℃ 11000 × g 离心 15 min, 吸取上清到新的离心管, 加与上清等体积的酚/氯仿/异戊醇 (25:24:1) 抽提 2 次, 每次 4℃ 11000 × g 离心 15 min, 转移上清至预冷的离心管, 加 1/2 体积的 7.5 mol/L 醋酸铵, 3 倍体积预冷的无水乙醇, 充分混匀后放入 -40℃ 冰箱沉淀 30 min, 4℃、11000 × g 离心 15 min, 弃去上清, 沉淀用 70% 的冷乙醇洗 2 遍, 自然风干, 加 50 μL TE Buffer (pH 8.0) 溶解后备用。

1.5 叶绿体 DNA 检测

1.5.1 叶绿体 DNA 含量测定 取 2 μL TE Buffer 溶解的叶绿体 DNA 原液, 再补加 TE Buffer 至 200 μL (稀释 100 倍), 用 Eppendorf 蛋白核酸测定仪测核酸含量, 记录 OD_{260/280}、OD_{260/230} 及质量浓度。

1.5.2 凝胶电泳检测 采用 1.0% 的琼脂糖凝胶, 0.5 × TAE 电泳缓冲液, 90 V × 60 mA 电泳 30 min, 设置 1 μL、2 μL 样品上样量, 利用凝胶成像系统观察结果并照相。

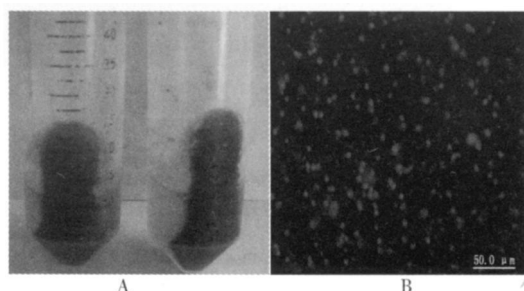
1.5.3 PCR 扩增检测 根据小麦品种中国春叶绿体 DNA^[11] 的 2 个基因 *psbD* 和 *psbC* 序列, 利用 Primer 5.0 软件分别设计特异性引物扩增 2 个基因的部分片段, 并进行电泳检测。D F: 5'-GGAGTCTTGAATAATGCTG 3'; D R: 5'-CAACCTTCCAAATAGGAAGT 3'; G F: 5'-GTG-GCCCATTTTCGTACCAG 3'; G R: 5'-CAGGTTG-CAATCAGCATG 3'。

PCR 反应体系为 25 μL: 10 × LA Buffer 2.5 μL, dNTP 2.5 μL, 正向、反向引物各 1 μL (10 μmol/L), LA Taq 0.3 μL (5 U/μL), 模板 50 ng, 加 ddH₂O 补足为 25 μL。PCR 反应程序为: 95.0℃ 预变性 2 min; 94.0℃ 变性 35 s, 50.0℃ 退火 40 s, 72.0℃ 延伸 1 min, 30 个循环; 最后 72℃ 延伸 3 min。

2 结果与分析

2.1 小麦叶绿体完整性检测结果

采用改进的高盐-低 pH 方法, 得到了小麦叶绿体。图 1 显示, 得到的叶绿体含量高, 数目多, 结构完整, 基本无破碎, 无污染, 背景清晰, 为获得高质量的叶绿体 DNA 奠定了基础。



A. 提取的小麦叶绿体; B. 小麦叶绿体显微图片

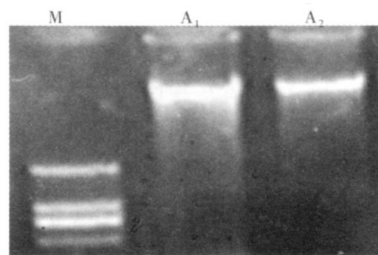
图 1 小麦叶绿体完整性检测结果

2.2 小麦叶绿体 DNA 含量测定结果

将提取的叶绿体 DNA 原液稀释 100 倍后用蛋白核酸测定仪测定, 结果待测液质量浓度为 16 ng/μL, 即原液质量浓度为 1600 ng/μL, OD_{260/280} 为 1.89, 介于 1.8~2.0, 说明所提取的叶绿体 DNA 纯度较高, 没有蛋白质的污染。OD_{260/230} 为 2.23, 说明基本不存在多糖、碳水化合物等的污染。

2.3 小麦叶绿体 DNA 电泳检测结果

采用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测结果表明 (图 2), 所提取的叶绿体 DNA 条带清晰, 无拖尾, 无明显的降解现象发生, 完全能够满足基因克隆及酶切等分析的需要。

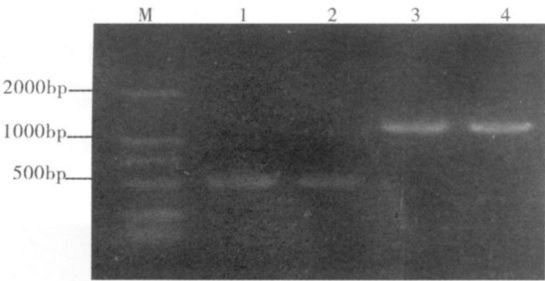


M. DL2000 Marker, 上样量 4 μL; A₁. 小麦叶绿体 DNA, 上样量 2 μL; A₂. 小麦叶绿体 DNA, 上样量 1 μL

图 2 小麦叶绿体 DNA 电泳检测结果

2.4 小麦叶绿体 DNA 的 PCR 检测结果

以提取的小麦叶绿体 DNA 为模板,设计特异引物,扩增叶绿体编码的 *psbD* 和 *psbC* 基因的部分序列,PCR 结果(图 3)显示,利用改进后的方法所提取的小麦叶绿体 DNA 作模板,可以扩增出清晰、亮度高的单一条带,且片段大小与预期相符。说明提取的叶绿体 DNA 质量浓度高,质量可以得到保证,完全能用于后续分子操作。



M. Marker DL2000; 1、2. *psbD* 基因部分序列;
3、4. *psbC* 基因部分序列

图 3 小麦叶绿体 DNA 的 PCR 扩增结果

3 讨论

相对于核基因组 DNA 的提取,叶绿体 DNA 的提取有很多困难,首先必须得到完整的叶绿体,在这个过程中,可能存在的核 DNA 污染、线粒体 DNA 污染以及叶绿体的完整性等问题,这些都是制约叶绿体 DNA 提取的关键因素。经过努力,目前已经掌握了一些植物叶绿体 DNA 的提取方法,如史公军等^[9]、金双侠等^[12]分别成功提取了白菜和棉花的叶绿体 DNA,为叶绿体的深入研究奠定了基础。本研究采用改进的高盐-低 pH 方法,把去核的离心速度提高为 $1\,500\times g$ 离心 6 min,以便获得尽可能多的叶绿体,经一系列检测证明,既保证了叶绿体 DNA 的得率,又保证去除核 DNA 的影响。提取之前,把新鲜叶片黑暗饥饿 12 h,目的是为了叶片消化组织中的淀粉,以减少糖类物质对 DNA 分离纯化的干扰,这与相关文献报道一致^[8, 13]。

参考文献:

[1] 刘良式. 植物分子遗传学[M]. 北京: 科学出版社, 2003.

[2] 刘志文, 韩旭, 李莉, 等. 叶绿体和线粒体 DNA 在植物系统发育中的应用进展[J]. 河南农业科学, 2008(7): 5 7.

[3] Nishika Wa T, Vaughan D A, Kadowaki K. Phylogenetic analysis of *Oryza* species, based on simple sequence repeats and their flanking nucleotide sequences from the mitochondrial and chloroplast genomes[J]. Theor Appl Genet, 2005, 110: 696 705.

[4] Lelivelt C L, McCabe M S, Newell C A, et al. Stable plastid transformation in lettuce (*Lactuca sativa* L.) [J]. Plant Molecular Biology, 2005, 58(6): 763 774.

[5] Hirai A, Ichika W H, Lwatsuki N, et al. Rice chloroplast DNA: a physical map and the location of the genes for the large subunit of ribulose 1, 5 bisphosphate carboxylase and the 32 kD photosystem II reaction center protein[J]. Theor Appl Genet, 1985, 70: 117 122.

[6] Hermann R G. Methods in chloroplast molecular biology[M]. New York: Elsevier Amsterdam, 1982.

[7] Bookians G. Preparation of chloroplast DNA from pea plastids isolation in a medium of high ionic strength [J]. Anal Biochem, 1984, 141: 244 247.

[8] 欧立军, 黄光文, 王京京, 等. 水稻叶绿体 DNA 提取和纯化方法优化[J]. 湖南师范大学自然科学学报, 2006, 29(1): 92 94.

[9] 史公军, 侯喜林, 王彦华. 白菜叶绿体 DNA 快速提取及分析[J]. 应用与环境生物学报, 2005, 11(3): 283 285.

[10] Gong X S, Yan L F. Improved procedure for purification of chloroplast DNA in higher plants[J]. Chin Sci Bull, 1991, 6: 467 469.

[11] Ogihara Y, Isono K, Kojima T, et al. Chinese spring wheat (*Triticum aestivum* L.) chloroplast genome: complete sequence and contig clones[J]. Plant Molecular Biology Reporter, 2000, 18(3): 243 253.

[12] 金双侠, 韩杰, 刘小云, 等. SDS 蛋白酶法分离棉花 cpDNA 及 *psbA* 基因启动子、终止子克隆[J]. 分子植物育种, 2007, 5(5): 683 689.

[13] 赵卫国, 赵巧玲, 张志芳, 等. 桑树叶绿体基因组 DNA 的提取及部分序列分析[J]. 蚕业科学, 2001, 27(4): 303 305.