

泡桐叶绿体游离及其 DNA 提取方法的筛选

王 杨¹, 韩同丽¹, 刘荣宁^{1,2}, 范国强^{1*}

(1. 河南农业大学 泡桐研究所, 河南 郑州 450002; 2. 河南农业职业学院, 河南 中牟 451450)

摘要: 为了深入研究泡桐叶绿体基因组以白花泡桐组织培养苗为材料, 利用蔗糖密度梯度离心法、差速离心法和高盐低 pH 值法 3 种叶绿体游离方法提取叶绿体 DNA, 其质量浓度分别为 92.1、968.9、175.9 ng/ μ L。经显微镜观察、凝胶琼脂糖电泳检测, 结果表明, 先差速离心提取粗叶绿体, 再用蔗糖密度梯度法对其进行纯化, 然后使用 SDS 法提取所得的叶绿体 DNA 纯度较高, 此方法可用于叶绿体基因组的研究。

关键词: 泡桐; 叶绿体 DNA; 提取; 筛选

中图分类号: S792.43 文献标志码: A 文章编号: 1004-3268(2013)10-0126-04

Screening on Extraction Method of *Paulownia* Chloroplast DNA

WANG Yang¹, HAN Tong-li¹, LIU Rong-ning^{1,2}, FAN Guo-qiang^{1*}

(1. Paulownia Institute Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China;
2. Henan Vocational College of Agriculture, Zhongmu 451450, China)

Abstract: To further study the *Paulownia* chloroplast genome, the *Paulownia fortunei* seedlings derived from tissue culture were used as test material to extract the chloroplast DNA by three methods: sucrose density gradient centrifugation, differential centrifugation and high-salt low-pH method, the mass concentration of which was 92.1 ng/ μ L, 968.9 ng/ μ L and 175.9 ng/ μ L respectively. The results of microscopic observation and agar gel electrophoresis indicated that the best method to obtain the pure cpDNA was to extract the gross chloroplast firstly by differential centrifugation, then purify the gross chloroplast by sucrose density gradient centrifugation, and finally get pure cpDNA by SDS method, which could meet the requirements of chloroplast genome research.

Key words: *Paulownia*; chloroplast DNA; extraction; screening

叶绿体是绿色植物进行光合作用的细胞器, 因其遗传物质(chloroplast DNA, cpDNA)保守性强^[1], 故研究其碱基组成和结构变化对揭示物种起源、进化演变及物种间亲缘关系等具有重要作用^[2]。自 Ris 等^[3]证实衣藻叶绿体中存在 DNA 后, cpDNA 已成为植物分子遗传学研究的一个重要方面^[4]。目前, 虽然世界范围内已有 193 个种子植物的叶绿体全基因组测序完成, 但这些研究主要集中在一年生草本植物上^[5-8], 有关林木叶绿

体基因组研究的报道较少^[9-11]。泡桐(*Paulownia* spp.)是中国重要的速生用材和庭院绿化树种之一, 在生态环境改善和提高农民生活水平等方面起着重要的作用。过去, 科技工作者利用不同方法开展过从泡桐叶片中提取叶绿体 DNA 的研究^[12-14], 但所得到的 cpDNA 不能满足其基因组测序的要求, 影响了泡桐基因工程和分子生物学的深入研究。为了得到能够满足测序要求的高纯度泡桐 cpDNA, 本研究以白花泡桐(*Paulownia for-*

收稿日期: 2013-09-01

基金项目: 郑州市科技创新团队项目

作者简介: 王 杨(1987-), 女, 河南洛阳人, 在读硕士研究生, 研究方向: 泡桐生物技术。

* 通讯作者: 范国强(1964-), 男, 河南禹州人, 教授, 博士, 主要从事泡桐生物技术研究。E-mail: gqfan@henau.edu.cn

tunei)为材料,拟筛选高质量 cpDNA 提取及纯化方法,旨在为深化泡桐叶绿体基因组研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 试验材料

2012 年 5 月初,在河南农业大学三区采集白花泡桐一年生枝条前端 3~5 对幼叶,用自来水冲洗后,再用蒸馏水冲洗 2 遍,用吸水纸除去叶片表面多余的水,保存于 -86°C 低温冰箱中备用。

1.2 试验方法

1.2.1 泡桐叶绿体的游离 ①高盐低 pH 值法 取上述泡桐叶片 50 g,去中脉后加入缓冲液 A(50 mmol/L Tris, 25 mmol/L EDTA, 1.25 mol/L NaCl, 0.25 mol/L 抗坏血酸, 15 g/L PVP, pH 值 3.6)于 19 000 r/min 在高速分散匀质机(FJ200-SH)中匀浆 2 次,每次 2 min,匀浆液经 6 层纱布过滤完毕后挤出残留的液体,再用 6 层纱布过滤,将滤液分装于 50 mL 离心管中,1 000 g 离心 20 min 后取上清,3 000 g 离心 6 min,弃上清,在离心管中加入 20 mL 缓冲液 B(50 mmol/L Tris, 25 mmol/L EDTA, 1.25 mol/L NaCl, 10 mmol/L β -巯基乙醇, 0.2% BSA, 10 g/L PVP, pH 值 8.0),悬浮沉淀,3 000 g 离心 6 min 后,在沉淀中加入 6 mL 缓冲液 C(150 mmol/L NaCl, 100 mmol/L EDTA, 10 g/L PVP, pH 值 8.0),悬浮沉淀,3 000 g 离心 6 min,所得沉淀即为叶绿体粗提物,用 5 mL 缓冲液 C 悬浮。②差速离心法 取泡桐叶片 100 g 洗净,加入 5 倍体积的缓冲液 D(0.35 mol/L 山梨糖醇, 50 mmol/L Hepes, 2 mmol/L EDTA, 1 mmol/L MgCl_2 , 1 mmol/L MnCl_2 , 0.1% 抗坏血酸, 10 g/L PVP, pH 值 8.0),滤液收集方法与高盐低 pH 值法相同。将收集的滤液分装于 50 mL 离心管中,50 g 离心 10 min,取上层悬液于 2 000 g 离心 10 min,所得沉淀即为叶绿体粗提物,平均分为 2 份,1 份加入 5 mL 缓冲液悬浮,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用,另 1 份则用 2 mL 缓冲液悬浮,保存。③蔗糖密度梯度离心法 取 2 mL 差速离心得到的叶绿体粗提液加到自上而下蔗糖浓度(用 0.35 mol/L 山梨糖醇、50 mmol/L Hepes 配制)为 30%、45% 和 60%(V1:V2:V3=1:1:1)的液面上,用超高速离心机 20 000 g 水平离心 1 h,分层,用注射器抽取

在 45%~60% 蔗糖界面上的绿色区,即为叶绿体,加入 2 倍体积缓冲液洗脱蔗糖,2 000 g 离心 10 min,取沉淀,并用 5 mL 缓冲液 D 悬浮。以上 3 种方法的操作均在 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下进行。

1.2.2 叶绿体纯化 将 3 种方法游离出的叶绿体悬浮液各 5 mL,分别加入 100 μL 0.25 mg/mL DNase I 和 40 μL 1 mmol/L MgCl_2 ,混合均匀;37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下温浴 20 min,不时颠倒摇晃;加入 8.8 mL 0.38 mol/L EDTA-2Na,使终浓度达到 0.2 mol/L,终止酶解;加缓冲液冲洗,4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下,2 000 g 离心 20 min,沉淀即为纯化的叶绿体;置普通显微镜 400 倍下观察叶绿体形态大小,于 Nikon eclipse Ti-s 荧光显微镜(蓝光激发状态)下观察叶绿体自发光并照像。

1.2.3 cpDNA 提取及纯化 在上述 3 种方法获得的叶绿体沉淀中加入 9 mL 缓冲液 D 和 0.5 mL 10% SDS、0.005 g 蛋白酶 K,37 $^{\circ}\text{C}$ 温浴 3 h,不时振荡;加等体积饱和酚,颠倒混匀,4 $^{\circ}\text{C}$ 下放置 15 min,12 000 g 离心 10 min;取上清加酚:氯仿:异戊醇(25:24:1),颠倒混匀,12 000 g 离心 10 min;吸取上清加氯仿:异戊醇(24:1),颠倒混匀,12 000 g 离心 10 min;取上清并加入 1/10 体积 3 mol/L NaAc,不断轻轻摇动,再加等体积的无水乙醇, -20°C 放置过夜,12 000 g 离心 15 min;弃上清,70%乙醇洗 2 次,无水乙醇洗 1 次,挥干乙醇;加 300 μL TE 溶解 cpDNA。

1.2.4 cpDNA 纯度检测 使用 Nano Drop 2000 微量分光光度计测定 cpDNA 的 A260/A230 和 A260/A280 值,从而确定 cpDNA 的纯度和得率。取 cpDNA 10 μL ,使用 1.0%的琼脂糖凝胶电泳 30 min。电泳结束后,用凝胶成像系统观察电泳结果并照像。

2 结果与分析

2.1 泡桐叶绿体的游离

观察表明,3 种游离方法得到的泡桐叶绿体中,高盐低 pH 值法所得的叶绿体完整性较好,但混有的组织碎片较多(图 1);差速离心法得到的叶绿体中混有较大的细胞碎片,纯度较低(图 2);蔗糖密度梯度离心法,由于其叶绿体与其他细胞器的沉降系数不同,超速离心后形成 3 个区带(图 3a),蔗糖体积分数 45%~60%界面上的细胞器为叶绿体,其完整性较好,纯度较高(图 3b、c)。因此,蔗糖密度梯度离心法是为理想的游离叶绿体的方法。

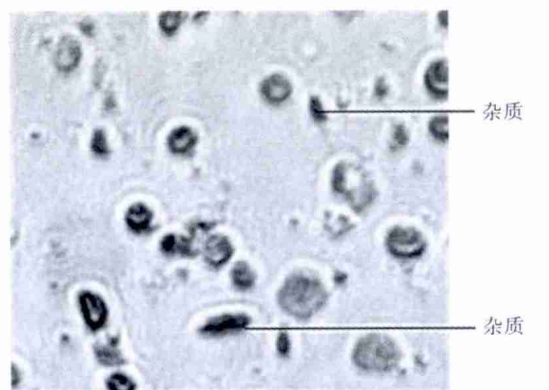


图 1 高盐低 pH 值法得到的叶绿体

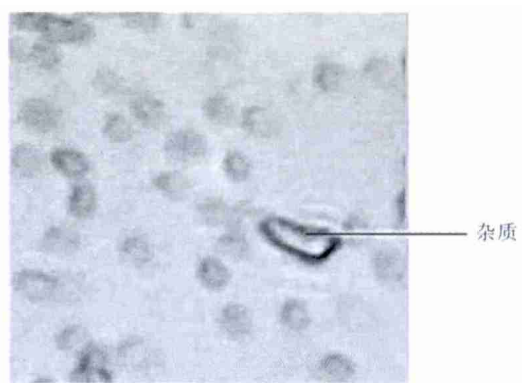
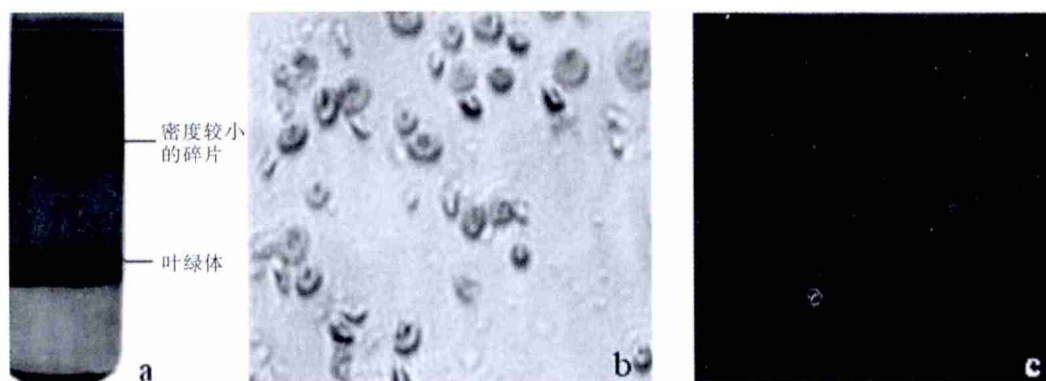


图 2 差速离心法得到的叶绿体



a. 离心后分层; b. 普通显微镜观察; c. 荧光显微镜观察

图 3 蔗糖密度梯度离心法获得的叶绿体

2.2 泡桐 cpDNA 的检测

由 cpDNA 电泳结果(图 4)可以看出, 3 种方法所得到的 cpDNA 片段均在 5 000 bp 以上, 但不同方法所得 DNA 质量有明显差异, 高盐低 pH 值法与差速离心法所得 cpDNA 都存在明显的拖带, 蔗糖密度梯度离心法所得 cpDNA 条带整齐清晰、完整。此外, 3 种方法得到的 cpDNA 的 A260/A280

都在 1.71~1.87, 说明蛋白质和 RNA 的污染较少; 高盐低 pH 值法和差速离心法的 A260/A230 都小于 2, 说明样品被糖类和盐类污染, 而蔗糖密度梯度离心法的 A260/A230 大于 2, 表明利用该方法得到的 cpDNA 中糖类和盐类物质杂质含量低(表 1)。

综合 3 种方法所得到的 cpDNA 的 A260/A280 和 A260/A230 值以及 cpDNA 电泳结果, 认为蔗糖密度梯度离心法分离得到的 cpDNA 纯度高, 分子量大, 可用于叶绿体基因组测序分析。

表 1 不同方法所得 cpDNA 的紫外分光光度计检测结果

方法	A260/A230	A260/A280	cpDNA 质量浓度/ (ng/ μ L)	cpDNA 含量/ (μ g/g)
高盐低 pH 值法	0.77	1.87	175.9	1.055 4
差速离心法	1.03	1.86	968.9	5.813 4
蔗糖密度梯度离心法	2.13	1.71	92.1	0.552 6

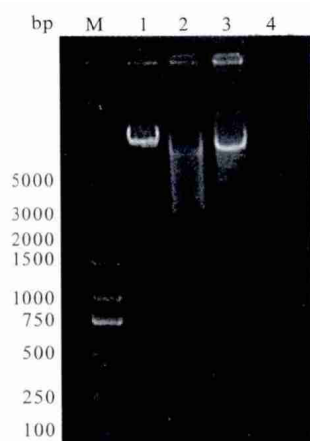
M DNA Maker; 1. 总 DNA 5 μ L; 2. 高盐低 pH 值法; 3. 差速离心法; 4. 蔗糖密度梯度离心法

图 4 不同方法所得叶绿体 DNA 的凝胶琼脂糖电泳

3 结论与讨论

本试验利用 3 种方法游离叶绿体并提取了 cpDNA, 通过紫外分光光度计和琼脂凝胶糖电泳检测结果可以看出, 蔗糖密度梯度离心法游离叶绿体效

果较好。该方法首先采用差速离心分离粗提叶绿体,使沉降系数不同的颗粒在不同的分离速度和时间下分批分离,即低速离心沉淀细胞核和其他较大细胞碎片,所得上清再通过高速离心得到粗叶绿体沉淀,并结合蔗糖密度梯度,用蔗糖在离心管内形成不连续的密度梯度,将粗提的叶绿体置于顶部,通过离心力场的作用使细胞器分层、分离,就可以进一步除去细胞核、线粒体及细胞碎片,获得较高纯度的叶绿体。根据叶绿体为椭圆或球形颗粒及自发红色荧光的特征^[15],用显微镜观察叶绿体纯度和完整性,发现此方法获得的叶绿体纯度高、效果好。为了排除核 DNA 对后续试验产生的影响,在纯化叶绿体时还进行了 DNA 酶处理,电泳结果表明,无核 DNA 的污染,获得的叶绿体 DNA 纯度高且无降解,为今后叶绿体基因组的研究奠定了基础。

参考文献:

- [1] 赵卫国,赵巧玲,张志芳. 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.
- [2] 崔翠菊. 叶绿体基因工程与植物细胞器基因组进化研究[D]. 武汉:华中科技大学,2010.
- [3] Ris H,Plaut W. Ultrastructure of DNA-containing areas in the chloroplast of *Chlamydomonas*[J]. The Journal of Cell Biology,1962,13(3):383-391.
- [4] 王 玲,董文攀,周世良. 被子植物叶绿体基因组的结构变异研究进展[J]. 西北植物学报,2012,32(6):1282-1288.
- [5] 胡志刚. 菊科药用植物 DNA 条形码及叶绿体基因组研究[D]. 武汉:湖北中医药大学,2012.
- [6] Liu J,Qi Z C,Zhao Y P,*et al.* Complete cpDNA genome sequence of *Smilax china* and phylogenetic placement of Liliales-influences of gene partitions and taxon sampling[J]. Molecular Phylogenetics and Evolution,2012,64(4):545-562.
- [7] Yi D K,Kim K J. Complete chloroplast genome sequences of important oilseed crop *Sesamum indicum* L. [J]. PLoS One,2012,7(5):58-72.
- [8] 全志武. 莲叶绿体基因组图谱的构建及其系统进化分析[D]. 武汉:武汉大学,2011.
- [9] 李西支,高欢欢,王一涛,等. 荷花玉兰叶绿体全基因组高通量测序及结构解析[J]. 中国科学:生命科学,2013,42(12):947-956.
- [10] 李西文,胡志刚,林小涵,等. 基于 454 FLX 高通量技术的厚朴叶绿体全基因组测序及应用研究[J]. 药学报,2012,47(1):124-130.
- [11] Yang M,Zhang X,Liu G,*et al.* The complete chloroplast genome sequence of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) [J]. PLoS One,2010,5(9):57-62.
- [12] 李冠一,林栖凤,李君庆. 泡桐叶绿体 DNA 的分离纯化与电镜观察[J]. 海南大学学报:自然科学版,1990,8(3):9-12.
- [13] Wang W Y,Pai R C,Lai C C,*et al.* Molecular evidence for the hybrid origin of *Paulownia taiwaniana* based on RAPD markers and RFLP of chloroplast DNA[J]. Theoretical and Applied Genetics,1994,89(2):271-275.
- [14] 马 浩,张冬梅,李荣幸. 泡桐属植物种类的 RFLP 分析[J]. 植物研究,2001,21(1):136-139.
- [15] 孙晓荣,易鼎杰,何 桥,等. 三倍体枇杷叶绿体 DNA 提取方法的优化[J]. 西南师范大学学报:自然科学版,2012,37(2):93-96.