

# 猕猴桃基因组 DNA 提取的研究

林智华, 林程忠, 梁红, 周玲艳\* (仲恺农业工程学院生命科学学院, 广东广州 510225)

**摘要** [目的] 探讨猕猴桃属基因组总 DNA 的提取方法。[方法] 以富含多糖和多酚次生代谢产物的猕猴桃为材料, 比较不同品种在不同方法下的基因组 DNA 抽提效果, 并对不同材料部位、抗氧化剂以及 DNA 纯化方法等对基因组 DNA 的获得进行研究。[结论] 结果表明, 以猕猴桃组培苗的茎部为材料, 通过 CTAB 法, 在裂解液中加入 1% - 巯基乙醇, 以及在异丙醇沉淀前加入 1/2 体积的 5 mol/L NaCl, 所得到的猕猴桃基因组 DNA 的质量较佳。[结论] 该研究为今后猕猴桃分子生物学和基因工程研究奠定基础。

**关键词** 猕猴桃; 基因组 DNA; 抽提

中图分类号 S663.4 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2009)03-0096-03

## Study on Extraction of Actinidia Genomic DNA

LIN Zhi-hua et al (College of Life Sciences, Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou, Guangdong 510225)

**Abstract** [Objective] The purpose of research aimed to discuss a method of extracting the total genomic DNA from Actinidia. [Method] With Actinidia which is abundant in secondary metabolites of polysaccharide and polyphenol as materials, the extraction effect of different variety and method on the genomic DNA of Actinidia was compared with, and influence of the different part of tissue culture, antioxidant and the method of DNA purification on the yield of genomic DNA was studied. [Result] The results indicated that the high quantity of genomic DNA was acquired when the stem of tissue culture plants was used as the material, and CTAB method was used, adding 1% - Mercaptoethanol into the extraction buffer, and 1/2 volume of 5 mol/L NaCl was added before the precipitation of isopropyl alcohol. [Conclusion] This study will establish basis for molecule biology and gene engineering of Actinidia in future research.

**Key words** Actinidia; Genome DNA; Extraction

猕猴桃属猕猴桃科、猕猴桃属, 为多年生藤本落叶植物。在猕猴桃属中, 全世界共有 66 个种, 我国有 59 种、43 个变种、7 个变型, 占全世界总种数的 93.7%<sup>[1]</sup>。由于自然群体杂交的结果, 猕猴桃属存在较大的遗传分化和种间类型, 遗传多样性高, 传统分类法往往难以鉴定。从分子水平探讨猕猴桃自然群体的遗传结构与品种鉴定, 可为猕猴桃的遗传多样性研究及传统的形态分类提供重要补充和支持。提取高质量的双链 DNA 是进行分子生物学研究的关键步骤, 同时也是对植物遗传转化后的再生植株和后代进行分子鉴定的前提。猕猴桃叶片中含有的次生代谢物质复杂, 从猕猴桃叶片中提取高质量的 DNA 难度较大。因此, 笔者以富含多糖和多酚等次生代谢产物的猕猴桃为试材寻求一种高效的猕猴桃属总 DNA 提取方法, 以为今后进行猕猴桃分子生物学和基因工程研究奠定基础。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 磨山 4 号、武雄、米良、姜丽、武植、两广、徐香和红阳 8 种猕猴桃。

## 1.2 方法

**1.2.1 DNA 提取方法。** 方法 1: CTAB 和 SDS 常规法参考文献[2] 进行; 方法 2: 在方法 1 的基础上改变裂解液中 - 巯基乙醇的浓度条件, 使其分别为 1% 和 2%; 方法 3: 基本步骤同方法 1, 但在加入异丙醇沉淀 DNA 之前分别加入上清液 1/2 V 的 5 mol/L NaCl、1/5 V 的 1 mol/L Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 和等体积无水乙醚; 方法 4: 抽提方法同方法 1, 但改变猕猴桃的取材来源, 材料分别为愈伤组织、组培苗茎和叶片。

**1.2.2 DNA 质量检测。**

**1.2.2.1 基因组 DNA 外观分析。** 从基因组 DNA 外观的颜色、黏稠状、溶解的难以程度、上样的难易程度来从表面上分

析基因组 DNA 的质量。

**1.2.2.2 紫外分光光度法检测基因组 DNA 的纯度和浓度。** 吸取基因组 DNA 样品 20 μl, 用 TE 缓冲液稀释至 1 ml, 采用紫外分光光度计测定 DNA 在波长 260 与 280 nm 处的吸收值来计算基因组 DNA 纯度和浓度。

**1.2.2.3 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的完整性。** 采用 0.7% 的琼脂糖凝胶进行电泳检测 DNA 完整性。

## 2 结果与分析

**2.1 不同猕猴桃品种使用 CTAB 和 SDS 常规法的抽提效果比较** 由图 1 可见, 猕猴桃品种武雄、米良和徐香的 DNA 带较亮, 姜丽、两广和红阳的 DNA 带较浅, 而磨山 4 号和武植基本看不到条带; 武雄、姜丽和红阳基因组 DNA 电泳后, 样品孔不发亮, DNA 主带完整清晰, 拖尾不明显, 得到质量较好的基因组 DNA, 而米良和徐香虽然主带较亮, 但有一定的拖尾和杂质滞留现象。从 DNA 的外观来看, 武雄、米良、姜丽和红阳的 DNA 沉淀均为白色, 易溶解, 上样容易, 无漂浮。而磨山 4 号、武植的 DNA 沉淀有胶状物包裹, 难溶解, 且上样困难。两广、徐香则较易溶解, 但发现沉淀有胶状物包裹, 上样困难。

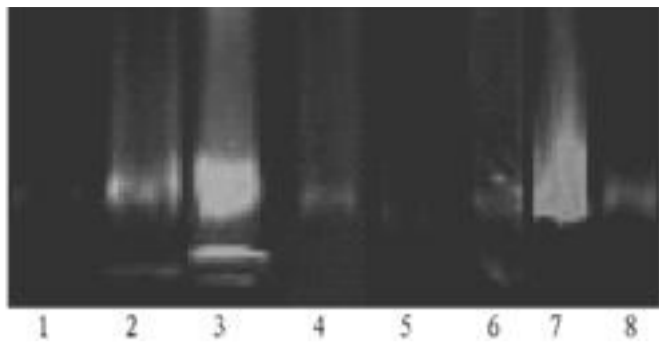
由图 2 可见, 除猕猴桃品种两广的基因组 DNA 条带较浅外, 其他猕猴桃品种的基因组 DNA 主带清晰可见, 完整较好, 样品孔基本不发亮, 尤以米良、姜丽为佳, 其次是武植、徐香和红阳。除猕猴桃品种两广外, 其他猕猴桃品种基因组 DNA 沉淀均为白色, 易溶解, 无胶状物, 上样容易。猕猴桃品种两广的电泳带较弱可能与其上样困难有关。

**2.2 - 巯基乙醇对猕猴桃基因组 DNA 提取的影响** 巯基乙醇在基因组提取过程中, 主要起防止酚类物质氧化的作用, 如果浓度过高, 上清液的粘度将增加, 导致转移上清液时困难<sup>[2]</sup>。由图 3 和表 1 可见, 提取液中添加不同浓度的巯基乙醇获得的结果相差不大, 但当提取液中巯基乙醇为 1% 时比为 2% 容易操作。因此, 在 DNA 质量允许的范围内, 以低浓度的 - 巯基乙醇即 1% 为宜。且从表 1 看, CTAB 法比

基金项目 广东省科技攻关项目(2005B60301010); 仲恺农业技术学院校基金(G3051312)。\* 通讯作者, lingyanzh@163.com。

作者简介 林智华(1984-), 男, 广东广州人, 助理实验师, 从事生物技术的研究工作。

收稿日期 2008-11-13

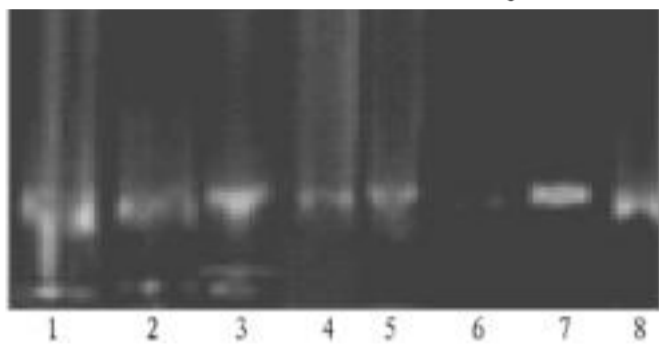


注:1. 磨山4号;2. 武雄;3. 米良;4. 姜丽;5. 武植;6. 两广;7. 徐香;8. 红阳。

Note: 1. Mshan No.4; 2. Wuxiong; 3. Mliang; 4. Jiangli; 5. Wuzhi; 6. Lianguang; 7. Xuxiang; 8. Hongyang.

图1 CTAB 法提取的猕猴桃基因组 DNA

Fig.1 Genomic DNA of *Actinidia* extracted by CTAB method



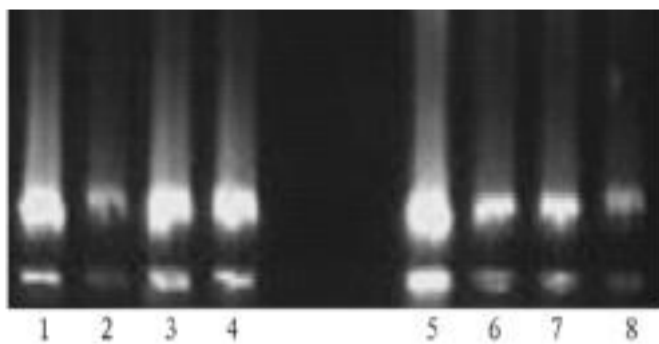
注:1. 磨山4号;2. 武雄;3. 米良;4. 姜丽;5. 武植;6. 两广;7. 徐香;8. 红阳。

Note: 1. Mshan No.4; 2. Wuxiong; 3. Mliang; 4. Jiangli; 5. Wuzhi; 6. Lianguang; 7. Xuxiang; 8. Hongyang.

图2 SDS 法提取的猕猴桃基因组 DNA

Fig.2 Genomic DNA of *Actinidia* extracted by SDS method

SDS 法的浓度高,但 SDS 法的纯度比 CTAB 法高,此结果也可以从图1、2、3 的结果可以看出。



注:1、2. - 巯基乙醇 1% (CTAB 法); 3、4. - 巯基乙醇 2% (CTAB 法); 5、6. - 巯基乙醇 1% (SDS 法); 7、8. - 巯基乙醇 2% (SDS 法)。

Note: 1, 2. - mercaptoethanol 1% (CTAB method); 3, 4. - mercaptoethanol 2% (CTAB method); 5, 6. - mercaptoethanol 1% (SDS method); 7, 8. - mercaptoethanol 2% (SDS method).

图3 不同浓度的 - 巯基乙醇提取的猕猴桃基因组 DNA

Fig.3 Genomic DNA of *Actinidia* extracted by different concentrations of - mercaptoethanol

**2.3 不同纯化条件对猕猴桃基因组 DNA 提取的影响** 由图4 和表2 可见, DNA 沉淀时加入一定量的 NaCl, 沉淀物为纯白色, 基因组 DNA 电泳后亮带完整, 基本无拖尾, 基因组 DNA 的得率和纯度较高。有研究者认为  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  可将果胶水解成果胶酸, 进而分解成 - 半乳糖醛酸等小分子物质, 从而不易在乙醇中沉淀, 达到分离果胶物质的目的<sup>[3]</sup>, 该试验结果并没有获得满意的结果, 不仅基因组 DNA 量损失较大, 而且 DNA 溶液中的胶状物更多, 更难以点样, 也许与操作失误有关, 也许与猕猴桃品种有关, 具体原理有待进一步验证。

DNA 沉淀时加入一定量的无水乙醚, DNA 的纯度有一定的提高, 无论是 SDS 法还是 CTAB 法,  $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$  均在 1.8 左右, 但得率有一定的下降。

表1 提取液不同 - 巯基乙醇浓度对猕猴桃基因组 DNA 提取的影响

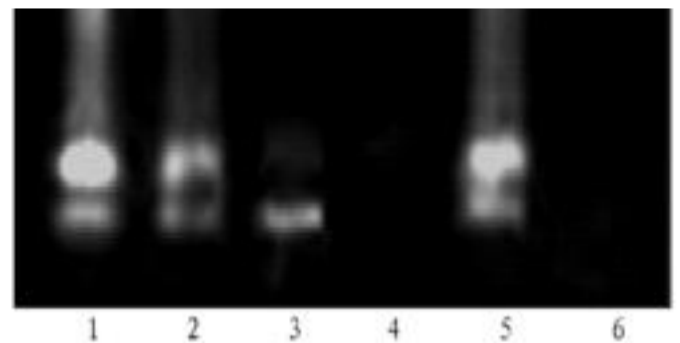
Table 1 Effects of different - mercaptoethanol concentrations in extraction solution on the genomic DNA of *Actinidia*

编号 Code	$\text{OD}_{260}$	$\text{OD}_{280}$	$\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$	浓度 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Concentration
1	0.264	0.120	2.169 5	660.0
3	0.294	0.144	2.040 3	735.0
6	0.176	0.097	1.826 6	440.0
7	0.210	0.107	1.969 0	525.0

表2 不同纯化条件对提取的猕猴桃基因组 DNA 纯度与浓度的影响

Table 2 Effects of different purification conditions on the purity and concentration of *Actinidia* genomic DNA

编号 Code	$\text{OD}_{260}$	$\text{OD}_{280}$	$\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$	浓度 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Concentration
1	0.291	0.156	1.865 4	727.5
2	0.247	0.127	1.944 9	617.5
3	0.117	0.061	1.918 0	292.5
4	0.062	0.034	1.834 9	155.0
5	0.259	0.143	1.813 9	647.5
6	0.102	0.057	1.790 2	255.0

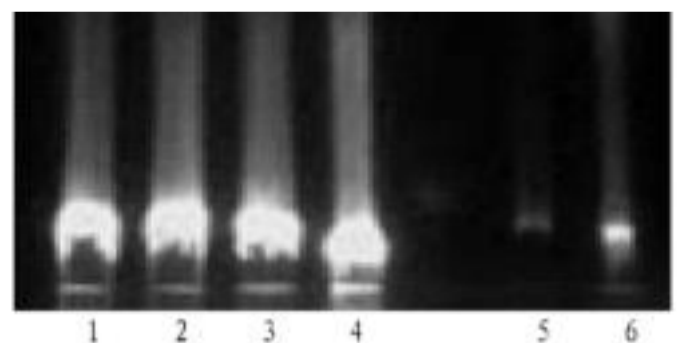


注:1. NaCl (CTAB 法); 2. NaCl (SDS 法); 3.  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (CTAB 法); 4.  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (SDS 法); 5. 乙醚 CTAB 法; 6. 乙醚 SDS 法。

Note: 1. NaCl (CTAB method); 2. NaCl (SDS method); 3.  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (CTAB method); 4.  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (SDS method); 5. Aether (CTAB method); 6. Aether (SDS method).

图4 不同纯化条件提取的猕猴桃基因组 DNA

Fig.4 Genomic DNA of *Actinidia* extracted under different purification conditions



注:1. 愈伤组织 (CTAB 法); 2. 愈伤组织 (SDS 法); 3. 茎 (CTAB 法); 4. 茎 (SDS 法); 5. 叶 (CTAB 法); 6. 叶 (SDS 法)。

Note: 1. Callus (CTAB method); 2. Callus (SDS method); 3. Stem (CTAB method); 4. Stem (SDS method); 5. Leaf (CTAB method); 6. Leaf (SDS method).

图5 不同材料提取的基因组 DNA

Fig.5 Genomic DNA extracted by different materials

**2.4 不同材料对基因组 DNA 提取的影响** 由图5 和表3

可见,猕猴桃组培苗各部位提取的基因组 DNA 比室外采的叶片质量好。从猕猴桃组培苗的不同部位来看,愈伤组织和茎得到的 DNA 浓度较高,纯度也较高,说明猕猴桃在整个组织培养过程中,愈伤组织、茎和叶所含的成分是不同的。

表3 不同材料对提取的基因组 DNA 纯度和浓度的影响

Table 3 Effects of different materials on the purity and concentration of genomic DNA

编号 Code	OD <sub>260</sub>	OD <sub>280</sub>	OD <sub>260</sub> /OD <sub>280</sub>	浓度 μg/ml Concentration
1	0.495	0.258	1.916 2	1 237.5
2	0.326	0.173	1.884 4	845.0
3	0.590	0.311	1.898 0	1 475.0
4	0.504	0.264	1.908 5	1 260.0
5	0.111	0.053	2.083 2	472.5
6	0.189	0.127	1.888 2	277.5

### 3 讨论

CTAB 是一种阳离子去污剂,它能与核酸形成复合物,这些复合物在低盐溶液中会因溶解度的降低而沉淀,而在高盐溶液中可解离,使 DNA 和多糖分开。SDS 能使蛋白质变性,通过氯仿处理,分开 DNA 与蛋白质<sup>[4]</sup>。由图 1、2 可知,不同猕猴桃属采取 CTAB 法抽提 DNA 的效果不一样,不同猕猴桃属采取 SDS 法抽提 DNA 的效果差不多,故试验采取的提取方法应依不同的猕猴桃属而不同。

提取 DNA 包括 3 个基本步骤:首先是破碎细胞壁和细胞膜,其次纯化 DNA,最后沉淀 DNA。其中,较难解决的是纯化 DNA,特别是多糖类物质的去除。综合来看,NaCl 可以提高基因组 DNA 的纯度且对基因组 DNA 的得率没有损失,能

保持基因组 DNA 的完整性,无水乙醚虽然可以大幅度的提高基因组 DNA 的纯度但得率下降,Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 没有获得理想的效果。因此,该试验认为通过加入 1/2 的 5 mol/L NaCl 并加入等体积的异丙醇沉淀 DNA 的方法是较好的。

由于在外种植的猕猴桃受到大自然的影响、土壤质量的差异以及鲜叶的老嫩程度不同等,所提取的 DNA 质量较难控制。特别在冬天,叶子变老,所含的多糖多酚较高,所提取的基因组 DNA 质量往往很难进行往后的分子生物学试验。对组培苗来说,它有着含菌量少、组织鲜嫩的特点,所提取的基因组 DNA 的质量较高,且重复性好。在以组培苗不同部位为材料提取 DNA 时发现,多糖物质主要存在于叶中,而愈伤及茎部含量较少。因此在某些情况下可以采用组织培养苗为材料。

### 参考文献

- [1] 陶爱丽,文祯中,阚云超,等.美味猕猴桃基因组 DNA 的提取条件优化[J].南阳师范学院学报:自然科学版,2004,9(3):56-58.
- [2] 徐小彪,陈华,张秋明.美味猕猴桃基因组 DNA 的高效提取[J].中国农学通报,2004,20(4):43-53.
- [3] 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.
- [4] 张宁,王凤山.DNA 提取方法进展[J].中国海洋药物,2004,98(2):40-46.
- [5] SHI K M, ZHOU Y F. An improved method of extracting *Actinidia chinensis* genomic DNA[J]. Agricultural Science & Technology, 2008, 9(2):36-38.
- [6] 陈华,徐小彪,易干军,等.猕猴桃基因组 DNA 不同提取方法的研究[J].江西农业大学学报,2005,27(1):12-16.
- [7] YAN M M, WEI G C, PAN X H, et al. A method suitable for extracting genomic DNA from animal and plant—modified CTAB method[J]. Agricultural Science & Technology, 2008, 9(2):39-41.
- [8] 丁建,董晓莉,郑晓琴,等.一种简便高效提取猕猴桃 DNA 的方法[J].资源开发与市场,2006,22(5):401-402.
- [9] REESE M G. Application of a time-delay neural network to promoter annotation in the *Drosophila melanogaster* genome[J]. Comput Chem, 2001, 26(1):51-56.
- [10] HILNEMEYER T, WINGENDER E, REUTER I, et al. Databases on transcriptional regulation: TRANSFAC, TRRD, and COMPEL[J]. Nucleic Acids Res, 1998, 26:364-370.
- [11] YANG T, PEEMSH B W. A calmodulin-binding/CGCG box DNA binding protein family involved in multiple signaling pathways in plants[J]. J Biol Chem, 2002, 277:45049-45058.
- [12] YU D, CHEN C, CHEN Z. Evidence for an important role of WRKY DNA binding proteins in the regulation of NPR1 gene expression[J]. Plant Cell, 2001, 13:1527-1540.
- [13] HUIE M A, SCOTT E W, DRAZINIC M, et al. Characterization of the DNA binding activity of GCRI: In vivo evidence for two GCRI-binding sites in the upstream activating sequence of TH of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Mol Cell Biol, 1992, 12:2690-2700.
- [14] CHENG C, KACHEROVSKY N, DOMBEK K M, et al. Identification of potential target genes for Ad1p through characterization of essential nucleotides in UAS1[J]. Mol Cell Biol, 1994, 14:3842-3852.

(上接第995页)

(2) 由于克隆得到的 2 条 DNA 片段含有丰富的作用元件可能是顺式作用元件的序列,推测 *gpd1* 和 *gpd2* 所启动的基因具有较高的多样性和准确性,这为构建高效表达外源基因的姬松茸表达载体提供了重要的表达元件,也为利用基因工程培育姬松茸新品种奠定了基础,具有重大的理论意义和实际应用价值。

### 参考文献

- [1] 王丕武,王东昌,李玉.食用菌基因工程研究进展[J].吉林农业大学学报,2001,23(3):23-27.
- [2] 郭丽琼,陈守才,林俊芳.食用菌遗传转化研究进展[J].食用菌学报,2001,8(4):47-53.
- [3] HIGO K, UGAWA Y, IWAMOTO M, et al. Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database:1999[J]. Nucleic Acids Research, 1999, 27(1):297-300.
- [4] PRESTIGE D S, SIGNAL SCAN. A computer program that scans DNA sequences