

# 琯溪蜜柚高分子量核DNA提取方法的建立

潘腾飞, 陈桂信, 潘东明\*

(福建农林大学园艺产品贮运保鲜研究所, 园艺学院, 福州 350002)

**摘要:** 以琯溪蜜柚 [*Citrus grandis* (L.) Osbeck ‘Guanximiyou’] 叶片为材料, 比较了两种提取方法对高分子量核 DNA (HMW-DNA) 制备效果的影响。结果表明, 改良 Zhang 法与 Peterson 法相比, 前者更适用于琯溪蜜柚 HMW-DNA 的提取。改良 Zhang 法用温和的物理方法破碎细胞壁, 在一定的渗透压下保证细胞核的完整性, 运用 miracloth 和低速离心去除大部分的多糖和细胞壁碎片, 经显微观察, 所提取的细胞核完整、纯净、质量高; 将这些细胞核用低熔点琼脂糖包埋, 以琼脂糖小块的方式保存细胞核, 以保持核的稳定; 琼脂糖小块的最适消化时间为 48 h, 脉冲场凝胶电泳分析结果表明所获得的 HMW-DNA 大于 1 Mb, 这些核 DNA 能够被限制性内切酶消化, 适合于琯溪蜜柚 BAC 基因组文库的构建。

**关键词:** 柚; 高分子量核 DNA; BAC 文库; 脉冲场电泳

**中图分类号:** S 666.3

**文献标识码:** A

**文章编号:** 0513-353X (2010) 05-0835-06

## Development of Method for Preparation of High Molecular Weight DNA from *Citrus grandis* (L.) Osbeck ‘Guanximiyou’

PAN Teng-fei, CHEN Gui-xin, and PAN Dong-ming\*

(Institute of Postharvest Science and Technology of Horticultural Products, College of Horticulture, Fujian Agricultural and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

**Abstract:** High molecular weight nuclear DNA (HMW-DNA) from leaves of Guanximiyou [*Citrus grandis* (L.) Osbeck ‘Guanximiyou’] was prepared by two methods (Zhang’s and Peterson’s method) and the extracting effects of the two preparing methods were compared. The results showed that Zhang’s method was more suitable for preparation of HMW-DNA in Guanximiyou. The cell walls were broken down by gentle physical homogenization to keep integrity of nuclei under suitable osmolarity. Debris of cell walls and most of polysaccharides were removed by filtering with miracloth and centrifugation under slow speed. The isolated nuclei were proved to be intact, pure, and high-quality by observation under microscope and were embedded with low-melting-point agarose to preserve the isolated nuclei in plugs for keeping stability of nuclei. The optimum digestion time of plugs was 48 hours, the pulse field gel electrophoresis (PFGE) results showed that the isolated HMW-DNAs were more than 1 Mb in size and were digested completely or partially by restriction enzymes, therefore, Zhang’s method was suitable for construction of BAC library in Guanximiyou.

**Key words:** pummelo; HMW-DNA; BAC library; pulsed-field gel electrophoresis

收稿日期: 2009 - 11 - 27; 修回日期: 2010 - 04 - 01

基金项目: 国家科技支撑计划项目 (2007BAD07B01); 福建省重大专项前期项目 (2005NZ1003)

\* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: pdm666@126.com, Tel: 0591-83701719)

致谢: 本论文得到中国农业大学国家玉米改良中心赖锦盛教授的帮助, 特此致谢。



脉冲场电泳 (pulsed-field gel electrophoresis, PFGE) 技术出现和克隆大片段载体的构建与应用, 使构建大片段基因组文库包括酵母人工染色体 (Yeast artificial chromosome, YAC) (Burke et al., 1987) 和细菌人工染色体 (Bacterial artificial chromosome, BAC) (Shizuya et al., 1992) 成为可能, 大片段基因组文库已经成为基因组序列测定、物理作图、基因分离以及基因结构和功能分析等的研究平台。前人研究结果表明, YAC 文库的插入片段理论上能达到 2 Mb 左右 (Burke et al., 1987), 植物 BAC 文库的平均插入片段大小为 100 kb 左右 (Zhang et al., 1996; Deng et al., 2001; Guan et al., 2008)。因此, 获得高质量的高分子量核 DNA (HMW-DNA) 是构建大插入片段基因组文库的关键。

与常规基因组 DNA 的提取方法不同的是, 在 HMW-DNA 提取过程中应避免剧烈的震荡和有机溶剂对 DNA 产生的物理损伤 (Zhang et al., 1995)。提取细菌或者动物组织的 HMW-DNA 时, 可以将整个细胞包埋在琼脂糖胶块中, 然后再消化细胞, 纯化 DNA (Overhauser & Radic, 1987)。对于植物材料, 由于细胞壁的存在, 增加了获得 HMW-DNA 的难度。另外, 不稳定的次生代谢物质和叶绿体等细胞器 DNA 的污染也会影响 HMW-DNA 的质量。

在用物理方法获得细胞核之前, 通常用细胞壁水解酶来获取原生质体 (Ganal & Tanksley, 1989; Cheung & Gale, 1990; Wing et al., 1993), 但是培养原生质体费时、费力, 而且没有一个通用的方法能适用于每个物种的原生质体分离。此外, 从原生质体中获得的 HMW-DNA 含有大量的叶绿体和线粒体 DNA 的污染 (Wing et al., 1993), 不适合文库的构建和后续的研究工作。Zhang 等 (1995) 报道用物理手段破碎植物的细胞壁, 分离细胞核, 然后将细胞核包埋在琼脂糖胶块中, 得到的 HMW-DNA 没有明显的降解, 纯度高, 比前人的方法更简单、容易操作, 能适用于小麦、高粱、玉米、花生、西瓜、辣椒、桃、胡桃、柳树等植物。Ingo 等 (2005) 改进了木本植物 HMW-DNA 的提取方法, 取得了较好的效果。

琯溪蜜柚 (*Citrus grandis* (L.) Osbeck ‘Guanximiyou’) 原产于福建省平和县, 是我国柚类优良品种之一, 已有 400 多年的栽培历史。本研究以琯溪蜜柚叶片为材料, 针对琯溪蜜柚叶片富含多酚类和多糖的特点, 比较不同提取方法对琯溪蜜柚 HMW-DNA 制备效果的影响, 建立一套适合琯溪蜜柚 HMW-DNA 提取的方法, 为构建 BAC 文库和开展琯溪蜜柚基因组研究奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

琯溪蜜柚 (*Citrus grandis* (L.) Osbeck ‘Guanximiyou’) 叶片于 2008 年 9 月采自福建省平和县锦溪集团果园。采集刚展开的嫩叶, 洗净擦干后用液氮速冻,  $-80^{\circ}\text{C}$  超低温冰箱保存备用。

### 1.2 HMW-DNA 的制备

1.2.1 Peterson 法 参考 Peterson 等 (2000) 的方法。

1.2.2 改良 Zhang 法 参考 Zhang 等 (1995) 的方法并进行改进。取 50 g 冷冻的琯溪蜜柚叶片, 在研钵中用液氮研磨成粉末。将粉末转移至 1 L 的烧杯中, 加入 500 mL 预冷的抽提缓冲液、0.3%  $\beta$ -巯基乙醇和 0.75% TritonX-100, 在磁力搅拌器上低速搅拌 15 min, 充分混匀。抽提缓冲液含 10 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> Tris-HCl, 10 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> EDTA, 50 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> KCl, 500 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> 蔗糖, 1 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> 精胺和 1 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> 亚精胺, 4% PVP-40, pH 9.4。混合物用两层 miracloth 和一层医用纱布过滤至另一烧杯中, 滤液在 1 200  $\times$  g, 4  $^{\circ}\text{C}$  下离心 20 min 后, 倒去上清液, 在离心管中加入适量的洗涤缓冲液 (抽提缓冲液加 0.3%  $\beta$ -巯基乙醇和 0.75% TritonX-100), 用移液器轻轻吹打, 悬浮沉淀的细胞核, 再用两层 miracloth 过



滤悬浮液，滤液在  $1\,200 \times g$ ， $4\,^{\circ}\text{C}$  下离心 20 min，重新沉淀细胞核。重复清洗 3 次，尽量将叶绿体等细胞器去除。最后一次离心后加入约 750  $\mu\text{L}$  抽提缓冲液，用移液器悬浮沉淀的细胞核。按 Peterson (2000) 的方法观察细胞核的完整性。细胞核悬浮液在  $45\,^{\circ}\text{C}$  水浴锅中平衡 5 min。

### 1.3 HMW-DNA 的包埋

细胞核包埋参考 Peterson (2000) 的方法。将凝固好的胶块在  $50\,^{\circ}\text{C}$  消化液中消化 (Zhang et al., 1995)，每隔 24 h 更换一次消化液。

### 1.4 胶块的清洗与保存

消化后的胶块在  $0.5\,\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  EDTA (pH 9.0) 中  $50\,^{\circ}\text{C}$  振荡清洗 2 h，然后在  $0.5\,\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  EDTA (pH 8.0) 中  $4\,^{\circ}\text{C}$  振荡清洗 1 h。洗净的胶块在  $4\,^{\circ}\text{C}$  下至少保存 6 个月。

### 1.5 HMW-DNA 的部分酶切

部分酶切参考 Frijters 等 (1997) 的方法。取出保存于  $0.5\,\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  EDTA (pH 8.0) 中的 plug，用 50 mL TE (含  $1\,\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  PMSF) 浸泡 3 次，每次 1 h。再用不含 PMSF 的 TE 浸泡 3 次，每次 1 h。将清洗好的胶块平均分成 10 份，分装在 1.5 mL 离心管中，每管加入 500  $\mu\text{L}$   $1 \times \text{Hind III}$  buffer，浸泡 3 h，每隔 1 h 更换一次  $1 \times \text{Hind III}$  buffer，然后分别加入 0、0.5、1.0、2.0、4.0 U  $\text{Hind III}$ ， $37\,^{\circ}\text{C}$  水浴锅中酶切反应 15 min，再加入 1/10 体积的  $0.5\,\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  EDTA 终止反应。脉冲场电泳检测酶切结果。

## 2 结果与分析

### 2.1 细胞核观察

用 Peterson 法和改良 Zhang 法分离得到的细胞核用甲基蓝染色后，各取 5  $\mu\text{L}$  在 400 倍光学显微镜下观察并拍照，结果如图 1 所示。改良 Zhang 法所得的细胞核较 Peterson 法多且完整。在两种方法中，用多层纱布和 miracloth 过滤，以及多次低速离心，均能有效地把多糖和细胞碎片去除。

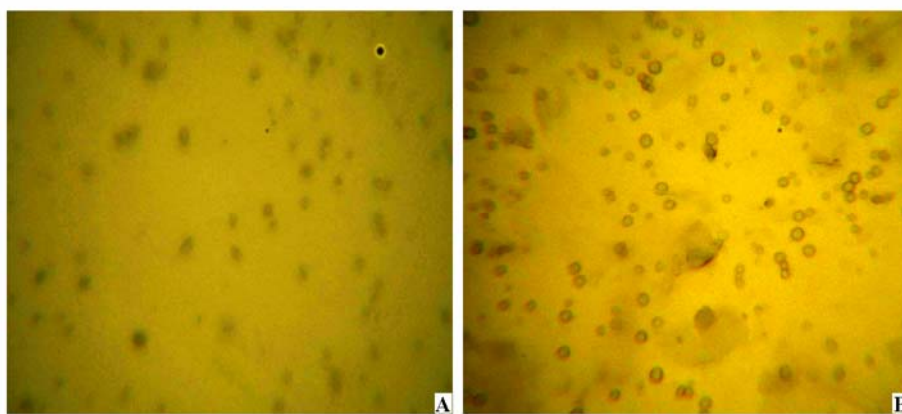


图 1 由两种方法分离获得的细胞核

A. Peterson 法分离获得的细胞核；B. 改良 Zhang 法分离获得的细胞核。

Fig. 1 Nuclei isolated by two methods

A. Nuclei isolated by Peterson's method; B. Nuclei isolated by improved Zhang's method.



## 2.2 不同消化时间对HMW-DNA含量的影响

将改良 Zhang 法所获得的细胞核用 1.5%的低熔点琼脂糖包埋后,取 4 个胶块在消化液中分别消化 0、12、48 和 60 h,再分别取 1/10 个胶块进行脉冲场电泳。

结果如图 2 所示,消化 48 h 后,进行脉冲场电泳分离得到的 HMW-DNA 分子量大于 1 Mb,条带清晰明亮,弥散的 DNA 较少,说明只有少量的降解;消化 0 h 和 12 h 的电泳条带较淡,说明消化时间不够,细胞核未完全释放出 DNA;消化 60 h 后,条带较亮,但是分子量约 100 ~ 300 kb 的弥散的 DNA 明显增多,说明消化时间太长, DNA 降解严重。由此可见,胶块的最适合消化时间为 48 h。

## 2.3 不同细胞核提取方法的提取效果

将 Peterson 法和改良 Zhang 法得到的胶块在消化液中消化 48 h 后,分别取 1/10 个胶块进行电泳。

结果如图 3 所示,泳道 A、B 分别为 Peterson 法和改良 Zhang 法所提取的 HMW-DNA。从脉冲场电泳图谱可以看出,泳道 A 在分子量约 1 Mb 左右有 1 条亮度很弱的 DNA 条带,泳道 B 有 1 条 1 Mb 左右的明亮的条带。

结果表明,采用 Peterson 法获得的 HMW-DNA 量远低于改良 Zhang 法,改良 Zhang 法更适用于提取琯溪蜜柚 HMW-DNA。

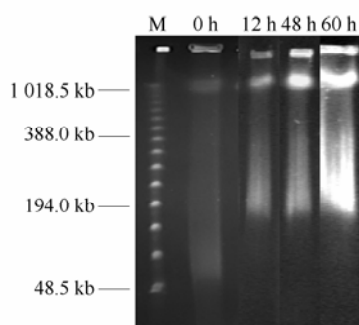


图 2 不同消化时间效果比较

Fig. 2 Comparison of different lysis time

M: Lambda ladder PFG marker.

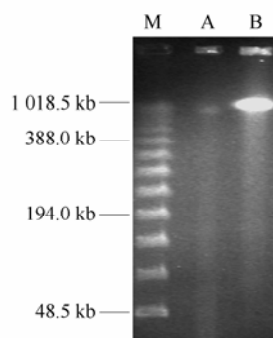


图 3 Peterson 法 (A) 和改良 Zhang 法 (B) 提取的 HMW-DNA

Fig. 3 HMW-DNA isolated by Peterson method(A) and improved Zhang method (B)

M: Lambda ladder PFG marker.

## 2.4 HMW-DNA的部分酶切

包埋在低熔点琼脂糖的 HMW-DNA 经过清洗,去除了高浓度的 EDTA、PMSF 和蛋白酶 K 等物质。用一系列浓度的限制性内切酶 *Hind* III在最佳反应温度下与 HMW-DNA 反应 15 min,进行部分酶切。

酶切结果如图 4 所示。结果表明,所得的 HMW-DNA 能够被 *Hind* III酶切,酶切片段大部分分布在 50 ~ 400 kb,随着内切酶浓度的增加,所得的 DNA 片段平均大小越小,酶切越彻底。



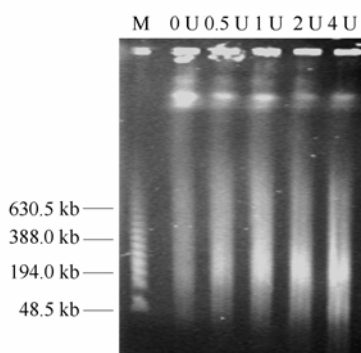


图 4 HMW-DNA 的部分酶切结果

Fig. 4 Partial digestion by *Hind* III

M: Lambda ladder PFG marker.

### 3 讨论

获取高质量的 HMW-DNA 是构建 BAC 文库成功与否的技术关键。一般来说, 用低熔点包埋的 HMW-DNA 分子量小于 600 kb 即不适用于下一步的工作 (Peterson et al., 2000)。Zhang 等 (1995) 报道了一种温和的提取方法获得的 DNA 分子量大于 5 Mb, 该方法用蔗糖和 KCl 调节溶液的渗透压, 提取缓冲液中较高的 pH 值和 EDTA 能抑制核酸酶的活性, 精胺和亚精胺有助于保持核的稳定性,  $\beta$ -巯基乙醇能防止多酚氧化, 匀质化后加入 TritonX-100 至终浓度为 0.5% 以裂解叶绿体和线粒体, 两层纱布和 1 层的 miracloth 可以去除大部分的多糖和细胞碎片。本研究针对琯溪蜜柚叶片富含多酚和多糖类物质, 对 Zhang 等 (1995) 的方法进行改良, 在核提取缓冲液中加入 4% PVP-40, 以抑制多酚类物质的氧化, 防止褐变的发生; 增加 TritonX-100 浓度由 0.5% 增加至 0.75%, 能更有效地去除非黄化叶片中细胞器 DNA 的干扰; 离心力由  $1\ 800 \times g$  降到  $1\ 200 \times g$ , 减少过滤和清洗次数, 以保证细胞核的完整性和产量, 试验结果表明, 采用改良的 Zhang 法可以从非黄化叶片中获得纯净、完整和高质量的琯溪蜜柚 HMW-DNA。经脉冲场凝胶电泳检测, 所得的 HMW-DNA 大小均大于 1 Mb。

*Bam*HI 和 *Hind* III 是大部分 BAC 载体上常用的酶切位点 (Shizuya et al., 1992; Wing et al., 1993; Kim et al., 1996)。用限制性内切酶 *Hind* III 对 HMW-DNA 进行部分酶切并进行脉冲场凝胶电泳, 结果发现所得的 HMW-DNA 能够被限制性内切酶消化, 适用于构建 BAC 文库。

经多次的重复试验, 结果表明, Peterson 法得到的 HMW-DNA 浓度较低, 不适宜构建琯溪蜜柚 BAC 文库。Peterson 法主要针对大量的新鲜组织, 对于冷冻样品效果不甚理想 (Peterson et al., 2000)。用 Peterson 法不能获得理想的结果原因主要有以下几个: 不同植物组织结构不一样, 对于琯溪蜜柚叶片, 用二乙基乙醚浸泡可能会导致细胞核的破裂; 太多的叶片 (约 500 g) 在用匀浆器匀浆的过程中不能保证所有叶片的一致性, 可能有些核已经破裂, 而有些叶片的细胞壁还未破碎; 低 pH 值 (pH 6.0) 虽然可以防止多酚氧化, 但是不能抑制内源性核酸酶的活力。

Peterson 法步骤繁琐, 需要大量的新鲜组织, 而改良 Zhang 法相对简单, 节约时间, 不需要吊桶离心机等设备, 在大多数的实验室都可以完成, 因此, 改良 Zhang 法适用于琯溪蜜柚 HMW-DNA 的提取, 解决了构建琯溪蜜柚 BAC 文库的第一个难点。

### References

Burke D T, Carle G F, Olson M V. 1987. Cloning of large segments of exogenous DNA into yeast by means of artificial chromosome vectors.



- Science, 236: 806 – 812.
- Cheung W Y, Gale M D. 1990. The isolation of high molecular weight DNA from wheat, barley and rye for analysis by pulsed-field gel electrophoresis. *Plant Molecular Biology*, 14: 881 – 888.
- Deng Z, Tao Q, Chang Y L, Huang S, Ling P, Yu C, Chen C, Gmitter J R F G, Zhang H B. 2001. Construction of a bacterial artificial chromosome (BAC) library for citrus and identification of BAC contigs containing resistance gene candidates. *Theoretical and Applied Genetics*, 102: 1177 – 1184.
- Frijters A C J, Zhang Z, Damme M, Wang G L, Ronald P C, Michelmore R W. 1997. Construction of a bacterial artificial chromosome library containing large *EcoR* I and *Hind* III genomic fragments of lettuce. *Theoretical and Applied Genetic*, 94: 390 – 399.
- Ganal M W, Tanksley S D. 1989. Pulsed-field gel electrophoresis and physical mapping of larger DNA fragments in the *Tm-2a* region of chromosome 9 tomato. *Molecular and General Genetics*, 215: 395 – 400.
- Guan Y, Chen Q, Pan J, Li Z, He H, Wu A, Song R, Cai R. 2008. Construction of a BAC library from cucumber (*Cucumis sativus* L.) and identification of linkage group specific clones. *Progress in Natural Science*, 18: 143 – 147.
- Ingo H, Sandie W, Joanne R, Wayne P. 2005. Isolation of high molecular weight DNA suitable for BAC library construction from woody perennial soft-fruit species. *Bio Techniques*, 38: 69 – 71.
- Kim U J, Birren B, Slepak T, Mancino V, Boysen C, Kang H L, Simon M I, Shizuya H. 1996. Construction and characterization of a human bacterial artificial chromosome library. *Genomics*, 34: 213 – 318.
- Overhauser J, Radic M Z. 1987. Encapsulation of cells in agarose beads for use with pulsed-field gel electrophoresis. *Focus*, 9: 8 – 9.
- Peterson D G, Tomkins J P, Frisch D A, Wing R A, Paterson A H. 2000. Construction of plant bacterial artificial chromosome (BAC) libraries: An illustrated guide. *Journal of Agricultural Genomics*, 5: [www.nugr.org/research/jag](http://www.nugr.org/research/jag).
- Shizuya H, Birren H B, Kim U J, Mancino V, Slepak T, Tachiiri Y, Simon M. 1992. Cloning and stable maintenance of 300 kilobase-pair fragments of human DNA in *Escherichia coli* using an F-factor-based vector. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 89: 8794 – 8797.
- Wing R A, Rastogi V K, Zhang H B, Paterson A H, Tanksley S D. 1993. An improved method of plant megabase DNA isolation in agarose microbeads suitable for physical mapping and YAC cloning. *Technical Advance*, 4: 893 – 898.
- Zhang H B, Choi S D, Woo S S, Li Z K, Wing R A. 1996. Construction and characterization of two rice bacterial artificial chromosome libraries from the parents of a permanent recombinant inbred mapping population. *Molecular Breeding*, 2: 11 – 24.
- Zhang H B, Zhao X P, Ding X L, Paterson A H, Wing R A. 1995. Preparation of megabase-size DNA from plant nuclei. *The Plant Journal*, 7: 175 – 184.

征订

## 《园艺学报》2009 年增刊——庆祝中国园艺学会创建 80 周年暨第 11 次全国会员代表大会 论文摘要集出版发行

本期论文摘要集共收录果树、蔬菜、西瓜甜瓜和观赏植物方面论文摘要 202 篇，其中果树 76 篇，蔬菜 78 篇，西瓜甜瓜 23 篇，观赏植物 25 篇，内容涉及种质资源、遗传育种、分子生物学、栽培技术、生理生化、贮藏保鲜等。每册定价 45 元。欲购者请与《园艺学报》编辑部联系。

编辑部地址：北京市海淀区中关村南大街 12 号 中国农业科学院蔬菜花卉研究所《园艺学报》编辑部；

邮政编码：100081；电 话：(010) 82109523；

E-mail: [yuanyixuebao@126.com](mailto:yuanyixuebao@126.com)；网址: <http://www.ahs.ac.cn>。