

柿属植物叶绿体 DNA 提取方法优化

傅建敏¹, 梁玉琴¹, 孙 鹏¹, 姬燕晓², 谭晓风³

(1. 中国林业科学研究院 经济林研究开发中心, 河南 郑州 450003; 2. 武汉大学 生命科学学院, 湖北 武汉 430072; 3. 中南林业科技大学 经济林育种与栽培国家林业局重点实验室, 湖南 长沙 410004)

摘 要: 利用 Percoll 密度梯度离心法, 对 4 种柿属植物君迁子 *D. lotus* L.、油柿 *D. oleifera* Cheng、浙江柿 *D. glaucifolia* Metc.、金枣柿 *D. kaki* spp. 进行叶绿体 DNA (cpDNA) 提取方法的优化, 结果显示优化后的柿属植物 cpDNA 提取方法具有高效、简便、重复性好、稳定性高的特点; 经检验, 利用此方法提取的 cpDNA 质量好, 浓度与纯度均较高, 能够满足后续叶绿体 PCR 扩增、基因组测序等分子生物学试验。

关键词: 柿属植物; 叶绿体; DNA 提取; Percoll 密度梯度离心

中图分类号: S718.46; S665.2

文献标志码: A

文章编号: 1673-923X(2015)12-0025-04

Optimization of method for extracting chloroplast DNA in *Diospyros*

FU Jian-min¹, LIANG Yu-qin¹, SUN Peng¹, JI Yan-xiao², TAN Xiao-feng³

(1. Non-timber Forestry Research & Development Center, Chinese Academy of Forestry, Zhengzhou 450003, Henan, China; 2. College of Life Science of Wuhan University, Wuhan 430072, Hubei, China; 3. Key Lab of Non-wood Forest Products of Forestry Ministry, Central South University of Forestry & Technology, Changsha 410004, Hunan, China)

Abstract: In order to optimize the method of extracting chloroplast DNA (cpDNA) from *Diospyros lotus* L., *D. oleifera* Cheng, *D. glaucifolia* Metc. and *D. kaki* spp., the technology of Percoll density-gradient centrifugation was used. The results show that the cpDNA of *Diospyros* could be quickly, simply, repeatedly and steadily extracted by the method. The quality of the cpDNA which was isolated by this method was determined through the technology of agarose gel electrophoresis, which indicated that the purity, concentration and quality of cpDNA was good enough for further PCR amplification and genomic sequencing analysis.

Key words: *Diospyros*; chloroplast; cpDNA extraction; Percoll density-gradient centrifugation

我国柿属植物有 58 个种和变种(变型), 其中特有种 27 个, 主要分布在我国西南部至东南部, 其中作为果树栽培的有柿 *Diospyros kaki* Thunb.、君迁子 *D. lotus* L.、油柿 *D. oleifera* Cheng、浙江柿 *D. glaucifolia* Metc. 等, 其中尤以柿经济价值最高, 栽培范围最广^[1-2]。我国是柿的分布中心和原产中心之一, 拥有丰富的柿种质资源, 现有品种 1 000 多个^[3]。前人利用形态学、细胞学、生物化学和分子标记等方法在柿属植物遗传多样性、亲缘关系和种质鉴定等方面进行了研究, 证实君迁子、油柿、浙江柿均属于柿近缘 2 倍体野生种^[4-5], 但由于研究起步晚, 技术水平低, 加之柿属植物倍性复杂, 野生资源缺失等原因, 致使柿这一天然 6 倍体的遗传背景、起源演化进程等都没有得到统

一、准确的结论, 严重制约了柿遗传改良、杂交育种等工作的进行。

胞质基因组序列保守, 相对于核基因组更小, 但其进化速度较快, 胞质基因组序列分析, 特别是叶绿体基因组序列分析, 在科内属间和属内种间均可进行分子系统发育研究, 甚至在某些植物类群中可以进行种内遗传多样性检测^[6]。并且由于其遗传为非孟德尔遗传方式, 为母系遗传, 对于亲本不明确的植物, 可以排除父本干扰, 在系统发育研究中具有独特优势, 同时, 其分析结果可以为核基因组研究提供佐证, 使得植物系统发育重建更加准确^[7]。要进行叶绿体基因组研究, 分离得到叶绿体是第一步, 获得高质量的 cpDNA 是后续各项分子生物学研究的前提^[8-10]。柿属植物叶

收稿日期: 2014-08-08

基金项目: 国家“十二五”科技计划课题“涩柿种质资源收集评价与新品种选育”(2013BAD14B0502)

作者简介: 傅建敏, 副研究员

通讯作者: 谭晓风, 教授; E-mail: tanxiaofengcn@126.com

引文格式: 傅建敏, 梁玉琴, 孙 鹏, 等. 柿属植物叶绿体 DNA 提取方法优化 [J]. 中南林业科技大学学报, 2015, 35(12): 25-28, 33.

片中多糖、酚类等物质含量较高^[11], 叶绿体 DNA 提取较为困难, 目前尚未见柿属植物叶绿体 DNA 提取的报道。

本研究利用 Percoll 密度梯度离心法, 对君迁子、油柿、浙江柿、金枣柿 4 种柿属植物进行 cpDNA 提取方法优化, 为后续叶绿体基因组研究奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

研究材料为柿属 4 个种: 君迁子、油柿、浙江柿、金枣柿, 于 5 月中旬在中国林科院经济林研究开发中心原阳资源圃, 分别采集 4 个样品枝条顶端、健康无病虫害、刚展开不久的正常绿色幼嫩叶片, 置于冰盒内冷藏保鲜, 带回实验室备用。试验过程中每种样品都进行 3 次生物学重复。

1.2 试验所用试剂

缓冲液 A: 0.4 mol 山梨醇; 5 mmol EDTA; 0.1 mol Hepes-NaOH(pH 7.5); 使用前加入 2.5% (w/v) PEG-8000; 2% (w/v) PVP-40; 1% (w/v) BSA; 10 mmol 抗坏血酸。

缓冲液 B: 0.25 mol 蔗糖; 10 mmol MOPS(pH 7.2);

裂解缓冲液: 100 mmol Tris-HCl, pH 值 8.0; 50 mmol EDTA; 100 mmol NaCl; 1% SDS; 使用前加入 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ RNase A。

Percoll 分离液梯度设置及配置见表 1。

表 1 Percoll 分离液配置
Table 1 The gradients of Percoll

Constituent /%	Percoll /mL	1mol Sucrose /mL	1 mol MOPS /mL	ddH ₂ O /mL	合计 /mL
60	60	25	1	14	100
30	30	25	10	44	100
18	18	25	1	56	100

1.3 方 法

1.3.1 叶绿体分离与纯化

叶绿体分离纯化所有步骤均需在 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下进行, 具体操作如下:

(1) 取大约 50 g 嫩叶, 加入 400 ~ 500 mL 预冷缓冲液 A, 组织研磨仪进行研磨; 然后将匀浆经 4 层 Mira 滤布和 2 层纱布过滤, 滤液分装到 2 个 500 mL 的离心瓶中。

(2) 滤液 1 000 \times g 离心 5 min, 上清液转入

2 个干净的 500 mL 离心管中, 18 000 \times g 离心 30 min, 弃上清液留沉淀。

(3) 每管中加入 500 mL 缓冲液 B, 用湿刷子小心地将沉淀物重新悬浮于溶液中, 1 000 \times g 离心 5 min。

(4) 移液管将上清液转入 2 个干净的离心管中, 18 000 \times g 离心 20 min 以得到叶绿体粗提物。

(5) 得到的叶绿体沉淀中加入 16 mL 缓冲液 B, 将液体分为 3 份, 完全混匀使其悬浮, 然后分别在 18%、30%、60% Percoll 分离液中, 进行超高速密度梯度离心。

(6) 40 000 \times g 离心 60 min 后, 即可在管中液面中下部观察到叶绿体沉淀。

(7) 将叶绿体层吸取出转移至 1.5 mL 的离心管中, 加入 2 体积的缓冲液 B, 台式离心机 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下, 30 000 \times g 离心 20 min, 得到超纯叶绿体颗粒。

(8) 将叶绿体重新置于新的离心管中, 加入 500 μL 缓冲液 B, 20,000 \times g 离心 20 min, 完全去除 Percoll 分离液。

1.3.2 cpDNA 提取与纯化

(1) 将叶绿体颗粒重新悬浮于 0.2 ~ 0.5 mL 的缓冲液 B 中, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DNase 和 10 mmol MgCl_2 冰浴 1 h, 以去除核 DNA 污染。

(2) 冰浴结束后, 加入 9 mL 缓冲液 B (含 10 mmol EDTA), 18 000 \times g 离心 20 min, 促使叶绿体沉淀。

(3) 裂解液重新悬浮颗粒, 60 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 30 min, 期间振荡数次。

(4) 加入 1/3 体积预冷的 5 mol 乙酸钾, 轻轻混匀后冰浴 30 min, 促使蛋白、脂类、SDS 络合物沉淀, 冰浴期间不时将液体振荡混匀。

(5) 20 000 \times g 离心 20 min, 轻轻将上清液转移至新的离心管中, 20 000 \times g 再次离心 10 min, 去除残留悬浮碎片。

(6) 取上清液至一干净离心管中, 加入 1/2 体积异丙醇, 1/20 体积 5 mol 乙酸铵, 轻轻颠倒混匀后 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存过夜。

(7) 20 000 \times g 离心 15 min, 得 DNA 沉淀, 70% 乙醇洗涤 DNA 沉淀 2 次, 弃乙醇, DNA 风干 5 ~ 10 min。

(8) 200 μL TE 缓冲液 (50 mmol Tris、10 mmol EDTA, pH 8.0) 溶解 DNA, 转入 Microfuge 离心管中, 20 000 \times g 离心 10 min, 去除未溶解的细胞碎片, 重新将上清液转入新的离心管中, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

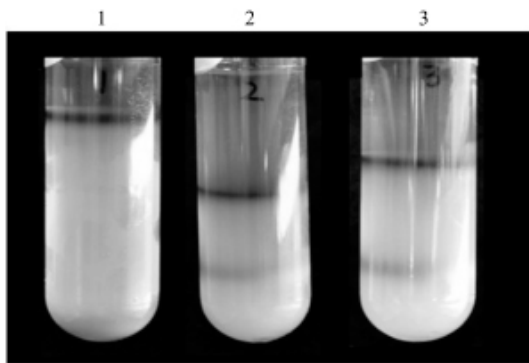
1.3.3 cpDNA 检测

利用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳及紫外分光光度计对所提取的 cpDNA 浓度与纯度进行检测, 并利用通用引物对 *trnH-trnK* 基因间隔区进行 PCR 扩增^[12], 2.0% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增结果, 其中琼脂糖凝胶电泳上样量均为 3 μL 。

2 结果与分析

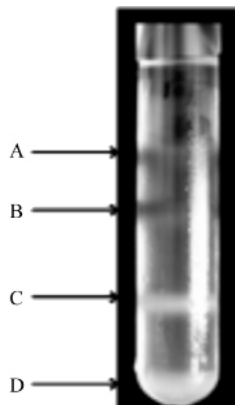
2.1 叶绿体的分离与纯化

图 1 显示 3 种不同浓度 Percoll 分离液对君迁子叶绿体的分离效果, 可以看出 60% 的 Percoll 分离液分离效果最好, 能够较好的将叶绿体分离开。图 2 为君迁子叶绿体在 60% 的 Percoll 分离液中的最终分离结果, 其中 A 为脂质层, B 为破碎细胞层, C 为叶绿体层, D 为杂质层, 各成分分层明显, 分层之间液体清晰透明, 说明 60% Percoll 分离液分离效果好, 能够将叶绿体很好的分离出来, 得到



1~3 浓度分别为 18%、30%、60%, 且油柿、浙江柿和金枣柿的分离效果同此。

图 1 君迁子叶绿体在不同浓度 Percoll 分离液中的分离效果
Fig.1 The results of chloroplast of *D.lotus* in different Percoll gradients



A- 脂质层, B- 破碎细胞层, C- 叶绿体层, D- 杂质层。

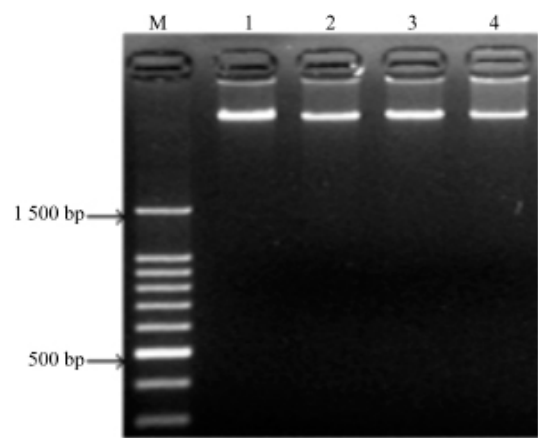
图 2 君迁子叶绿体在 60% 的 Percoll 分离液中的最终分离效果

Fig.2 The final isolation result of chloroplast of *D.lotus* in 60% Percoll

较纯的叶绿体颗粒。油柿、浙江柿和金枣柿叶绿体也是在 60% 的 Percoll 分离液中分离效果最好。

2.2 cpDNA 提取

琼脂糖凝胶电泳检测结果见图 3, 可以看出利用上述提取方法, 4 个样品均可得到较纯 cpDNA, 电泳条带清晰整齐, 无杂带, 无拖尾现象, 点样孔中无杂质, 所提取的 DNA 完整, 纯度较高。且对比 Marker 中标准条带的明亮程度 (500 bp 条带为 100 $\text{ng}/\mu\text{L}$), 可知四个样品 cpDNA 浓度均高于 100 $\text{ng}/\mu\text{L}$, 其中君迁子和浙江柿 DNA 浓度略高于油柿和金枣柿。



M-100 bp DNA Ladder; 1- 君迁子 cpDNA; 2- 油柿 cpDNA; 3- 浙江柿 cpDNA; 4- 金枣柿。

图 3 cpDNA 的琼脂糖凝胶电泳检测结果
Fig.3 cpDNA determined with agarose gel electrophoresis

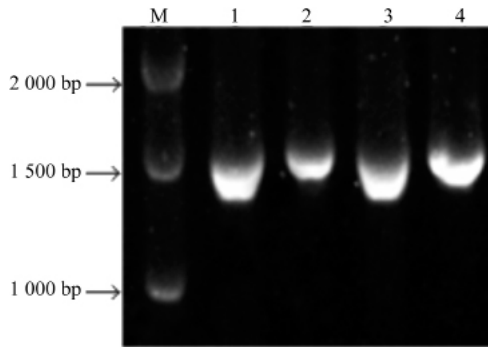
表 2 为紫外分光光度计检测各样品 DNA 浓度及纯度, 结果显示 4 个样品所提取的 cpDNA 的 A260/A280 值在 1.90 左右, 说明 DNA 中蛋白质等大分子杂质少, 纯度较高; A260/A230 的值均大于 2.0, 说明 DNA 中无多糖等杂质; 4 个样品相对比, 君迁子、浙江柿 DNA 纯度比油柿、金枣柿要稍微高些, 但差别不大。浓度大小显示, 浙江柿最高为 1 210.50 $\text{ng}/\mu\text{L}$, 其次为君迁子 1 139.21 $\text{ng}/\mu\text{L}$, 油柿为 1 034.52 $\text{ng}/\mu\text{L}$, 最低的为金枣柿 870.76 $\text{ng}/\mu\text{L}$, 结果与琼脂糖凝胶电泳结果基本一致, 进一步说明优化后的 DNA 提取方法能够有效去除柿属植物叶片中的多酚、多糖等物质, 得到较高纯度的 cpDNA, 并且此方法适用于柿属不同植物叶片叶绿体 DNA 提取, 方法稳定可靠。

2.3 PCR 扩增检测

图 4 为 PCR 扩增结果, 可以看出 4 个样品经过 PCR 扩增均能得到大小为 1 500 bp 左右的单一清晰目的产物, 说明所提取的 DNA 为叶绿体

表 2 DNA 紫外分光光度计检测结果
Table 2 The results of ultraviolet spectrophotometer

样品名	A260/A280	A260/A230	浓度/(ng·μL ⁻¹)
君迁子	1.94	2.34	1 139.21
油柿	1.87	2.12	1 034.52
浙江柿	1.93	2.45	1 210.50
金枣柿	1.90	2.01	870.76



M-500 bp DNA Ladder; 1- 君迁子 cpDNA; 2- 油柿 cpDNA; 3- 浙江柿 cpDNA; 4- 金枣柿。

图 4 PCR 扩增产物检测结果
Fig.4 PCR amplification results

DNA, 质量较好纯度较高, 能够满足后续分子生物学试验, 电泳图中可以预测 4 个样品叶绿体基因组中 *trnH-trnK* 片段长度大小略有不同, 此区域序列可能存在小片段的插入或缺失, 具体情况可通过后续基因组测序进行验证。

3 结论与讨论

高盐低 pH 法是分离提取植物 cpDNA 的有效方法^[13-15], 但是与之相比, Percoll 密度梯度离心法具有快速、高效的优点^[16]。有效分离叶绿体颗粒, 避免细胞核、线粒体等污染, 是叶绿体 DNA 提取的关键, 本研究利用 60% 浓度的 Percoll 分离液对叶绿体进行分离, 同时结合密度梯度离心法, 能够有效去除细胞核、线粒体及细胞碎片等, 得到较纯叶绿体, 方法简单易行。柿属植物叶片中富含黄酮、单宁等多酚类物质^[17], 在 DNA 提取过程中容易氧化, 对 DNA 提取造成一定困难, 本试验提取缓冲液中加入 PVP、抗坏血酸等试剂, 能够有效防止多酚氧化, 确保 DNA 提取质量, 检测结果显示所提取的 DNA 完整, 杂质少纯度高, 能够满足后续 PCR 扩增、基因组测序等分子生物学试验, 优化的提取方法操作简单, 稳定可靠, 适用于不同柿属植物叶绿体 DNA 的提取。

DNA 提取过程中发现, 君迁子、浙江柿提取效果较油柿、金枣柿要好, 深入分析发现 4 种柿属植物叶片形态特征具有很大差异, 其中油柿叶

片柔软, 表面密被绒毛; 而金枣柿叶片质地脆硬, 表面光滑、有金属光泽, 且叶脉明显主脉基部有腺体; 君迁子、浙江柿叶片形态特征较为相似, 叶片纸质柔软, 表面绒毛少, 不同的叶片结构, 特别是质地与绒毛多少, 可能对提取效果有一定影响。此外, 根据已有报道, 4 种植物叶片中次级代谢产物含量存在较大差异, 金枣柿叶片中维生素 C 等次级代谢物含量较高^[18], 这可能影响了 DNA 提取得率, 具体影响因素还需进一步的试验加以验证。

参考文献:

- [1] 李树钢. 中国植物志 (第 60 卷第 1 分册) [M]. 北京: 北京科学出版社, 1987: 84.
- [2] 孙鹏, 傅建敏, 周道顺, 等. 柿属植物种子表型多样性及其萌发与幼苗生长研究 [J]. 中南林业科技大学学报, 2013, 33(11): 19-25.
- [3] 李高潮, 杨勇, 王仁梓. 中国原产柿品种资源 [J]. 中国种业, 2006, (4): 52-53.
- [4] 郭大龙. 几种分子标记技术的建立及其在部分柿属植物亲缘关系研究中的应用 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2006.
- [5] ZhaobinJing, Xiaofeng Ruan, Renzi Wang, *et al.* Genetic diversity and relationships between and within persimmon (*Diospyros L.*) wild species and cultivated varieties by SRAP markers [J]. Plant Systematics and Evolution, 2013, 8(299):1485-1492.
- [6] 李宏韬, 赵淑青, 张慧. 叶绿体基因工程简介 [J]. 遗传, 2003, 25(4): 495-498.
- [7] 张韵洁, 李德铎. 叶绿体系统发育基因组学的研究进展 [J]. 植物分类与资源学报, 2011, 33(4): 365-375.
- [8] 郝海叶, 张洋, 那冬晨. 景天属植物叶绿体 DNA 与核 DNA 分步提取方法研究 [J]. 安徽农业科学, 2013, 41(25): 10230-10231.
- [9] 朱海林, 刘秀明, 江莺, 等. 苜蓿叶绿体 DNA 的提取及其 RbcL 基因片段的克隆 [J]. 安徽农业科学, 2011, 39(22): 13306-13308.
- [10] 牟少华, 郗光发, 彭镇华, 等. 部分箬竹属植物的叶绿体 DNA 分析 [J]. 安徽农业科学, 2010, 38(23): 12374-12376.
- [11] Weijian Bei, Linqun Zang, Jiao Guo, *et al.* Neuroprotective effects of a standardized flavonoid extract from *Diospyros kaki* leaves [J]. Journal of ethnopharmacology, 2009, 126(1): 134-142.
- [12] Demesure B, Sodji N, Petit R J. A set of universal primers for amplification of polymorphic non-coding regions of mitochondrial and chloroplast DNA in plants [J]. Mol. Ecol., 1995, 4: 129-131.

(下转第 33 页)

- 综述 [J]. 安徽农业科学, 2009, 37(16): 7746-7750.
- [2] 汪 丽, 崔 彤. 林分调查中蓄积量测定方法的探讨 [J]. 内蒙古林业调查设计, 2013, 36(1): 56-57.
- [3] Widlowski J L, Pinty B, Gobron N, *et al.* Detection and characterization of boreal coniferous forests from remote sensing data[J]. Journal of GeoPhysical Research- Atmospheres, 2001, 106: 33405-33419.
- [4] Trotter C M, Dymond J R, Goulding C J. Estimation of timber volume in a coniferous Plantation forest using LANDSAT TM[J]. International Journal of Remote Sensing, 1997, 18(10): 2209-2223.
- [5] Dong J R, Kaufmann R K, Myneni R B, *et al.* Remote sensing estimates of boreal and temperate forest woody biomass: carbon, pools, sources, and sinks[J]. Remote Sensing of Environment, 2003, 84: 393-410.
- [6] Makela H, Pekkarinen A. Estimation of forest stands volumes by LANDSAT TM imagery and stand-level field inventory data[J]. Forest Ecology and Management, 2004, 196: 245-255.
- [7] 洪奕丰, 林 辉, 严恩萍, 等. 基于偏最小二乘法的平南县森林蓄积量估测模型研究 [J]. 中南林业科技大学学报, 2011, 31(7): 80-85.
- [8] 杨永恬. 基于多源遥感数据的森林蓄积量估测方法研究 [D]. 北京: 中国林业科学研究院, 2010.
- [9] 涂云燕, 彭道黎. 基于 RS 的森林蓄积量主成分回归估测 [J]. 东北林业大学学报, 2012, 40(10): 75-77.
- [10] 余坤勇, 林 芳, 刘 健, 等. 基于 RS 的闽江流域马尾松林分蓄积量估测模型研究 [J]. 福建林业科技, 2006, 33(1): 16-23.
- [11] 黄伟平, 谭三清, 张 贵, 等. 估测森林蓄积量的遥感因子选择研究 [J]. 中南林业科技大学学报, 2010, 30(4): 112-115.
- [12] 马瑞兰, 李卫忠. 基于 SPOT5 遥感影像选择森林蓄积估测因子——以火地塘教学实验林场为例 [J]. 东北林业大学学报, 2011, 39(7): 111-112, 137.
- [13] James M, Latt in J, Douglas Carroll, *et al.* Analyzing Multivariate Data[M]. United States of America: Brooks/ Cole, 2007: 45-46.
- [14] 孙道德. 基于残差平方和的线性模型选择简单方法及其相合性研究 [J]. 数学杂志, 2006, 26(6): 642-646.
- [15] 刘志华, 常 禹, 陈宏伟. 基于遥感、地理信息系统和人工神经网络的呼中林区森林蓄积量估测 [J]. 应用生态学报, 2008, 19(9): 1891-1896.

[本文编校：文凤鸣]

（上接第 28 页）

- [13] 崔彬彬, 李 云, 冯大领, 等. 杨树叶绿体分离及叶绿体 DNA 提取方法的研究 [J]. 保定师范专科学校学报, 2006, 19(2): 25-27.
- [14] 龙 兴, 曾继吾, 黄秉智, 等. 香蕉叶绿体分离及叶绿体 DNA 提取方法 [J]. 江西农业大学学报, 2008, 30(3): 534-542.
- [15] 崔 杰, 李滨胜, 杨 谦. 甜菜叶绿体 DNA 分离纯化方法 [J]. 中国糖料, 2005, (3): 29-31.
- [16] 郑建树, 喻春明, 陈 平, 等. 苧麻叶绿体 DNA 的提取及分析 [J]. 中国麻业科学, 2012, 35(5): 239-252.
- [17] 费学谦, 周立红, 龚榜初. 不同柿种柿叶维生素 C 和酚类物质的差异 [J]. 林业科学研究, 2004, (05): 616-622.
- [18] 张嘉嘉, 孙 鹏, 周道顺, 等. 高效测定柿叶中维生素 C 的反相液相色谱法 [J]. 计算机与应用化学, 2013, 30(11): 1379-1382.

[本文编校：文凤鸣]