

# 排除酚类物质干扰提取棉苗线粒体DNA 的 简易方法\*

王学德 朱 军 朱英国 浙江农业大学农学系 杭州 310029

**摘要** 提出一种排除酚类物质干扰提取棉苗线粒体DNA (mitochondrial DNA, mtDNA) 的简便和经济的方法。本法提取的mtDNA 易被限制性内切酶酶切, 适用于southern 杂交, PCR 扩增和分子克隆。

**关键词** 棉苗 线粒体DNA 提取方法

**中图分类号** S562: Q 78

## A Simple Procedure for Isolation of Mitochondrial DNA from Cotton Seedlings by Avoiding Disturbance of Phenolic Compounds

Wang Xuede Zhu Jun

Agronomy Department, Zhejiang Agricultural University, Hangzhou 310029

Zhu Yingguo College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072

**Abstract** A simple procedure for isolation of mitochondrial DNA (mtDNA) from cotton seedlings (*Gossypium hirsutum* L.) has been developed. The mtDNA obtained with this procedure can be digested with restriction endonuclease and is available for Southern blot analysis, PCR amplification and ligation reaction.

**Key words** cotton seedlings mitochondrial DNA isolation procedure

棉花的根、茎、叶等器官组织中含有大量的色素腺体, 酚类化合物主要存在于这种腺体中, 其中棉酚占主要成分。如棉子仁的棉酚含量约占总重量的0.1%, 高的可达1.0%。棉酚含有酚基和羟基, 是一类相当活泼的化合物, 在植物细胞破碎时能与核酸作用形成稳定的不可逆的复合物<sup>[1-2]</sup>。用常规的苯酚/氯仿抽提方法获得的棉花DNA 常呈棕褐色, 不易被限制

\* 收稿日期 1997—08—15, 中国博士后科学基金和国家教委博士点专项科学基金资助课题  
武汉大学生命科学院 武汉 430072

性内切酶酶切<sup>[1-3]</sup>。国外,常用氯化铯梯度超速离心法,虽可获高纯度的DNA,但因费用高和设备限制,在国内普通实验室不易适应。国内,翁坚等用有机溶剂(醇、醚和酮)预处理棉子以除去脂肪和棉酚等干扰物质,然后再提取DNA<sup>[1]</sup>。这种剧烈的预处理难免导致细胞内各种细胞器的破裂,若以提取细胞总DNA为目的,这是适用的。但以提取线粒体或叶绿体DNA为目的,这种预处理显然是不适用的,因为需要保证细胞器在裂解前不破裂,以免不同细胞器内的DNA交叉污染。

我们为了研究棉花细胞质雄性不育的分子生物学机理(线粒体基因组突变与细胞质雄性不育的关系),在提取棉花mDNA的技术方面进行了探索,其目的是寻找一种既避开高费用氯化铯超速离心又能获得高纯度和高分子量mDNA的提取方法,为棉花mDNA的分子操作奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

具哈克尼西棉细胞质的陆地棉核类型的雄性不育系DES—HAM S277作为供试材料。种子经100g硫酸脱绒后,用自来水冲洗和在0.1%氯化汞溶液中浸泡约1h灭菌。无菌种子播于经高压灭菌过的湿润黄砂中,在37℃黑暗中发芽和生长。当黄化苗长至约5cm高时,剪取茎和子叶备用。

### 1.2 线粒体的分离和mDNA提取

以下操作除注明外均在4℃条件下进行。取50g黄化苗于200mL匀浆缓冲液A(1.2mol·L<sup>-1</sup>NaCl,0.05mol·L<sup>-1</sup>Tris-HCl,pH8.0)中,高速匀浆1min,用6层纱布过滤匀浆液,滤液经1000×g离心10min后,取上清液在16000×g离心45min以沉淀线粒体。粗制线粒体悬浮于10mL缓冲液B(0.3mol·L<sup>-1</sup>甘露醇,0.05mol·L<sup>-1</sup>Tris-HCl,pH7.2,5mmol·L<sup>-1</sup>MgCl<sub>2</sub>)中,加DNase I至终浓度为50μg·L<sup>-1</sup>在4℃反应1h以除去线粒体外的核DNA。在3mL超速离心管内依次加入用缓冲液C(10mmol·L<sup>-1</sup>Tris-HCl,20mmol·L<sup>-1</sup>EDTA,pH7.2)配制的52%和36%蔗糖溶液各1mL,再将1mL粗制线粒体平铺于蔗糖液面上,用SW<sub>60</sub>水平转头于35000r·min<sup>-1</sup>梯度离心40min。收集52%与36%界面中的线粒体于另一新离心管中,加3倍体积的缓冲液C于12000×g离心10min,沉淀即为纯化的线粒体。合并的线粒体在15mL缓冲液D(100mmol·L<sup>-1</sup>Tris-HCl,pH8.0,50mmol·L<sup>-1</sup>EDTA,500mmol·L<sup>-1</sup>NaCl)中裂解,加1mL20%SDS,摇匀后在36℃水浴10min,加5mL5mol·L<sup>-1</sup>乙酸钾,在冰块中置20min后,12000×g离心30min,取上清液于新管中,加10mL异丙醇,混匀后置-20℃30min,12000×g离心10min沉淀粗制mDNA。DNA稍干

后溶  $T_{50}E_{10}$  溶液 ( $50\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  Tris-HCl, pH 8.0,  $10\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  EDTA), 再离心去沉淀, 在上清液中加入 RNase ( $10\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )  $20\mu\text{l}$ ,  $37^\circ\text{C}$  水浴 15 min。加入等体积的  $T_{10}E_1$  溶液饱和的苯酚, 离心后取上层水相, 再用氯仿抽提 1~2 次。加入  $1/10$  体积  $3\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  NaAc 和 2 倍体积无水乙醇,  $-20^\circ\text{C}$  过夜,  $12000 \times g$  离心 5 min 沉淀 DNA, 再用冷的 70% 乙醇洗 2 次。DNA 经干燥后, 溶于  $100\sim 150\mu\text{l}$  的  $T_{10}E_1$  溶液, 置  $-20^\circ\text{C}$  冰箱中备用。

### 1.3 mDNA 的限制性内切酶酶切及琼脂糖凝胶电泳

取  $1\sim 1.5\mu\text{g}$  DNA, 用过量 ( $10\sim 20$  个单位) 的限制性内切酶 HindIII (购自德国宝灵曼公司), 按厂家提供的反应条件, 消化 6~8 h。酶切样品 0.8% 琼脂糖水平凝胶 (长 30 cm) 中电泳 (TBE 电泳缓冲液), 电压  $1\sim 5\text{V} \cdot \text{cm}^{-1}$ , 电泳时间约 24 h。电泳结束后凝胶在含  $0.5\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  溴化乙锭 (EB) 的 TBE 溶液中染色 1 h, 紫外灯下观察和照相。

### 1.4 PCR 扩增

PCR 反应在 25 mL 体积中进行, 其中含有  $10\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  Tris-HCl (pH 8.3),  $50\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  KCl,  $2.0\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  MgCl<sub>2</sub>, 0.001% 明胶  $100\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  dNTP, 15 ng 10 聚体随机引物, 25 ng mDNA, 2.0 单位的 Taq 酶。扩增反应在 Perkin-Elmer 扩增仪 (480 型) 上进行。整个程序为  $94^\circ\text{C}$  1 min,  $37^\circ\text{C}$  1 min,  $72^\circ\text{C}$  2 min, 35 个循环后再在  $72^\circ\text{C}$  延伸 5 min。扩增产物在 1.0% 琼脂糖胶上电泳, EB 染色, 紫外灯下照相记录。

### 1.5 Southern 杂交和分子克隆

采用德国宝灵曼公司生产的 DIG DNA Labeling Kit 中的试剂和方法标记线粒体基因 rrn26s。用 HindIII 酶切的 mtDNA 片段经电泳分离后, 转印至尼龙膜上,  $120^\circ\text{C}$  烘干 15~30 min。然后用 DIG Nucleic Acid Detection Kit 中的试剂和方法, 将标记的 rrn26s 与印渍在尼龙膜上的 mtDNA 酶切片段进行杂交和显色。mtDNA/HindIII 酶切片段经低熔点琼脂糖胶电泳分离, 回收约 1.0 kb 左右的片段。按常规的分子克隆方法将 mtDNA 片段连接在 pGEM-6Zf(+) 载体上, 转化感受态细胞 (JM 109), 挑取重组克隆, 提取其质粒, 经 HindIII 酶切后在琼脂糖胶上电泳, EB 染色和照相。

## 2 结果与讨论

### 2.1 NaCl 作为匀浆缓冲液的渗压剂

在多数植物的 mDNA 提取方法中, 常用甘露醇作为匀浆缓冲液的渗压剂。我们经过比较, 以 NaCl 作为匀浆缓冲液的渗压剂为佳 (图 1-A)。从图 1-A 可看出三点, 第一, 采用以 NaCl 作为渗压剂的匀浆缓冲液 (第 4 泳道) 提取的 mDNA 纯度较高, 基本上没有核 DNA 污染; 相反, 以甘露醇作渗压剂的匀浆缓冲液 (第 2 泳道) 提取的 mDNA 有少量核 DNA 污

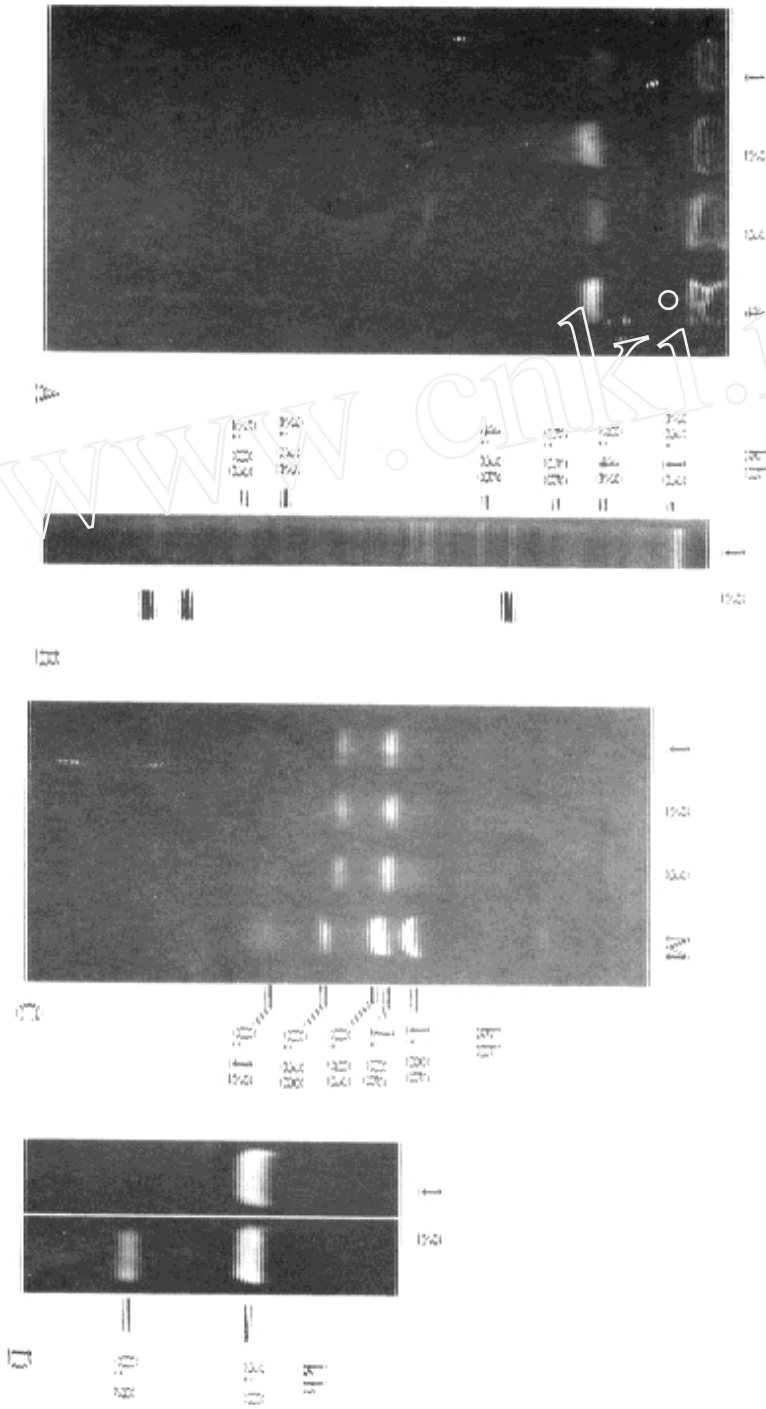


图1 棉花mtDNA的分析

A. 用不同匀浆缓冲液和不同匀浆速度提取的未酶切的棉花mtDNA的琼脂糖凝胶电泳。在匀浆缓冲液中分别以 $0.3\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 甘露醇(1~2泳道)和 $1.2\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl(3~4泳道)作为渗透剂,在匀浆器中高速匀浆(2和4泳道)和在研钵中低速匀浆(1和3泳道)。

B. Hind III酶切的棉花mtDNA的琼脂糖凝胶电泳图谱(1泳道)。印渍在尼龙膜上的mtDNA片段与线粒体基因rrn26s探针杂交(2泳道)。

C. 在10聚体随机引物(OPAH5, 5'-TTGCA GGCA G-3')引导下,从棉花mtDNA中扩增出的PCR产物。M为pBR322 DNA/ $\beta$ stN I

D. pGEM-7ZT(+ )载体(1泳道)和两个带有棉花mtDNA片段的经Hind III酶切的重组质粒(2~3泳道)的电泳结果。

染; 第二, 匀浆速度对单位重量黄化苗提取的m tDNA 量有明显影响, 在匀浆器中高速匀浆(第2和第4泳道)比在研钵中低速匀浆能获得更多m tDNA 量(第1和第3泳道); 第三,m tDNA 分子量大,基本上无降解。

## 2.2 在酚/氯仿抽提前用异丙醇沉淀m tDNA

在常规方法中,提取和纯化线粒体后一般直接用苯酚和氯仿抽提m tDNA<sup>[4]</sup>。但是,在棉花中直接用苯酚和氯仿抽提得到的m tDNA 总是棕褐色的,很难被限制性内切酶切割。为此,我们在酚/氯仿抽提前,插入异丙醇沉淀m tDNA 这一环节,则能获得较好的结果,即避免了DNA 棕褐色现象。如图1- B 所示,经异丙醇沉淀后再进行酚/氯仿纯化的m tDNA 易被限制性内切酶(H indIII)消化,在琼脂糖凝胶上电泳显示出清晰的条带(第1泳道);以线粒体基因 rrm26s 为探针,与转印在尼膜上的m tDNA 酶切片段进行 Southern 杂交,产生三条清晰的杂交带(第2泳道)。图1- C 是在10聚体随机引物(OPAH5)的引导下,对本法提取的m tDNA 进行随机扩增,其产物在琼脂糖胶上电泳的结果;在第1~3泳道中,可见棉花m tDNA 中扩增出的两条带。如图1- D 所示,m tDNA /H indIII酶切片段,在DNA 连接酶的催化下,能插入pGEM - 7Zf(+ )载体中,两个重组克隆的质粒经H indIII酶切后在胶上能分离出插入的m tDNA 片段(1.5Kb 和0.9Kb)。

以上结果表明,本方法提取的棉花m tDNA ,其分子量、纯度和产量均较高,适用于限制性内切酶的酶切反应,Southern 杂交,聚合酶链反应和DNA 连接反应。本法的最大优点是避开了高费用的氯化铯梯度超速离心过程,适用于在普通实验室操作。本法的主要改进之处是,NaCl 作为匀浆缓冲液中的渗压剂以及在酚/氯仿抽提前用异丙醇沉淀m tDNA。虽然,改进之处在提取m tDNA 过程中所起的作用机理尚不清楚,但是,改进之处具有抑制DNA 被酚类物质氧化而形成不可逆的复合物的可能性是存在的。

## 参考文献

- 1 翁坚,赵继芬. 海岛棉(*Gossypium barbadense*)DNA 的提纯. 植物生理学报,1979,5(4) 343~ 348
- 2 Dabo SM, Mitchell ED et al A method for the isolation of nuclear DNA from cotton (*Gossypium*) leaves Anal biochem., 1993, 210 34~ 38
- 3 Katteman FRH and Shattuck VI An effective method of DNA isolation from the mature leaves of *Gossypium* species that contain large amounts of phenolic compounds and tannins Prep. Biochem., 1983, 13(4) 347~ 359
- 4 Shuster W, Hiesel R et al Isolation and analysis of plant mitochondrial and their genomes In Plant Molecular biology A Practical Approach edited by C. H. Shaw, IRL Press, England, 1988 79~ 102