

苦瓜基因组 DNA 提取方法的比较研究

纪元^{1,2}, 侯北伟¹, 罗玉明^{1,2}

(1. 南京师范大学生命科学学院, 江苏 南京 210046)

(2. 淮阴师范学院生命科学院, 江苏省环洪泽湖生态农业生物技术重点实验室, 江苏 淮安 223300)

[摘要] 针对苦瓜富含多酚类化合物和多糖等物质的特点,以新鲜苦瓜叶片为材料,分别采用改良 CTAB 法、QIAGEN 试剂盒、CTAB 法提取基因组 DNA,并对 DNA 进行纯度和浓度的检测,同时开展了 SRAP 验证。结果表明:使用改良 CTAB 法从苦瓜叶片中提取基因组 DNA,其纯度高、质量好、相对分子量大,多酚类化合物和多糖等杂质去除比较完全。SRAP 标记验证显示,条带清晰、多态性好。因此改良 CTAB 法适用于高质量提取苦瓜基因组 DNA,并能满足 SRAP 等分子标记对 DNA 的要求。

[关键词] 苦瓜, DNA 提取, 改良 CTAB 法, SRAP

[中图分类号] Q949.782 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1001-4616(2012)02-0089-04

Comparison of DNA Extraction Methods From Leaves of *Momordica Charantia* (Cucurbitaceae)

Ji Yuan^{1,2}, Hou Beiwei¹, Luo Yuming^{1,2}

(1. School of Life Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing 210046, China)

(2. Jiangsu Key Laboratory for Eco-Agricultural Biotechnology around Hongze Lake, School of Life Sciences, Huaiyin Normal University, Huai'an 223300, China)

Abstract: Because of polysaccharides and polyphenolic and other interfering compounds in leaves of *Momordica charantia* (Cucurbitaceae), the genomic DNA extraction of methods namely modified CTAB, Dneasy Kit and CTAB were compared. Then the quality and purified of extracted DNA was detected, and high quality DNA was measured by sequence-related amplified polymorphism (SRAP) markers. The results showed that modified CTAB method could be used to extract DNA from leaves of *M. charantia*, with high quality, high purify, high relative molecular mass and low interfering compounds. SPAP markers detection was also shown clear bands and good polymorphism. So, the modified CTAB method was suitable for the extraction of genomic DNA from *M. charantia*, which was also available to further SRAP or other molecular markers study.

Key words: *Momordica charantia* Linn., DNA extraction, modified methods of CTAB, SRAP

苦瓜(*Momordica charantia* Linn.)又名锦荔枝、癞葡萄、红姑娘等,英文中又称为 Bitter gourd, Bitter melon, 或者 Balsam pear, 为葫芦科(Cucurbitaceae)、苦瓜属(*Momordica* L.)一年生草本植物。苦瓜作为食用兼药用栽培种,目前已经在世界广泛分布^[1,2]。亚洲苦瓜起源于非洲热带地区^[3],而印度东部、中国南部可能是亚洲苦瓜栽培种的驯化中心^[4]。1997年,中国已经有177份苦瓜栽培种入库保存,广泛分布于南方的广东、广西、福建、湖南、四川、贵州等地区^[5]。苦瓜富含多种生物活性成分,据《本草纲目》记载,苦瓜味苦性寒,具有除邪热、解劳乏、清心明目等功效,是一种很重要的蔬菜,被称为“药用蔬菜”。

鉴于苦瓜具有很高的营养和药用价值,目前中国、印度等学者已经初步利用不同的分子标记开展了苦瓜野生种及栽培种的遗传多样性研究^[4,6-11],但针对苦瓜栽培种的驯化历史、居群遗传学,及分子辅助育种等研究才刚刚起步。基因组 DNA 的提取是植物分子水平研究的基础,提取高质量的 DNA,选择适宜的 DNA 提取

收稿日期: 2012-03-02.

基金项目: 江苏省环洪泽湖生态农业生物技术重点实验室开放课题(HZHL1007)。

通讯联系人: 罗玉明, 教授, 研究方向: 植物资源与生物技术. E-mail: yumingluo@163.com

方法至关重要。苦瓜富含多酚类化合物和多糖等物质,在预试验中选用常规 CTAB 法不能得到高质量的基因组 DNA,对后续的分子标记研究造成了一定的影响。因此本实验对常规 CTAB 法进行了改良,与 QIAGEN 试剂盒提取的 DNA 作了对比,以期提取出高质量的苦瓜基因组 DNA,并利用 SRAP(Sequence-related amplified polymorphism)分子标记进行验证,旨在为苦瓜栽培种的居群遗传学研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂及仪器

供试苦瓜材料为6个不同的栽培品种,分别是 KG-M2、绿先锋、田美8号、黑子大顶、百万发、黑子油瓜,均由淮安市农科院提供。

实验试剂: EDTA(Ethylenediaminetetraacetic acid, 乙二胺四乙酸)、Tris(Tris(Hydroxymethyl)aminomethane, 三羟甲基氨基甲烷)、CTAB(Hexadecyl trimethyl ammonium Bromide, 十六烷基三甲基溴化胺)、PVP 40(Polyvinylpyrrolidone, 聚乙烯吡咯烷酮)、 β -巯基乙醇、RNaseA 酶,均购自 Sigma 公司;无水乙醇、氯仿、异丙醇、异戊醇、溴酚蓝等为国产分析纯;Taq DNA polymerase、DL2000 DNA Marker 和 DL500 DNA Marker 购自 TaKaRa 公司;SRAP 随机引物由上海生工合成。

实验仪器: 高速冷冻离心机(Centrifuge 5430R, Eppendorf 公司)、PCR 仪(Mastecycler Pro S, Eppendorf 公司)、琼脂糖水平电泳槽(Bio-rad 公司)和 UVP 凝胶成像系统(UVP GSD-8000, UVP 公司)等。

1.2 DNA 提取方法

1.2.1 改良 CTAB 法

改良 CTAB 法仍以 CTAB 萃取液作为 DNA 抽提液,具体步骤如下: (1) 研钵中加新鲜的苦瓜叶片 1.0 g,加少量聚乙烯吡咯烷酮(PVP 40),用液氮充分研磨; (2) 迅速将叶片粉末装入含有已预热的 700 μ L CTAB 提取液中,充分混匀,65 $^{\circ}$ C 水浴 1 h,水浴中颠倒离心管以混合样品数次; (3) 加等体积氯仿,轻摇 10 min,7 000 rpm 离心 10 min; (4) 取上清液于新的离心管,加等体积 $V(\text{酚}):V(\text{氯仿}):V(\text{异戊醇})=25:24:1$ 混合液抽提 2 次; (5) 加 1/10 体积的 5 mol/L NaCl 溶液和 2/3 体积的冰异丙醇,颠倒混匀, -20 $^{\circ}$ C 放置 30 min ~ 60 min 沉淀 DNA,7 000 rpm 离心 10 min; (6) 弃上清,用 70% 乙醇洗涤沉淀 2 次,用高盐 TE 溶解后加 RNA 酶,37 $^{\circ}$ C 水浴 30 min ~ 60 min,加 200 μ L 双蒸水,混匀; (7) 加等体积 $V(\text{氯仿}):V(\text{异戊醇})=24:1$ 混合液抽提; (8) 加 2 倍体积的无水乙醇,颠倒混匀, -20 $^{\circ}$ C 放置 30 min ~ 60 min 沉淀 DNA,7 000 rpm 离心 10 min; (9) 弃上清,用 70% 乙醇洗涤沉淀 2 次,风干后用低盐 TE 缓冲液溶解沉淀, -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.2.2 QIAGEN 试剂盒法

供试苦瓜材料利用 Dneasy Plant Mini Kit(QIAGEN)试剂盒提取模板基因组 DNA,具体提取方法参见 QIAGEN 试剂盒使用说明。

1.2.3 常规 CTAB 法

供试苦瓜材料选用常规 CTAB 法提取基因组 DNA,参考 Doyle 提出的植物 DNA 提取方法^[12]。

1.3 基因组 DNA 检测

1.3.1 DNA 质量检测

用 1% 琼脂糖凝胶电泳及溴化乙锭(Ethidium bromide, EB)染色,检测提取基因组 DNA 的质量,在 UVP GSD-8000 凝胶成像系统下观察、成像。

1.3.2 苦瓜基因组 DNA 的浓度检测

取少量 DNA 样品溶液,用 TE 缓冲液稀释,在紫外分光光度计上,测定在 230 nm、260 nm 和 280 nm 处的吸光值,根据 OD_{260}/OD_{280} 、 OD_{260}/OD_{230} 确定 DNA 的纯度,一般认为 OD_{260}/OD_{280} 的值应为 1.8 左右, <1.8 则蛋白质可能未除尽, >1.8 则含有 RNA 杂质或基因组 DNA 已断裂成小片段。 OD_{260}/OD_{230} 的值应 >2.0, <2.0 则可能残存核苷酸、氨基酸、酚、盐等小分子杂质。

根据公式: DNA 浓度(g/mL) = $OD_{260} \times N(\text{稀释倍数}) \times 50$,计算所提取的 DNA 浓度。

1.3.3 SRAP-PCR 检测

对提取的高质量苦瓜基因组 DNA,利用 SRAP 标记进行 PCR 检测。随机选用 SRAP 引物, Me4: 5'-TGA GTC CAA ACC GGA CC-3'; Em4: 5'-GAC TGC GTA CGA ATT TGA-3'。

SRAP-PCR 反应体系为 25 μ L, 包括: 1 \times PCR buffer 2.0 mmol/L $MgCl_2$ 200 μ mol/L dNTPs 0.4 μ mol/L 引物 50 ng 模板 DNA 和 1 U Taq 聚合酶. PCR 程序为: 94 $^{\circ}C$ 预变性 5 min 94 $^{\circ}C$ 变性 1 min 36 $^{\circ}C$ 复性 1 min , 72 $^{\circ}C$ 延伸 1 min 5 个循环后 94 $^{\circ}C$ 变性 1 min 51 $^{\circ}C$ 复性 1 min 72 $^{\circ}C$ 延伸 1 min ,共 30 个循环 72 $^{\circ}C$ 延伸 7 min 4 $^{\circ}C$ 保存. SRAP-PCR 反应产物在含有 0.5 g/L EB 的 2.0% 琼脂糖凝胶中以 5 V/cm 电压电泳分离 , 用 DL2000 的 DNA marker 作为分子量标记 在 UVP GSD-8000 凝胶成像系统上观察、成像.

2 结果与分析

2.1 苦瓜基因组 DNA 的琼脂糖检测

改良 CTAB 法提取的基因组 DNA 沉淀为乳白色胶状 , 风干后呈透明状. 用 1% 琼脂糖电泳检测显示(图 1) ,DNA 条带清晰 没有 RNA 和蛋白质的污染 ,说明该方法适合于 苦瓜基因组 DNA 的提取 ,它可以有效地去除样品中所含的 蛋白质、多糖、酚类等物质 ,从而获得较高质量的 DNA.

QIAGEN 试剂盒法相对改良 CTAB 法而言 提取出来的 苦瓜基因组 DNA 条带较弱 ,但谱带单一、无 DNA 碎片和连片(图 1) . 利用 CATB 法提取基因组 DNA 偶尔也能在凝胶 上看到 DNA 谱带 ,可条带模糊 ,有明显 DNA 碎片 ,DNA 条 带迁移率不一致. 利用 CATB 法在凝胶上检测不到 CTAB 法提取的基因组 DNA 谱带 ,说明 DNA 浓度较低或是没有 提取到 DNA(图 1) .

2.2 苦瓜基因组 DNA 的浓度和纯度检测

将改良 CTAB 法提取的基因组 DNA 稀释后 在紫外分光光度计上检测其在 260 nm 和 280 nm 的吸光 值 ,计算 OD_{260}/OD_{280} 值 结果如表 1 所示. 样品的 OD_{260}/OD_{280} 值均为 1.80 ~ 1.90 ,说明采用改良 CTAB 法 提取的 DNA 纯度较高 没有蛋白质和 RNA 的污染. 经计算所提取的 DNA 浓度均在 200 μ g/mL 以上 均符 合 SRAP 等分子标记对 DNA 质量的要求.

表 1 改良 CATB 法及 QIAGEN 试剂盒法提取苦瓜基因组 DNA 的浓度和纯度
Table 1 DNA concentration and purity extracted from *M. charantia* cultivars
by modified CTAB and Dneasy Kit method

样品来源	DNA 浓度(μ g/mL)		D_{260} nm/ OD_{280} nm		D_{260} nm/ OD_{230} nm	
	改良 CTAB	QIAGEN	改良 CTAB	QIAGEN	改良 CTAB	QIAGEN
KG - M2	430	274.5	1.89	1.92	2	1.98
绿先锋	481.5	317	1.82	1.71	2.25	2.29
田美 8 号	394.5	215	1.87	1.75	2.2	1.79
黑子大顶	476.5	292.5	1.83	1.87	2.13	1.85
百万发	426	234	1.85	1.81	2.08	2.12
黑子油瓜	434.5	268	1.81	1.77	2.11	1.93

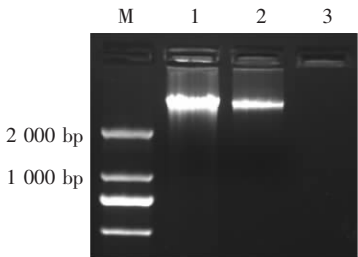
QIAGEN 试剂盒法提取的基因组 DNA 通过紫外分光光度计检测表明 ,DNA 浓度相对改良 CTAB 法 提取的 DNA 浓度较低 ,纯度在参照范围左右有一点波动 ,符合 SRAP 等分子标记对 DNA 质量的要求. CTAB 法提取的基因组 DNA 通过紫外分光光度计检测 ,部分样本未能提取到 DNA 提取到 DNA 样本的 DNA 浓度均较低 不符合分子标记对 DNA 质量的要求.

2.3 苦瓜基因组 DNA 的 SRAP - PCR 检测

对改良 CTAB 法及 QIAGEN 试剂盒法提取的苦瓜基因组 DNA 随机选用了 2 条 SRAP 引物进行了 PCR 扩增检测. QIAGEN 试剂盒法提取的 DNA 需要模板量相对较多 ,而改良 CTAB 法提取的 DNA 用量较 少. 改良 CTAB 法提取的 DNA 扩增条带清晰(图 2) ,说明经过改良的 CTAB 法所提取的 DNA 质量较高 适 合于 SRAP 等分子标记对模板 DNA 浓度的要求.

3 讨论

酚类、糖类等物质能与 DNA 发生不可逆转的结合 ,使其埋在这些粘稠的胶状物质中难以溶解或产生



M. DL2000 DNA Marker; 1. 改良 CTAB 法;
2. QIAGEN 试剂盒法; 3. CTAB 法

图 1 不同 DNA 提取方法提取栽培种 KG-M2 基因组 DNA 的电泳图谱

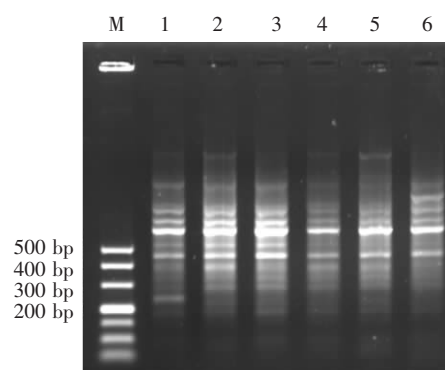
Fig.1 Agarose gel electrophoresis atlas of *M. charantia* cultivar KG-M2 DNA extracted with different methods

不同程度的褐变,影响 DNA 的质量,对反应体系中的酶活产生抑制作用.实验表明常规 CTAB 法不适合苦瓜基因组 DNA 的提取.本实验结合常规 CTAB 法并加以改进,在提取苦瓜基因组 DNA 过程中,加入少量的 PVP 作为酚类物质结合剂,吸附多酚分子上的氢键,形成水不溶性复合物,从而有效防止样品在提取过程中多酚类物质氧化成醌,即防止褐化.同时,PVP 能有效去除多糖,从而降低其对 DNA 的影响^[13].在抽提过程中,先使用 $V(\text{酚}):V(\text{氯仿}):V(\text{异戊醇})=25:24:1$ 混合液抽提,再用 $V(\text{氯仿}):V(\text{异戊醇})=24:1$ 混合液抽提,可有效去除酚类、蛋白质等杂质,纯化后的 DNA 样品条带清晰,无杂蛋白等物质.效果要明显优于只用 $V(\text{氯仿}):V(\text{异戊醇})=24:1$ 混合液进行抽提的效果.除此之外,本实验对 DNA 采取了分 2 步沉淀,这也有别于常规 CTAB 抽提法.

虽然 QIAGEN 试剂盒法提取的苦瓜基因组 DNA 一样满足分子标记的质量要求,可该方法提取的 DNA 浓度相对较低,对苦瓜原材料的需求量较大.另外 Dneasy Plant Mini Kit (QIAGEN) 试剂盒价格昂贵,不适用于大批量苦瓜样本的基因组 DNA 提取.采用改良 CTAB 法提取苦瓜叶片 DNA,操作过程简便,提取的 DNA 质量理想,尤其对于大量样本 DNA 提取时,该方法优点显得尤为突出.高质量的苦瓜基因组 DNA 的提取为苦瓜栽培种的居群遗传学研究及苦瓜种质资源的应用奠定了基础.

[参考文献]

- [1] Basch E, Gabardi S, Ulbricht C. Bitter melon (*Momordica charantia*): a review of efficacy and safety [J]. *Am J Health Syst Pharm*, 2003, 60(4): 356-359.
- [2] Grover J K, Yadav S P. Pharmacological actions and potential uses of *Momordica charantia*: a review [J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2004, 93(1): 123-132.
- [3] Schaefer H, Renner S S. A three-genome phylogeny of *Momordica* (Cucurbitaceae) suggests seven returns from dioecy to monoecy and recent long-distance dispersal to Asia [J]. *Mol Phylogenet Evol*, 2010, 54(2): 553-560.
- [4] Dey S S, Singh A K, Chandel D, et al. Genetic diversity of bitter gourd (*Momordica charantia* L.) genotypes revealed by RAPD markers and agronomic traits [J]. *Sci Hort- Amsterdam*, 2006, 109(1): 21-28.
- [5] 戚春章, 胡是麟, 漆小泉. 中国蔬菜种质资源的种类及分布 [J]. *作物品种资源*, 1997, 1: 1-5.
- [6] Wang S Z, Pan L, Hu K, et al. Development and characterization of polymorphic microsatellite markers in *Momordica charantia* (Cucurbitaceae) [J]. *American Journal of Botany*, 2010, 97(8): E75-E78.
- [7] Behera T K, Gaikward A B, Singh A K, et al. Relative efficiency of DNA markers (RAPD, ISSR and AFLP) in detecting genetic diversity of bitter gourd (*Momordica charantia* L.) [J]. *J Sci Food Agr*, 2008, 88(4): 733-737.
- [8] Behera T K, Singh A K, Staub J E. A comparative analysis of genetic diversity in Indian bitter gourd (*Momordica charantia* L.) genotypes using RAPD and ISSR markers [J]. *Hortscience*, 2007, 42(4): 915-915.
- [9] Behera T K, Singh A K, Staub J E. Comparative analysis of genetic diversity in Indian bitter gourd (*Momordica charantia* L.) using RAPD and ISSR markers for developing crop improvement strategies [J]. *Sci Hort- Amsterdam*, 2008, 115(3): 209-217.
- [10] Singh A K, Behera T K, Chandel D, et al. Assessing genetic relationships among bitter gourd (*Momordica charantia* L.) accessions using inter-simple sequence repeat (ISSR) markers [J]. *J Hort Sci Biotech*, 2007, 82(2): 217-222.
- [11] 温庆放, 李大忠, 朱海生, 等. 不同来源苦瓜遗传亲缘关系 RAPD 分析 [J]. *福建农业学报*, 2005, 20(3): 185-188.
- [12] Doyle J J, Doyle J L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue [J]. *Phytochem Bull*, 1987, 19: 11-15.
- [13] Fang G, Hammar S, Grumet R. A quick and inexpensive method for removing polysaccharides from plant genomic DNA [J]. *Biotechniques*, 1992, 13(1): 52-54.



M. DL500 DNA Marker; 1~6. 苦瓜栽培品种

图2 改良 CTAB 法提取苦瓜基因组 DNA 的 SRAP 扩增检测

Fig.2 PCR amplification results of SRAP primer Me4Em4 from *M. charantia* cultivars DNA extracted by modified CTAB method