



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102533728 B

(45) 授权公告日 2013. 04. 03

(21) 申请号 201110456519. 7

(22) 申请日 2011. 12. 30

(73) 专利权人 中国科学院武汉植物园

地址 430074 湖北省武汉市武昌磨山

(72) 发明人 韩月彭 王鲁 谷超

(74) 专利代理机构 武汉宇晨专利事务所 42001

代理人 黄瑞棠

(51) Int. Cl.

C12N 15/10 (2006. 01)

审查员 马俊凯

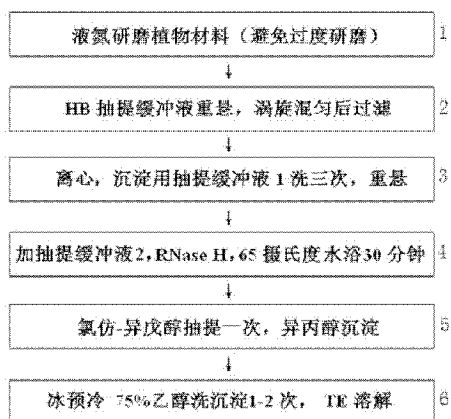
权利要求书 2 页 说明书 4 页 附图 1 页

(54) 发明名称

富含多糖多酚植物高质量细胞核 DNA 的提取方法

(57) 摘要

本发明公开了一种富含多糖多酚植物高质量细胞核 DNA 的提取方法, 涉及植物功能基因组学领域。本发明包括下列步骤: ①液氮研磨植物材料; ② HB 抽提缓冲液重悬, 涡旋混匀后过滤; ③离心, 沉淀用抽提缓冲液 1 洗三次, 重悬; ④使用抽提缓冲液 2, RNase H, 65 摄氏度水浴 30 分钟; ⑤氯仿-异戊醇抽提一次, 异丙醇沉淀; ⑥冰预冷 75% 乙醇洗沉淀 1-2 次, TE 缓冲液溶解。本发明预处理步骤能有效去除线粒体、叶绿体等细胞器 DNA; 避免植物材料中大量存在的多糖、多酚等次生代谢产物对核酸提取步骤产生干扰; 适用于广泛植物种的健康组织, 或细胞结构较完整的冻存组织, 特别适合于后续研究为高通量测序。



1. 一种富含多糖多酚植物细胞核 DNA 的提取方法,其特征在于:

所述的富含多糖多酚植物为苹果,具体步骤如下:

①使用液氮速冻,用研钵和研棒研磨 20 克苹果叶片,迅速转移到 500 毫升冰预冷烧杯中;

②使用 200 毫升冰预冷的 HB 抽提缓冲液浸泡,浸泡前加入 β -巯基乙醇 200 微升,用磁力搅拌泵涡旋混匀 20 分钟,抽提体系用冰降温;

使用双层粗纱布和漏斗过滤,滤过液收集到 250 毫升或 50 毫升离心管中;

③使用固定角转子在冷冻离心机上以 1800g,4 摄氏度离心 20 分钟;

弃去上清,将细胞核沉淀用少量预冷抽提缓冲液 1 轻柔重悬,用预冷抽提缓冲液 1 补足体积到 30 毫升,轻柔混匀后转到 50 毫升离心管内,重复此沉淀-重悬步骤 3 次,离心条件为 1800g,4 摄氏度,离心 15 分钟;

④小心弃去上清,将沉淀用 5 毫升抽提缓冲液 2 和 10 微升浓度为 10mg/mL 的核糖核酸酶 H 溶液重悬;

水浴 65 摄氏度,保温 30 分钟;

⑤加入 5 毫升氯仿抽提液轻柔颠倒混匀;

所述的氯仿抽提液为:24 份体积的氯仿加 1 份体积的异戊醇;

室温离心,12000g,15 分钟;

收集上清液 4.5 毫升,加入冰预冷异丙醇 3 毫升;

混匀,放置于 -20 摄氏度沉淀 1 小时;

4 摄氏度离心,12000g,15 分钟;

⑥弃去上清,加入 5 毫升冰预冷 75%乙醇,洗 1-2 次,4 摄氏度离心,12000g,5 分钟;

所述的 75%乙醇是 75 毫升无水乙醇加蒸馏水至总体积 100 毫升配置而成;

弃去上清,室温晾干半小时,加入 500 微升灭菌 TE 缓冲液溶解;

所述的 HB 抽提缓冲液是:

0.5M 蔗糖,

10mM Tris-HCl, pH7.0,

80mM KCl,

10mM 乙二胺四乙酸钠,

1mM 亚精胺,

1mM 精胺,其中所述的亚精胺和精胺是在临使用前加入 HB 抽提缓冲液;

所述的抽提缓冲液 1 是:

50mM Tris-HCl, pH8.0,

5mM 乙二胺四乙酸钠, pH8.0,

350mM 山梨醇,

100g/L 聚乙二醇 6000;

0.1%巯基乙醇,其中所述的 0.1%为体积/体积比,巯基乙醇是在临使用前加入抽提缓冲液 1;

所述的抽提缓冲液 2 是:

50mM Tris-HCl, pH8.0,

5mM 乙二胺四乙酸钠, pH8.0,
350mM 山梨醇,
10g/L 十二烷基磺酸钠,
710mM NaCl,
0.1%十六烷基三甲基溴化铵,
0.1%巯基乙醇,其中所述的巯基乙醇 0.1%为体积 / 体积比,巯基乙醇是在临使用前
加入抽提缓冲液 2 ;
所述的 TE 缓冲液是 :
10mM Tris-HCl, pH8.0,
1mM 乙二胺四乙酸钠, pH8.0。

富含多糖多酚植物高质量细胞核 DNA 的提取方法

技术领域

[0001] 本发明涉及植物功能基因组学领域,尤其涉及一种富含多糖多酚植物高质量细胞核 DNA 的提取方法;本方法快速、便捷,适用于高通量测序或构建文库。

背景技术

[0002] 随着高通量测序技术的快速发展和测序成本大幅度的降低,基因组测序和重测序已成为植物基因组学研究的一个重要内容。高质量细胞核 DNA(脱氧核糖核酸)获取是高通量测序的基础。目前,用于高通量测序或者构建基因组文库的细胞核 DNA 一般采用 SDS 法(十二烷基苯磺酸钠)、CTAB 法(十六烷基三甲基溴化铵)或基于硅胶基质的吸附离心柱等方法提取。对于植物的 DNA 提取,以上几种方法均被广泛使用。但由于植物特别是水生植物、木本植物生长过程中产生大量多糖、多酚等次生代谢产物,严重干扰 DNA 的提取。采用常规 DNA 提取方法无法获得纯度高、质量优的细胞核 DNA。此外,植物多糖、多酚的组分与含量随植物生长周期和环境条件以及物种而异,目前尚缺乏一种适用于绝大多数植物种类或组织材料细胞核 DNA 提取方法。

[0003] 高通量测序技术对于 DNA 的完整性以及核外 DNA(如线粒体 DNA 和叶绿体 DNA 等)的污染极为敏感,这是因为多酚等物质会氧化基因组 DNA 双链,造成基因组完整性的破坏以及序列长度的降低,多糖类物质和 DNA 的理化性质接近,容易造成核酸的共沉淀而使得率降低;核外 DNA 的存在造成测序有效覆盖度的降低,不久大大增加研究成本,而且严重干扰结果的分析。可见,不管对于 de novo(首次)测序或重测序,多酚氧化和核外 DNA 的存在都会严重干扰基因组序列的拼装。为了去除如叶绿体 DNA 之类的核外遗传物质,现有的几种基因组提取方法均需要对植物材料进行黄化处理,但黄化处理的负面作用是造成材料的生长状态变差,往往又会诱导次生代谢产物如多酚增多,从而加重多酚氧化的程度。而且即便经过黄化处理,也很难去掉高等植物细胞中线粒体 DNA 的污染。对于高大的多年生木本植物以及多数水生植物而言,很难获得大量的黄化幼嫩叶片;因此,开发一种能够利用植物在自然生长条件下的叶片等组织为材料,进行高纯度、高质量细胞核 DNA 的提取方法,已成为当前果树、水生植物等经济作物基因组学研究的迫切需要。

发明内容

[0004] 本发明的目的就在于克服现有植物基因组核酸提取方法存在的缺点和不足,提供一种富含多糖多酚植物高质量细胞核 DNA 的提取方法。

[0005] 本发明的目的是这样实现的:

[0006] 为了适应次生代谢旺盛、植株体积较大和不便于预处理的木本或水生材料,本方法采取了全新的预处理步骤,先粗分离材料的细胞核。

[0007] 一、富含多糖多酚植物高质量细胞核 DNA 的提取(简称方法)

[0008] 具体地说,本方法包括下列步骤:

[0009] ①液氮研磨植物材料(避免过度研磨);

- [0010] ② HB 抽提缓冲液重悬,涡旋混匀后过滤;
- [0011] ③离心,沉淀使用抽提缓冲液 1 洗三次,重悬;
- [0012] ④使用抽提缓冲液 2, RnaseH, 65 摄氏度水浴 30 分钟;
- [0013] ⑤氯仿-异戊醇抽提一次,异丙醇沉淀;
- [0014] ⑥冰预冷 75%乙醇洗沉淀 1-2 次, TE 溶解。
- [0015] 其中①到③为预处理步骤(分离植物材料的细胞核)。
- [0016] 工作机理:
- [0017] 由于细胞核直径较大,和线粒体、叶绿体等细胞器的沉降系数差异较远,比较易于离心分离;同时由于多糖、多酚等次生代谢产物主要位于液泡、线粒体、过氧化物酶体乃至细胞质中,在分离细胞核的过程中被洗去,而其他的细胞整体裂解方法中,次生代谢产物无法去除,对后续的核酸提取步骤产生干扰。因而本方法尤其适用于多糖、多酚等次生代谢产物含量较高的植物材料,此类杂质的存在和含量对所抽提得到的基因组 DNA 的产量与质量均无明显的影响。
- [0018] 二、用途
- [0019] 适用于广泛植物种的健康组织,或细胞结构较完整的冻存组织,特别适合于后续研究为高通量测序等用途。
- [0020] 本发明具有下列优点和积极效果:
- [0021] ①预处理步骤能有效去除线粒体、叶绿体等细胞器 DNA;
- [0022] ②避免植物材料中大量存在的多糖、多酚等次生代谢产物对核酸提取步骤产生干扰;
- [0023] ③抽提缓冲液 1 和 2 中均加入山梨醇,它能调节渗透压,在预处理过程中可防止细胞核结构的过早破裂,从而减少基因组 DNA 损失,提高 DNA 产量。

附图说明

- [0024] 图 1 是本方法的流程图;图中:
- [0025] 1 到 3 为预处理步骤,分离细胞核;
- [0026] 4 为抽提步骤,从细胞核中抽取基因组 DNA;
- [0027] 5 为 DNA 的纯化和沉淀回收步骤;
- [0028] 6 为 DNA 的最终回收步骤。
- [0029] 图 2 是本方法所得的苹果基因组 DNA 电泳图;其中:
- [0030] M- 分子量标准品(最大电泳条带约 15000 碱基对);
- [0031] A、B、C- 本方法所提取的第 1、2、3 苹果基因组 DNA;
- [0032] D- 普通 CTAB 法所提取的苹果基因组 DNA。
- [0033] 【缩略语】
- [0034] SDS :Sodium Dodecyl Sulfate, 十二烷基苯磺酸钠;
- [0035] CTAB :Hexadecyl trimethyl ammonium Bromide, 十六烷基三甲基溴化铵;
- [0036] PEG₆₀₀₀ :PolyEthylene Glycol 6000, 聚乙二醇 6000;
- [0037] EDTA :EthyleneDiamine Tetraacetic Acid, 乙二胺四乙酸;
- [0038] Tris :Tris (Hydroxymethyl) aminomethane, 三羟甲基氨基甲烷;

[0039] RNase H:RNA 酶 H。

具体实施方式

[0040] 下面结合附图和实施例详细说明：

[0041] 一、采用本方法提取苹果的基因组 DNA 的实施例

[0042] 1、步骤如下：

[0043] ①使用液氮速冻，研钵和研棒研磨约 20 克苹果叶片（或冻存叶片），迅速转移到 500 毫升冰预冷烧杯中。

[0044] ②使用 200 毫升冰预冷的 HB 抽提缓冲液（使用前加 β -巯基乙醇至总体积的 0.1%，体积 / 体积比）浸泡，用磁力搅拌泵涡旋混匀 20 分钟，抽提体系用冰降温。

[0045] 使用双层粗纱布和漏斗过滤，滤过液收集到 250 毫升离心管中（也可使用 50 毫升离心管）。

[0046] ③使用固定角转子在冷冻离心机上以 1,800g,4 摄氏度离心 20 分钟。

[0047] 弃去上清，将细胞核沉淀用少量预冷抽提缓冲液 1 轻柔重悬。补足预冷抽提缓冲液 1 体积到 30 毫升，轻柔混匀后转到 50 毫升离心管内，重复此沉淀 - 重悬步骤 3 次（1,800g,4 摄氏度离心 15 分钟）。

[0048] ④小心弃去上清，将沉淀用 5 毫升抽提缓冲液 2 和 10 微升 RNase H(10mg/mL) 重悬。

[0049] 水浴 65 摄氏度保温 30 分钟。

[0050] ⑤加入 5 毫升氯仿抽提液（氯仿：异戊醇 = 24 : 1, 体积 / 体积比），轻柔颠倒混匀。

[0051] 室温离心，12,000g,15 分钟。

[0052] 吸取上清液 4.5 毫升，加入冰预冷异丙醇 3 毫升。

[0053] 混匀，放置于 -20 度沉淀 1 小时。

[0054] 4 度离心。12,000g 15 分钟。

[0055] ⑥弃去上清，加入 5 毫升冰预冷 75%乙醇（75 毫升无水乙醇加蒸馏水至总体积 100 毫升）洗 1-2 次，4 度离心，12,000g 5 分钟。

[0056] 弃去上清，室温晾干半小时，加入 500 微升灭菌 TE 溶解。

[0057] 2、所使用的缓冲液配方

[0058] 1)HB 抽提缓冲液：

[0059] 0.5M sucrose(蔗糖)；

[0060] 10mM Tris-HCl(pH7.0)；

[0061] 80mM KCl；

[0062] 10mM EDTA；

[0063] 1mM spermidine(亚精胺,临用前加入)；

[0064] 1mm spermine(精胺,临用前加入)。

[0065] 2) 抽提缓冲液 1：

[0066] 50mM Tris-HCl(pH8.0)

[0067] 5mM EDTA(用 NaOH 调节 pH 值至 8.0)

- [0068] 350mm sorbitol(山梨醇)
- [0069] 100g/L PEG₆₀₀₀。
- [0070] 0.1%巯基乙醇(体积/体积比,临用前加入)
- [0071] 3) 抽提缓冲液 2:
- [0072] 50mm Tris-HCl(pH8.0)
- [0073] 5mm EDTA(用 NaOH 调节 pH 值至 8.0)
- [0074] 350mm sorbitol(山梨醇)
- [0075] 10g/L SDS
- [0076] 710mm NaCl
- [0077] 0.1% CTAB
- [0078] 0.1%巯基乙醇(体积/体积比,临用前加入)。
- [0079] 4) TE 缓冲液:
- [0080] 10mm Tris-HCl(pH8.0)
- [0081] 1mm EDTA(用 NaOH 调节 pH 值至 8.0)。
- [0082] 5) 75%乙醇
- [0083] 75%为乙醇在溶液中所占的体积比,具体配制方法为 75 毫升无水乙醇加蒸馏水至总体积 100 毫升。
- [0084] 3、检测结果
- [0085] (以下为检测步骤,不属于本方法的提取步骤):
- [0086] 取 2 微升所提取的 DNA 在 0.8%琼脂糖凝胶上电泳,比电压降约 5 伏/厘米,电泳 1 小时后用溴化乙啶染色,在凝胶成像系统中用紫外线照射成像。所得 DNA 分子量完整(>15,000 碱基对),对照分子量标准品,估计其浓度约 50 纳克/微升,如图 2 所示,电泳带型清晰锐利,无明显拖尾,可见较好的去除了蛋白和多糖等杂质。使用紫外分光光度计测得所得 DNA 在 260 纳米和 280 纳米的吸光度比值约等于 1.9,说明本方法所得基因组 DNA 具备较高纯度。
- [0087] 二、采用本方法提取李树、桃子以及猕猴桃的基因组 DNA 均获得成功,步骤与结果类上述,从略。



图 1

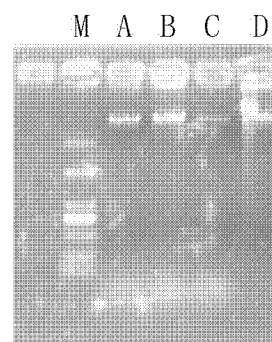


图 2