

一种用于桑 RAD-Seq 高通量测序的基因组 DNA 提取方法

刘玲¹, 柯皓天¹, 吕银², 陈仁芳^{3*}

(1. 四川省丝绸科学研究院, 四川成都 610031; 2. 四川省丝绸工程技术研究中心, 四川成都 610031; 3. 西南大学生物技术学院, 重庆 400716)

摘要 [目的]筛选一种能够得到高质量桑树基因组 DNA 的方法。[方法]采用天根试剂盒法(Plant Genomic DNA Kit 离心柱型),并稍加改进,从 11 个桑种的新鲜嫩叶中提取 DNA。[结果]该方法简单快速,不需要复杂仪器,且能有效地除去桑叶中的多糖、多酚、蛋白质等杂质,得到的 DNA 能够满足 RAD-Seq 高通量的测序要求。[结论]建立了一种用于桑 RAD-Seq 高通量测序的基因组 DNA 提取方法。

关键词 桑树; RAD-Seq; 基因组 DNA 提取

中图分类号 S188 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2016)21-136-02

A High Throughput Sequencing DNA Extraction Method for *Morus* RAD-Seq

LIU Ling¹, KE Hao-tian¹, LU Yin², CHEN Ren-fang^{3*} (1. Silk Research Institute of Sichuan Province, Chengdu, Sichuan 610031; 2. Sichuan Silk Engineering Research Center, Chengdu, Sichuan 610031; 3. Biotechnology School of Southwest University, Chongqing 400716)

Abstract [Objective] The aim was to screen out a method to obtain high quality DNA from mulberry genome. [Method] By using improved Plant Genomic DNA Kit centrifugal column method, DNA was extracted from 11 species of fresh mulberry leaves. [Result] The method is simple, rapid, and can effectively remove polysaccharides, polyphenols, protein and other impurities in the mulberry leaves, the DNA is able to meet the RAD-Seq high-throughput sequencing requirements. [Conclusion] A DNA extraction method for *Morus* RAD-Seq sequencing was established.

Key words Mulberry; RAD-Seq; Genomic DNA extraction

高质量基因组 DNA 通常用于构建基因组文库、Southern 杂交及 PCR 分离基因等。因此,选用合适的提取方法获取高质高量 DNA 非常重要^[1]。RAD-Seq,即限制性酶切位点相关 DNA 的测序技术,是利用限制性内切酶对基因组进行酶切,产生一定大小的片段,构建测序文库,对酶切后产生的 RAD 片段进行高通量测序^[2]。常用的植物基因组 DNA 提取方法有 CTAB 法^[3]和 SDS 法^[4],但利用这 2 种方法得到的桑 DNA 很难满足 RAD-Seq 测序的要求。桑 RAD-Seq 高通量测序对总 DNA 浓度的要求较高。桑树组织中含有较多的蛋白质、糖类、酚类等杂质,利用常用的提取方法很难得到高质量的 DNA。笔者利用该方法能够得到较纯的桑树基因组 DNA,满足 RAD-Seq 测序要求。

1 材料与方法

1.1 试验材料 供试材料为中国桑属 11 个种及变种,分别为白桑 *Morus alba*,蒙桑 *M. mongolica*,长穗桑 *M. wittiorum*,鸡桑 *M. australis*,奶桑 *M. macroura*,细齿桑 *M. serrata*,鬼桑 *M. mongolica* var. *diabolica*,川桑 *M. notabilis*,黑桑 *M. nigra*,华桑 *M. cathayana*,滇桑 *M. yunnanensis*。材料采自各原产地,采集时用带冰块的泡沫塑料盒盛装,尽快采回于 -80℃ 冰箱保存备用。

1.2 提取方法 DNA 提取采用天根试剂盒法^[5](Plant Genomic DNA Kit 离心柱型),并稍加改进。从 11 个桑种的新鲜嫩叶中提取。提取步骤:①在缓冲液 GP1 中加入 β-巯基乙醇(终浓度 0.1%),在 65.0℃ 水浴中预热。②取约 100 mg 桑树叶片,加入液氮充分研磨。③将研磨好的粉末加入用液氮预冷过的 2 mL 离心管中,加入 700 μL 预热的 GP1 缓冲液,且在漩涡振荡器上振荡混匀。④将离心管放入 65℃ 水浴中水浴 30 min,最先 5 min 将离心管拿出,在漩涡振荡器上振荡。之后每 3~5 min 颠倒离心管 1 次。⑤水浴结束,在离心管中加入 700 μL 氯仿,充分混匀,12 000 r/min 离心 5 min。⑥将上清液转移至一个新的 1.5 mL 离心管中,加入 700 μL 缓冲液 GP2,轻轻颠倒混匀。⑦将混匀的液体吸入或直接倒入吸附柱 CB3 中,静置 2 min,12 000 r/min 离心 1 min,拿出离心管后倒掉废液(吸附柱容积为 700 μL 左右,可分次加入离心)。⑧向吸附柱 CB3 中加入 500 μL 的缓冲液 GD,12 000 r/min 离心 1 min,倒掉废液,将吸附柱重新放入收集管中。⑨向吸附柱 CB3 中加入 600 μL 漂洗液 PW,12 000 r/min 离心 1 min,倒掉废液,将吸附柱放回收集管中。⑩重复⑨。⑪将吸附柱 CB3 放回收集管中,12 000 r/min 空转离心 3 min,然后小心将吸附柱放入一个新的 1.5 mL 离心管中(注意不要沾到底下的废液),打开吸附柱的盖子室温下放置 5~10 min,防止有残留的漂洗液。⑫向吸附柱的吸附膜中间部位加入 50 μL 洗脱液 TE,室温下静置 5 min,12 000 r/min 离心 2 min,再将收集到的溶液重新滴加到吸附膜上,静置 5 min,再 12 000 r/min 离心 2 min。⑬在收集到的 DNA 溶液中加入 2 μL RNase,37℃ 金属浴 30~40 min。⑭将收集到的 DNA 放置于 4℃ 冰箱,长时间保存放置于 -20℃ 或 -80℃ 冰箱。

1.3 DNA 质量检测

1.3.1 琼脂糖凝胶电泳检测。取 3 μL DNA 溶液,加入 2 μL 6×Loading buffer,用 1% 琼脂糖凝胶电泳进行检测,用 DL 2 000 Maker 做参照。150 V 电泳 20 min 后,用 EB 染色,然后在紫外凝胶成像系统下观察并拍照。

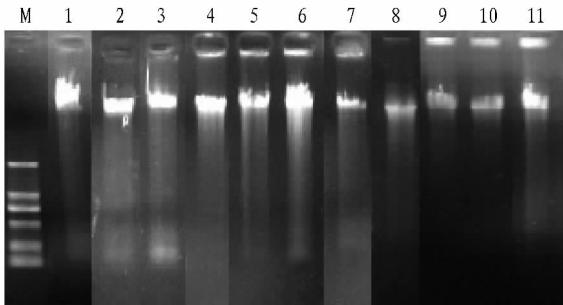
1.3.2 紫外分光光度计检测。取 1 μL DNA 样品,用 Nano-drop 分光光度计(ND-1000, Thermo Fisher Scientific, USA)检测 DNA 浓度和纯度(A_{260}/A_{280})。

作者简介 刘玲(1989-),女,山西大同人,硕士,从事桑树分子标记研究。*通讯作者,副研究员,博士,从事桑资源及分类研究。

收稿日期 2016-06-12

2 结果与分析

2.1 DNA 电泳检测结果 琼脂糖凝胶电泳检测结果见图 1。从图 1 可以看出,电泳条带明亮、清晰,无拖尾、弥散现象,说明该方法提取的桑树 DNA 无降解现象,基因组完整性好,浓度较高。



注:M. maker,1. 白桑,2. 蒙桑,3. 长穗桑,4. 鸡桑,5. 奶桑,6. 细齿桑,7. 鬼桑,8. 川桑,9. 黑桑,10. 华桑,11. 滇桑。

Note:M. maker, 1. *M. alba*, 2. *M. mongolica*, 3. *M. wittiorum*, 4. *M. australis*, 5. *M. macroura*, 6. *M. serrata*, 7. *M. mongolica var. diabolica*, 8. *M. notabilis*, 9. *M. nigra*, 10. *M. cathayana*, 11. *M. yunnanensis*.

图 1 DNA 提取琼脂糖电泳图谱

Fig.1 Genomic DNA detected by agarose gel electrophoresis

2.2 DNA 浓度和纯度 A_{260}/A_{280} 是检测 DNA 纯度的指标, A_{260}/A_{280} 在 1.8~2.0,说明 DNA 纯度较高; A_{260}/A_{280} 大于 2.0 时,说明 DNA 样品中含有 RNA; A_{260}/A_{280} 小于 1.8 时,说明 DNA 样品中可能存在蛋白质污染。用 Nanodrop 分光光度计 (ND-1000, Thermo Fisher Scientific, USA) 检测提取的 DNA 浓度和纯度,结果见表 1。由表 1 可知, A_{260}/A_{280} 在 1.80~1.90,浓度在 92.5 ng/ μ L 以上。说明所提取的 DNA 较纯,符

合进一步分析要求。

表 1 桑种 A_{260}/A_{280}

Table 1 A_{260}/A_{280} value of Morus species

编号 No.	桑种 Morus species	拉丁名 Latin name	浓度 Concentration ng/ μ L	A_{260}/A_{280}
1	白桑	<i>M. alba</i>	92.5	1.82
2	蒙桑	<i>M. mongolica</i>	132.6	1.90
3	长穗桑	<i>M. wittiorum</i>	114.3	1.87
4	鸡桑	<i>M. australis</i>	169.3	1.82
5	奶桑	<i>M. macroura</i>	275.7	1.82
6	细齿桑	<i>M. serrata</i>	313.8	1.84
7	鬼桑	<i>M. mongolica var. diabolica</i>	160.4	1.83
8	川桑	<i>M. notabilis</i>	130.5	1.88
9	黑桑	<i>M. nigra</i>	259.1	1.88
10	华桑	<i>M. cathayana</i>	164.2	1.80
11	滇桑	<i>M. yunnanensis</i>	227.4	1.83

3 结论

该方法简单快速,不需要复杂仪器,且能有效地除去桑叶中的多糖、多酚、蛋白质等杂质,得到的 DNA 经华大基因检测能够满足 RAD-Seq 高通量测序要求。

参考文献

[1] 吴艳艳,代德艳,蔡春梅.一种改良的大豆 DNA 提取方法[J].大豆科学,2015,34(1):112-115.

[2] 王洋坤,胡艳,张天真.RAD-seq 技术在基因组研究中的现状及展望[J].遗传,2014,36(1):41-49.

[3] 蔡朝晖,李萍,董婷霞,等.贝母分子生物学鉴定方法的研究[J].药学学报,2000,35(4):309-312.

[4] DOYLE J J, DOYLE J L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue [J]. Phytochemical bulletin, 1987, 19: 11-15.

[5] 天根生长科技(北京)有限公司.天根试剂盒 Plant Genomic DNA Kit 植物基因组 DNA 提取试剂盒(离心柱型)使用说明书[Z].2016.

[4] 曾宇崇,林章金.原子荧光光谱法测定芦荟中铅和镉[J].岩矿测试,2005,24(2):157-158.

[5] 刘振波,董言梓,周晓云,等.电感耦合等离子体-原子发射光谱法测定苹果浓缩果汁中钾、钠、钙、镁、磷、铁、锌、铜和铅[J].光谱实验室,2006,23(4):887-889.

[6] 陆美斌,王步军,李静梅,等.电感耦合等离子体质谱法测定谷物中重金属含量的方法研究[J].光谱学与光谱分析,2012,32(8):2234-2237.

[7] SAHAN Y,BASOGLU F,GUCER S.ICP-MS analysis of a series of metals (Namely:Mg,Cr,Co,Ni,Fe,Cu,Zn,Sn,Cd and Pb) in black and green olive samples from Bursa,Turkey [J]. Food chemistry, 2007, 105 (1): 395-399.

[8] 解楠,葛宇,徐红斌,等.微波消解-电感耦合等离子体质谱测定香辛料中铅砷镉铬铜锰锌和镍[J].食品科学,2011,32(2):195-197.

[9] HUANG C Z,HU B.Silica-coated magnetic nanoparticles modified with γ -mercaptopropyltrimethoxysilane for fast and selective solid phase extraction of trace amounts of Cd,Cu,Hg,and Pb in environmental and biological samples prior to their determination by inductively coupled plasma mass spectrometry[J].Spectrochimica acta part B:Atomic spectroscopy,2008,63(3):437-444.

[10] HOUK R S,FASSEL V A,FLESCH G D,et al.Inductively coupled argon plasma as an ion source for mass spectrometric determination of trace elements[J].Anal Chem,1980,52(14):2283-2289.

[11] EVANS E H,GIGLIO J J.Interferences in inductively coupled plasma mass spectrometry:A review[J].Journal of analytical atomic spectrometry,1993,8:1-15.

[12] 欧阳佩佩,吴惠刚,周日东,等.压力罐消解 ICP-MS 法测定干豆中微量元素[J].中国卫生检验杂志,2013,23(4):833-835.

(上接第 135 页)

法溶样快速、彻底、空白值低、操作简单、快捷,灵敏度高,适用于豆类食品中重金属的大批量快速分析。

曾有文献^[12]报道,黄豆中的 Pb 含量为 0.007 5 mg/kg, Cd 含量为 0.012 0 mg/kg,As 含量为 0.003 4 mg/kg,Cr 含量为 0.150 0 mg/kg,Ni 含量为 4.900 0 mg/kg;红豆中 Pb 的含量为 0.012 0 mg/kg,As 含量为 0.004 5 mg/kg,Cr 含量为 0.200 0 mg/kg,Nr 含量为 6.500 0 mg/kg,该试验测得的 Pb、Cd、Cr、As、Ni 等元素的含量与文献报道的相近,说明试验结果可靠。试验还发现,密闭高压消解法的处理效果与微波消解法的处理效果相当,与微波消解相比,密闭高压消解法更为安全,价格更低廉,而且本底值低,一次性样品处理量也更大,值得推广。

参考文献

[1] 翁焕新.重金属在牡蛎中的生物积累及其影响因素的研究[J].环境科学学报,1996,16(1):51-53.

[2] STANKOVIC S,JOVIC M. Health risks of heavy metals in the mediterranean mussels as seafood[J]. Environmental chemistry letters,2012,10(2): 119-130.

[3] 方从权,褚敬东,李春,等.石墨炉原子吸收光谱法测定茶叶中的铅[J].分析试验室,2007,26(11):112-114.