

DOI: 10.1360/yc-007-0771

小麦线粒体 DNA 的高效提取方法

李文强, 张改生, 汪奎, 牛娜, 潘栋梁

西北农林科技大学 陕西省作物杂种优势研究与利用重点实验室, 杨凌 712100

摘要: 以小麦黄化苗为材料, 通过简单差速离心、DNase I 处理得到无核DNA杂质的线粒体, 用SDS和蛋白酶K裂解线粒体, 经酚/氯仿抽提除去蛋白, 并用RNase A消化而得到单纯线粒体DNA(mtDNA)。对所提取的mtDNA进行紫外吸收光度分析, A_{260}/A_{280} 平均为 1.92, A_{260}/A_{230} 平均为 2.09, 平均每克黄化苗可提取mtDNA 26.85 μg ; 并对mtDNA进行琼脂糖凝胶电泳和RAPD扩增, 均得到清晰的电泳图谱。结果表明: 此提取方法得到的mtDNA, 不但产率高、结构完整, 而且能有效去除核DNA、RNA和蛋白质等杂质, 获得高质量的mtDNA用于PCR反应和各种遗传学分析。研究还发现, 通过调整线粒体裂解温度(先 50 $^{\circ}\text{C}$ 裂解 1 h, 再 37 $^{\circ}\text{C}$ 裂解 1 h), 亦可大幅度提高mtDNA的产率。

关键词: 小麦; 线粒体; mtDNA; 提取方法; RAPD

An efficient method for isolation of mitochondrial DNA in wheat

LI Wen-Qiang, ZHANG Gai-Sheng, WANG Kui, NIU Na, PAN Dong-Liang

Key Laboratory of Crop Heterosis of Shaanxi Province, Northwest A & F University, Yangling 712100, China

Abstract: An efficient method for isolation of mitochondrial DNA (mtDNA) from etiolated tissues of wheat was developed. The protocol consists of mitochondria isolation with differential centrifugation, Dnase I treatment, lysis with SDS and proteinase K, removing protein by TE-saturated phenol/chloroform extraction and a final RNase A treatment for obtaining mtDNA. The mtDNA samples were tested using spectrophotometry and agarose gel electrophoresis. It was proved that the mtDNA isolated by this method not only have the high yield but also structural complete, and contains no impurities, such as nuclear DNA, RNA and protein. The result showed that this high quality mtDNA can be successfully used in PCR and other genetic studies. In addition, it was found that adjusting the lysis temperature has a noticeable effect on the mtDNA yield.

Keywords: wheat; mitochondria; mtDNA; isolation method; RAPD

线粒体是植物细胞重要的遗传系统之一, 提取高质量的线粒体DNA(mtDNA)是对线粒体遗传系统进行深入研究的基本前提, 也是开展植物细胞质雄性不育分子机理研究的先决条件。被称为生物界“哥

德巴赫猜想”的细胞质雄性不育(CMS), 经国内外众多科学家近半个世纪的研究, 许多结果发现是由于花粉发育过程中线粒体正常呼吸代谢受阻, 从而导致小孢子败育^[1-3], 而线粒体正常呼吸代谢受阻,

收稿日期: 2006-10-31; 修回日期: 2006-12-08

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 301705760); 国家 863 重大专项计划(编号: 2002AA207004); 国家杨凌农业生物技术育种中心专项基金项目资助[Supported by National Natural Science Foundation of China (No.301705760), Chinese National Programs for High Technology Research and Development (No. 2002AA207004) and Special Program of National Agricultural Biotechnology & Breeding Center Yangling Branch]

作者简介: 李文强(1982-), 男, 陕西勉县人, 硕士研究生, 研究方向: 小麦雄性不育分子机理研究。E-mail: lwq54@163.com

通讯作者: 张改生(1951-), 男, 教授, 博士生导师, 研究方向: 小麦分子细胞遗传及其杂种优势利用研究。E-mail: zhanggsh@public.xa.sn.cn

多是由于线粒体呼吸链中蛋白编码基因表达异常引起^[4, 5]。由于线粒体呼吸链蛋白是由核DNA和线粒体DNA(mtDNA)共同编码,因此发生在DNA水平的线粒体遗传系统或核遗传系统的结构,或者功能的改变均可引起线粒体呼吸代谢异常,并导致细胞质雄性不育^[6-8],即细胞质雄性不育是质核互作的结果。

植物mtDNA大多数为环状分子,每个线粒体中DNA分子数从几拷贝到几十拷贝不等,且不同物种mtDNA分子大小差别也很大,从几十kb到几千kb不等,所以对于不同物种其mtDNA提取方法很难统一。但总体来看,植物mtDNA提取方法,主要有密度梯度离心^[9, 10]和差速离心^[11, 12]等方法;密度梯度离心得到的线粒体DNA虽纯度高,但操作复杂、耗时,而且对材料的需求量大,同时mtDNA产率低,且长时间高速离心对离心机亦要求很高;普通的差速离心虽然操作简单,但所提取的mtDNA纯度低、易降解,以及核DNA、RNA和蛋白质等杂质污染严重,不能满足后续研究工作的需要。本文以小麦黄化苗为材料,建立了一套高效的小麦mtDNA提取方法,所提取的mtDNA具有结构完整、纯度和产率高,能完全满足PCR分析、基因定位、克隆等分子操作的需要。

1 材料和方法

1.1 材料

供试材料分别为小麦近缘种属的一些山羊草、对应山羊草细胞质的小麦异源细胞质雄性不育系、其它普通小麦变种细胞质雄性不育系,以及由这些不育系与对应恢复系组配的F₁杂种。

(1) 山羊草:粘果山羊草(*Ae.kotschy*),易变山羊草(*Ae.variabilis*),偏凸山羊草(*Ae.ventricosa*),二角山羊草(*Ae.bicornis*);

(2) 小麦细胞质雄性不育系:ms(*Ae.kotschy*)-90-110, ms(*Ae.variabilis*)-90-110, ms(*Ae.ventricosa*)-90-110, ms(*Ae.bicornis*)-90-110, ms(*T.aestivum*)-77(2), ms(*T.spelta*)-77(2), ms(*T.timopheevii*)-77(2), ms(*T.aestivum*Prim epi)-77(2);

(3) 不育系与恢复系组配的杂种F₁: ms(*Ae.kotschy*)-90-110×5253, ms(*Ae.variabilis*)-90-110×5253, ms(*Ae.ventricosa*)-90-110×5253, ms(*Ae.bicornis*)-90-110×5253, ms(*T.aestivum*)-77(2)×T6-3, ms(*T.spelta*)-77(2)×T6-3, ms(*T.timopheevii*)-77(2)×T6-3, ms(*T.aestivum*Primepi)-77(2)×T6-3;

(4) 保持系:90-110, 77(2);

(5) 恢复系:5253, T6-3;其中保持系和恢复系均为普通小麦品种。

以上种子用5%次氯酸钠表面消毒10 min,蒸馏水冲洗干净后室温下浸泡12 h左右,挑选已露白的种子铺于无菌滤纸上,室温下避光培养7~10天,收取黄化苗。

1.2 方法

1.2.1 线粒体的提取

称取1~10 g黄化苗,加入5倍体积预冷的匀浆缓冲液A(50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 1.3 mol/L NaCl, 25 mmol/L EDTA, pH 8.0, 0.2% BSA, 使用前加入0.05%半胱氨酸和0.5%β-巯基乙醇),用预冷的研钵或匀浆捣碎机充分破碎组织,经6层纱布过滤,滤渣加入3倍体积的匀浆缓冲液A继续破碎,两次滤液合并后分装于15 mL离心管。将滤液用Eppendorf 5810R高速冷冻离心机1,000 g离心10 min;取上清液2,000 g离心15 min,并重复此步操作。将得到的上清液18,000 g离心15 min,弃上清,得到粗线粒体沉淀。向每管沉淀中加入5 mL预冷的匀浆缓冲液A,并将沉淀重悬浮,18,000 g离心15 min,充分弃掉上清液,得到较纯的线粒体沉淀。向沉淀中加入1 U/μL DNase (Fermentas)5 μL, 10×buffer 10 μL,超纯水85 μL,充分混匀后37℃温育1 h,加入10 μL 0.5 mol/L EDTA, pH 8.0,混匀后静置10 min以终止反应。然后加入2 mL ST缓冲液(400 mmol/L蔗糖,50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 0.1% BSA),18,000 g离心15 min,弃掉上清,沉淀为无核DNA杂质的线粒体(以上所有操作除特别说明外均在4℃以下或者冰浴中进行)。

1.2.2 mtDNA的提取

向每管线粒体沉淀中加入1 mL裂解缓冲液B(25 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 20 mmol/L EDTA, pH 8.0, 0.5% SDS),并加入蛋白酶K(Meck)至终浓度为100 μg/mL。将沉淀充分悬浮,先50℃裂解1 h,再37℃裂解1 h,裂解期间每隔一段时间轻轻摇动一次。裂解结束后加入2 mol/L醋酸铵100 μL,并加入1 mL TE饱和的酚/氯仿(1:1)抽提,充分混匀,静置10 min,18,000 g离心5 min,吸取上清,并重复抽提一次。小心吸取上清,将其分装于1.5 mL离心管中,并加入无DNase的RNase A(Sigma)至终浓度为20 μg/mL,37℃温育0.5~1 h,然后加入2倍体积的无水乙醇,充分混匀,-70℃静置1 h,18,000 g离心15 min,所得白色mtDNA沉淀在室温下干燥后加入

10~30 μL TE 溶液, 可于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.3 mtDNA 的质量及纯度检测

(1) 取 2.5 μL mtDNA 溶液, 加超纯水稀释至 50 μL , 用 Eppendorf Biophotometer 紫外分光光度计分别测定 A_{260}/A_{280} 、 A_{260}/A_{230} 及 mtDNA 浓度, 并进行纯度分析。

(2) 取 7 μL mtDNA 样品与 1.5 μL 上样缓冲液混匀, 0.8% 琼脂糖凝胶电泳 (4 V/cm) 50 min, 用 GeneGenius GBox-HR 凝胶成像系统照相检测 mtDNA。

1.4 RAPD 扩增

用 25 μL 反应体系进行 PCR 扩增, 反应体系含有模板 mtDNA 25 ng, 2.5 mmol/L dNTPs 1 μL , 10 \times buffer 2.5 μL , 25 mmol/L MgCl_2 2 μL , 5 U/ μL Taq DNA 聚合酶 (Fermentas) 0.3 μL , 10 $\mu\text{mol/L}$ 随机引物 1 μL , 剩余体积用超纯水补足。PCR 反应在 MyCycler Thermal Cycler (Bio-Rad) 上进行, 反应程序如下: 95 预变性 3 min; 94 变性 1 min, 37 复性 1 min, 72 延伸 2 min, 45 个循环; 72 延伸 5 min。扩增产物经 1.5% 琼脂糖电泳检测。

2 结果与分析

2.1 mtDNA 紫外吸收光度分析

从紫外吸收光度测定结果 (表 1) 可见, 本方法提取的 mtDNA 纯度高, 其 A_{260}/A_{280} 介于 1.8~2.0, 表明样品中无蛋白质或酚类污染; A_{260}/A_{230} 平均为 2.09, 表明样品中基本不含有机试剂等干扰; 样品平均浓度为 2.24 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 平均每克黄化苗可提取 mtDNA 26.85 μg 。

2.2 mtDNA 的琼脂糖电泳检测结果

最近研究表明^[13], 小麦线粒体全基因组为 452, 528bp 的环形 DNA 分子, 由于其分子质量较大, 要想获得完整的 mtDNA, 提取操作中应格外小心, 以防 mtDNA 的降解或断裂。用本方法所提取的 mtDNA 经琼脂糖电泳检测, 没有降解, 条带清晰 (图 1:a)。此外, 用黄化苗提取 mtDNA 时, 核 DNA 和 RNA 对 mtDNA 纯度有很大影响, 在对线粒体进行裂解前若未用 DNase 消化处理, 所提取的 mtDNA 中有细胞核 DNA 杂质, 电泳泳道会有明显拖尾现象 (图 1: b); 由于黄化苗组织

表 1 mtDNA 紫外吸收光度测定结果

Table 1 Results of spectrophotometry of mtDNA

编号 Code	材料 Materials	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}	浓度 ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) Concentration ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	产率 ($\mu\text{g}/\text{g}$) Yield ($\mu\text{g}/\text{g}$)
1	<i>Ae.kotschy</i>	1.95	2.05	3.08	36.96
2	ms(<i>Ae.kotschy</i>)-90-110	1.95	2.18	3.32	39.84
3	ms(<i>Ae.kotschy</i>)-90-110 \times 5253	1.93	1.92	2.62	31.44
4	<i>Ae.variabilis</i>	1.89	2.10	1.46	17.52
5	ms(<i>Ae.variabilis</i>)-90-110	1.96	2.09	2.12	25.44
6	ms(<i>Ae.variabilis</i>)-90-110 \times 5253	1.91	2.21	2.28	27.36
7	<i>Ae.ventricosa</i>	1.89	2.05	1.61	19.32
8	ms(<i>Ae.ventricosa</i>)-90-110	1.90	2.13	1.77	21.24
9	ms(<i>Ae.ventricosa</i>)-90-110 \times 5253	1.96	2.32	2.51	30.12
10	<i>Ae.bicornis</i>	1.98	2.09	1.14	13.68
11	ms(<i>Ae.bicornis</i>)-90-110	1.95	2.18	1.68	20.16
12	ms(<i>Ae.bicornis</i>)-90-110 \times 5253	1.94	2.14	1.84	22.08
13	90-110	1.91	2.02	1.94	23.28
14	5253	1.91	2.03	2.85	34.20
15	ms(<i>T.aestivum</i>)-77(2)	1.94	2.04	1.14	13.68
16	ms(<i>T.aestivum</i>)-77(2) \times T6-3	1.86	1.95	3.31	39.72
17	ms(<i>T.spelta</i>)-77(2)	1.87	2.02	1.82	21.84
18	ms(<i>T.spelta</i>)-77(2) \times T6-3	1.92	2.18	1.48	17.76
19	ms (<i>T.timopheevii</i>)-77(2)	1.86	2.12	4.45	53.40
20	ms (<i>T.timopheevii</i>)-77(2) \times T6-3	1.93	1.92	2.62	31.44
21	ms (<i>T.aestivum</i> Primepi)-77(2)	1.96	2.06	2.39	28.68
22	ms (<i>T.aestivum</i> Primepi)-77(2) \times T6-3	1.86	2.18	2.85	34.20
23	77(2)	1.96	2.15	1.94	23.28
24	T6-3	1.84	2.08	1.48	17.76
25	平均 Average	1.92	2.09	2.24	26.85

中所含 RNA 也比较丰富, 所提取的 mtDNA 若未用 RNase A 处理, 电泳图中明显可见有 RNA 混杂(图 1: b)。

2.3 mtDNA 的 RAPD 分析

用随机引物 OPY-01(5'-GGTGGCATCT-3')对 24 个材料的 mtDNA 进行 RAPD 扩增(图 2), 平均每个材料可扩增出 5~9 条带, 扩增片段介于 250~4, 250 bp, 其中 *Ae.kotschyi*、*ms(Ae.kotschyi)*-90-110、

ms(Ae.kotschyi)-90-110×5253 之间存在多态性, 这种多态性为研究小麦细胞质雄性不育机理可提供翔实的线粒体变异的资料。

2.4 影响 mtDNA 产率的因素

影响提取产率的最主要因素是线粒体的裂解程度, 试验过程中通过改变裂解缓冲液 B 中蛋白酶 K 和 SDS 浓度、裂解时间等条件, 未发现所提取的

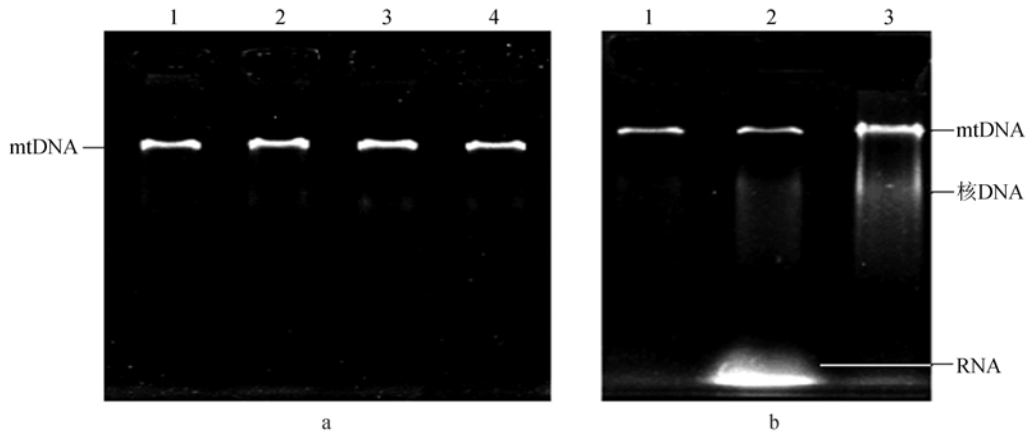


图 1 mtDNA 的琼脂糖电泳图

a:1. *ms(Ae.kotschyi)*-90-110; 2. *ms(Ae.variabilis)*-90-110; 3. *ms(Ae.ventricosa)*-90-110; 4. *ms(Ae.bicornis)*-90-110.b:1.用 RNase A 和 Dnase I 处理过的 mtDNA; 2. 未用 RNase A 处理的 mtDNA; 3.未用 Dnase I 处理的 mtDNA。

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis patterns of mtDNA

a:1. *ms(Ae.kotschyi)*-90-110; 2. *ms(Ae.variabilis)*-90-110; 3. *ms(Ae.ventricosa)*-90-110; 4. *ms(Ae.bicornis)*-90-110.b:1. mtDNA of Rnase A and Dnase I treatment; 2. mtDNA without RNaseA treatment; 3. mtDNA without Dnase I treatment.

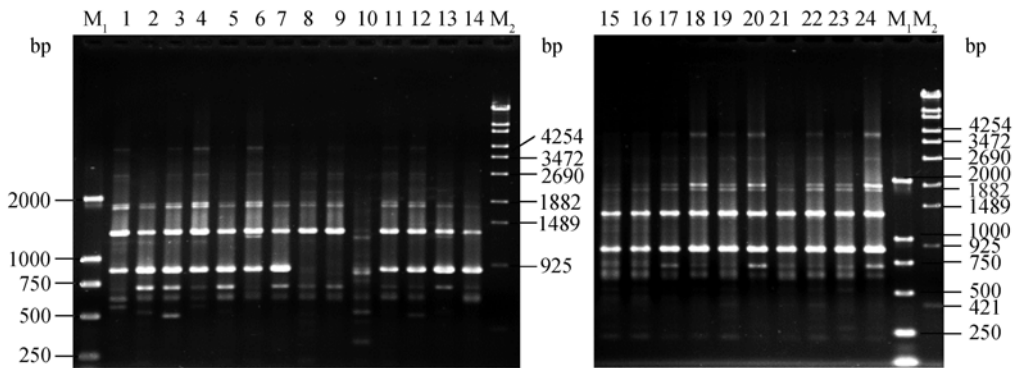


图 2 mtDNA 的 RAPD 扩增图谱

数字对应材料编号参见表 1; M₁、M₂: 标准分子量。

Fig. 2 RAPD amplification patterns of mtDNAs from 24 materials using primer OPY-01

Numbers refer to the codes listed in Table 1; M₁ and M₂ stand for molecular marker.

表 2 不同裂解温度下的 mtDNA 提取效果

Table 2 The comparison of mtDNA extracted at different lysis temperature

裂解温度 Lysis temperature	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₃₀	浓度(μg/μL) Concentration(μg/μL)	产率(μg/g) Yield(μg/g)
50 °C恒温裂解 2 h	1.94	2.04	0.57	6.84
37 °C恒温裂解 2 h	1.92	2.18	0.46	5.52
先 50 °C 裂解 1 h, 再 37 °C 裂解 1 h	1.92	2.09	2.24	26.85

mtDNA 样品产率有显著变化。线粒体裂解时, 在裂解温度为 37 或 50 恒温裂解 2 h, 发现对 mtDNA 的产率影响不大, 平均每克新鲜的黄化苗分别可提取 mtDNA 6.84 μg 和 5.52 μg ; 但在其他裂解条件不变的情况下, 先 50 恒温裂解 1 h, 然后立即改变裂解温度至 37 再裂解 1 h, 所得到的 mtDNA 沉淀明显增多, 经测定平均每克新鲜的黄化苗可提取 mtDNA 26.85 μg (表 2)。初步分析可能是温度的急剧改变引起线粒体膜破裂程度发生改变, 从而引起 mtDNA 从线粒体膜内部更多地释放出来, 因此线粒体裂解更充分。

3 讨论

为了获得高质量的 mtDNA, 通常需要一系列操作步骤以去除蛋白质、次生代谢物、糖类小分子、核 DNA 和 RNA 等杂质, 用传统提取方法经过这些操作后所得到的 mtDNA, 无论是完整度或提取产率方面均受到很大的影响。本研究以小麦黄化苗为材料, 通过差速离心、Dnase 处理、线粒体裂解、酚/氯仿抽提和 RNase A 消化等主要步骤, 所提取的 mtDNA 结构完整、产率高, 不仅适合限制性酶切分析等对 mtDNA 样品需求量较大的研究, 而且适合对 mtDNA 纯度、完整度要求高的 PCR 扩增。与传统的提取方法^[10-12]相比, 本方法所提取 mtDNA 不但纯度高、无降解、电泳谱带清晰, 而且具有以下优点: (1) 在提取过程中, 用 DNase 和 RNase A 进行消化, 可排除 mtDNA 中的核 DNA 和 RNA, 能保证后续分子操作的可靠性; (2) 在线粒体裂解过程中, 通过调整裂解温度(先 50 $^{\circ}\text{C}$ 裂解 1 h, 再 37 $^{\circ}\text{C}$ 裂解 1 h), 从而大大提高了 mtDNA 的产率。此外, 用本方法从二角山羊草的成熟叶片中提取 mtDNA, 也获得了很好的效果。

参考文献(References):

- [1] Hanson MR, Bentolila S. Interactions of mitochondrial and nuclear genes that affect male gametophyte development. *The Plant Cell*, 2004, 16: S154-S169.[\[DOI\]](#)
- [2] Geddy R, Mahe L, Brown GG. Cell-specific regulation of a Brassica napus CMS-associated gene by a nuclear restorer with related effects on a floral homeotic gene promoter. *The Plant Journal*, 2005, 41: 333-345.
- [3] Murai K, Takumi S, Koga H, Yasunari Ogihara. Pistillody, homeotic transformation of stamens into pistil-like structures, caused by nuclear-cytoplasm interaction in wheat. *The Plant Journal*, 2002, 29(2): 169-181.[\[DOI\]](#)
- [4] He S, Abad AR, Gelvin SB, Mackenzie SA. A cytoplasmic male sterility-associated mitochondrial protein causes pollen disruption in transgenic tobacco. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93: 11763-11768.[\[DOI\]](#)
- [5] Conley CA, Hanson MR. Tissue-Specific protein expression in plant mitochondria. *The Plant Cell*, 1994, 6: 85-91.[\[DOI\]](#)
- [6] Mackenzie S, McIntosh L. Higher plant mitochondria. *The Plant Cell*, 1999, 11: 571-585.[\[DOI\]](#)
- [7] Kuzmin EV, Duvick DN, Newton KJ. A mitochondrial mutator system in maize. *Plant Physiology*, 2005, 137: 779-789.[\[DOI\]](#)
- [8] Charles S, Levings III. Thoughts on cytoplasmic male sterility in cms-T maize. *The Plant Cell*, 1993, 5: 1285-1290.[\[DOI\]](#)
- [9] Pring DR, Levings CS. Heterogeneity of maize cytoplasmic genomes among male-sterile cytoplasms. *Genetics*, 1978, 89: 121-136.
- [10] TANG Qun, YAO Ya-Qin, ZHANG Gai-Sheng. Establishment of the simple extraction method of wheat mitochondrial DNA. *Journal of Triticeae Crops*, 2005, 25 (6): 144-147.
唐群, 姚亚琴, 张改生. 小麦线粒体 DNA 快速提取体系的建立. 麦类作物学报, 2005, 25 (6): 144-147.
- [11] Triboush SO, Danilenko NG, Davydenko OG. A method for isolation of chloroplast DNA and mitochondrial DNA from sunflower. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1998, 16: 183-189.[\[DOI\]](#)
- [12] Scotti N, Cardi T, Marechalrouard L. Mitochondrial DNA and RNA isolation from small amounts of potato tissue. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2001 19: 67a-67h.
- [13] Ogihara Y, Yamazaki Y, Murai K, Kanno A, Terachi T, Shiina T, Miyashita N, Nasuda S, Nakamura C, Mori N, Takumi S, Murata M, Futo S, Tsunewaki K. Structural dynamics of cereal mitochondrial genomes as revealed by complete nucleotide sequencing of the wheat mitochondrial genome. *Nucleic Acids Research*, 2005, 33(19): 6235-6250.[\[DOI\]](#)