

制备棉花高分子量线粒体 DNA 的方法

Preparation Approach of High Molecular Weight mtDNA from Cotton

黄晋玲^{1,2}, 胡建斌^{1,2}, 张锐¹, 郭三堆^{*1}

(1 中国农业科学院生物技术研究所,北京 100081;2 山西农业大学农学院,太谷 030801)

细胞质雄性不育(cytoplasmic male sterility, CMS)是普遍存在于植物中的生物学现象。细胞质雄性不育受核质两套遗传系统的控制,决定不育的胞质基因在线粒体基因组中。高等植物的线粒体在小孢子的发育过程中起着重要作用,并且与 CMS 密切相关。因此,通过构建线粒体基因组 BAC 文库,克隆相关的线粒体基因,有助于了解 CMS 不育的机理。

高分子量线粒体基因组 DNA 的制备是构建高质量线粒体基因组文库的瓶颈。本实验室针对棉花本身富含棉酚、单宁和萜烯类等次生代谢物质的特殊性,借鉴其它作物的线粒体 DNA 提取的方法,摸索出了一种提取棉花线粒体 DNA 的既经济又能满足构建高质量线粒体基因组 BAC 文库的有效方法。

1 材料和方法

1.1 试验材料的准备

将棉花晋 A 细胞质雄性不育系的种子经浓硫酸脱绒后,种在灭菌的营养土中,30℃黑暗培养 6~10 d,收取黄化苗备用。

1.2 高分子量线粒体 DNA 的制备

1.2.1 线粒体的分离 在操作过程中,质体通过低速离心被清除掉。经过差速离心和蔗糖密度梯度离心获得高纯度的线粒体。整个操作必须在 2~4℃条件下进行。

将收获的黄化苗组织和缓冲液 A(0.05 mol · L⁻¹ Tris-Cl, 0.5 mol · L⁻¹ Sucrose, 0.005 mol · L⁻¹ EDTA, 0.1% BSA, 0.005 mol · L⁻¹ β-巯基乙醇, 1%~2% PVP 即聚乙烯吡咯烷酮, pH7.5), 以 1:4(W/V)的比例混合;经低速 5s 两次和高速 10s 三次匀浆后,4 层纱布过滤;取滤液以 1400 ×g 离心 10 min,以除去质体;将上清液转入新的离心管中,16000 ×g 离心 35 min 弃上清液;将每

管中沉淀再用缓冲液 B(0.05 mol · L⁻¹ Tris-Cl, 0.3 mol · L⁻¹ Sucrose, 0.01 mol · L⁻¹ MgCl₂, 1% PVP, pH7.5)悬浮;软毛笔轻轻悬浮后,16000 ×g 离心 20 min,弃上清液;将每管中沉淀再悬浮到缓冲液 C 中(0.05 mol · L⁻¹ Tris-Cl, 0.3 mol · L⁻¹ Sucrose, 0.01 mol · L⁻¹ MgCl₂),加入 DNase I 至终浓度 30 μg · mL⁻¹, 37℃反应 40 min,以除去线粒体外的核 DNA;用长针头注射器向管底缓缓注入 20 mL 缓冲液 D(0.01 mol · L⁻¹ Tris-Cl, 0.6 mol · L⁻¹ Sucrose, 0.002 mol · L⁻¹ EDTA, pH7.5),作成梯度,冰浴 30 min,然后 16000 ×g 离心 20 min,弃上清液;沉淀再用 20 mL 缓冲液 D 同前一样悬浮、洗涤、离心 2~3 次,得到的沉淀即为纯净完整的线粒体。

1.2.2 胶块的制备。将 plug mold 置于冰上预冷;用缓冲液 D 配制 10 mL, 1.5%低熔点琼脂糖凝胶(LMP),置于 45℃水浴中备用;将装有线粒体悬浮液的离心管在 45℃水浴中温浴 5 min;向线粒体悬浮液中加入等体积的 1.5%低熔点琼脂糖凝胶,温和混匀后,迅速用去枪尖的枪头将混合液加到于冰上预冷的 plug mold 中;将 plug mold 于 4℃冰箱中冷却 30 min,以充分凝固。胶块凝固后转移到裂解液(50 mmol · L⁻¹ Tris-Cl, 1 mmol · L⁻¹ EDTA, 10% SDS, pH8.0)中,加入蛋白酶 K,终浓度为 1 mg · mL⁻¹,于 42℃温和振荡 36~48 h,中间换一次裂解液。去除裂解液,加入 10~20 倍体积的含有 PMSF(Phenylmethanesulfonyl fluoride)(终浓度 1 mM)的 T10E10(10 mol · L⁻¹ Tris-Cl, 10 mol · L⁻¹ EDTA, pH8.0)中,在冰上温和振荡 2 h,中间换一次溶液。然后再转入 T10E1(10 mol · L⁻¹ Tris-Cl, 1 mol · L⁻¹ EDTA, pH8.0)中冰上温和振荡清洗 4 次(1 h/次),以除去 PMSF 和 EDTA。胶块可直接保存在 4℃,以备酶切和克隆(若需长期保存,用 0.5 mol

• L⁻¹ EDTA (pH9.0~9.3)清洗胶块 1 h,再用 0.05 mol • L⁻¹ EDTA(pH8.0)清洗胶块 1 h。在 4℃条件下,胶块保存在 0.05 mol • L⁻¹ EDTA (pH8.0)溶液中,可稳定保存 1 年)。

1.2.3 胶块质量检测。取 1/2 胶块,以一定量的 λDNA 作为标准进行脉冲场凝胶电泳检测。采用 0.5 × TBE 为电极缓冲液,电泳条件为: 0.5 ×

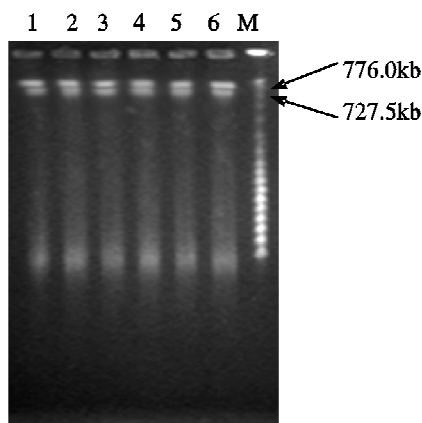


图 1 棉花 mtDNA 胶块脉冲电泳图谱

Fig. 1 PFGE of cotton mtDNA

2 结果与讨论

2.1 采用黄化苗有利于减少叶绿体 DNA 的污染

植物线粒体 DNA 与细胞核 DNA 相比,在细胞中的含量甚微,且极易受到核 DNA 和叶绿体 DNA 的污染。因此在本试验中,采用经过暗培养的棉花黄化苗提取线粒体 DNA,可以减少叶绿体 DNA 的污染。并且,用在匀浆器中高速匀浆黄化苗取代液氮研磨,可以避免线粒体的损伤。

2.2 加入 PVP、β-巯基乙醇和 BSA 有利于提高 mtDNA 的产量和质量

棉花组织富含棉酚、单宁和萜烯类等次生代谢物质。酚类物质易被氧化,并与 DNA 结合形成不可逆的、粘稠的褐色复合物。而 PVP 是一种酚结合剂,能有效地去除棉花幼苗中的酚类物质;β-巯基乙醇具有抗酚类物质氧化的特性;BSA 可提供一种环境介质的作用,也是起保护作用的;萜烯类化合物易造成 DNA 的降解。因此,在提取线粒体 DNA 的过程中,将 PVP、β-巯基乙醇和 BSA 三种物质的性能结合起来,可以有效地减少

TBE 配制的 1% 的低熔点琼脂糖凝胶;温度 11℃;起始脉冲 15 s;终止脉冲 15 s;脉冲时间 14 h;电压 6 V • cmL⁻¹;角度 120.°;泵 70。电泳结束后,用终浓度为 0.5 μg • mL⁻¹ 的 EB 水溶液摇染 30 min,水洗 30 min;凝胶成像系统进行图像捕捉,检测胶块质量,并估测胶块中的 mtDNA 浓度。

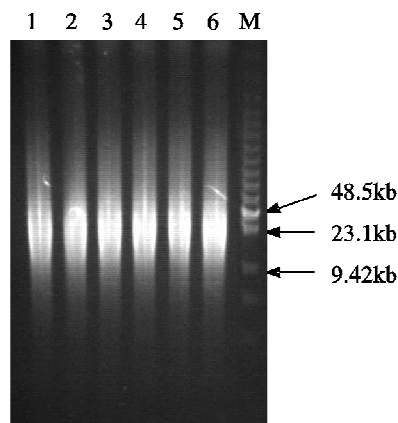


图 2 棉花 mtDNA 部分酶切脉冲电泳图谱

Fig. 2 PFGE of partially digested mtDNA

棉酚、单宁等次生代谢物对 mtDNA 的影响,提高 mtDNA 的产量和质量。

2.3 低熔点琼脂糖包埋法有效地保持了 mtDNA 的完整性

在本试验中,将一种用于制备高分子量核 DNA 的方法——低熔点琼脂糖包埋法用于制备高分子量的线粒体 DNA。将纯净的线粒体先用低熔点琼脂糖包埋,继而再进行线粒体的裂解、纯化、漂洗等一系列过程。采用低熔点琼脂糖包埋法,可以避免常规方法采用酚、氯仿等有机溶剂多次抽提对 mtDNA 造成的机械伤害,有效地保持了 mtDNA 的完整性,提取的棉花 mtDNA 分子量达 700kb 以上(图 1)。并提高了 mtDNA 的分子得率,以未经酶切的 λDNA 浓度梯度为对照,估测 mtDNA 的胶块浓度为每 100 μL 8~10 μg 的胶块,为构建棉花线粒体基因组 BAC 文库提供了基础。

本试验方法提取的棉花 mtDNA,其分子量、纯度和产量均较高,DNA 降解少。并且,避开了传统方法中采用高费用的氯化铯梯度超速离心的过程,适用于普通实验室操作。 ●