

DOI: 10.11913/PSJ.2095-0837.2018.60888

李文跃, 林春晶, 丁孝羊, 韩亚丽, 彭宝, 赵丽梅, 张春宝. 一种改良的大豆线粒体 DNA 提取方法 [J]. 植物科学学报, 2018, 36(6): 888-892

Li WY, Lin CJ, Ding XY, Han YL, Peng B, Zhao LM, Zhang CB. An improved method to extract *Glycine max* mitochondrial DNA [J]. *Plant Science Journal*, 2018, 36(6): 888-892

一种改良的大豆线粒体 DNA 提取方法

李文跃^{1,2,3}, 林春晶^{2,3}, 丁孝羊^{2,3}, 韩亚丽^{1,2,3},
彭宝^{2,3}, 赵丽梅^{2,3}, 张春宝^{2,3*}

(1. 吉林农业大学农学院, 长春 130018; 2. 吉林省农业科学院大豆研究所, 长春 130033;

3. 大豆国家工程研究中心, 长春 130033)

摘要: 以大豆(*Glycine max* (L.) Merrill)黄化苗为材料, 通过优化提取线粒体 DNA (mtDNA) 时差速离心过程中的离心力和离心时间, 以及纯化过程中设置不同的蔗糖密度梯度和裂解液浓度, 结合高盐法去除蛋白质, 改良大豆 mtDNA 的提取方法。结果表明, 该方法提取的 mtDNA 浓度和纯度较高, 无叶绿体和核基因组 DNA 的污染, 可用于后续大豆线粒体基因组的相关研究。

关键词: 大豆; 线粒体 DNA; 纯化线粒体

中图分类号: Q943.2

文献标识码: A

文章编号: 2095-0837(2018)06-0888-05

An improved method to extract *Glycine max* mitochondrial DNA

Li Wen-Yue^{1,2,3}, Lin Chun-Jing^{2,3}, Ding Xiao-Yang^{2,3}, Han Ya-Li^{1,2,3}, Peng Bao^{2,3},
Zhao Li-Mei^{2,3}, Zhang Chun-Bao^{2,3*}

(1. College of Agriculture, Jilin Agricultural University, Changchun 130018, China;
2. Soybean Research Institute, Jilin Academy of Agricultural Sciences, Changchun 130033, China;
3. National Engineering Research Center for Soybean, Changchun 130033, China)

Abstract: In this study, yellowing *Glycine max* (L.) Merrill seedlings were used to extract mitochondrial DNA (mtDNA) by optimizing centrifugal force and time during differential centrifugation. Furthermore, establishing different sucrose density gradients and lysate concentrations during purification, combined with high salt removal protein, improved the extraction method of soybean mtDNA. Results showed that the concentration and purity of mtDNA extracted by this method were high, with no chloroplast or nuclear genomic DNA contamination, the mtDNA could be used for subsequent research on soybean mitochondrial genome.

Key words: *Glycine max*; Mitochondrial DNA; Purification of mitochondria

线粒体(Mitochondrion)是一种由2层膜包被并存于大多数细胞中的细胞器, 它是细胞中产生能量的结构, 也是进行有氧呼吸的主要场所^[1]。除

了向细胞提供能量之外, 线粒体还参与细胞的分化、细胞信号传导和细胞凋亡等过程, 还具有调节细胞生长和细胞周期的能力。线粒体具有一套独立

收稿日期: 2018-06-14, 退修日期: 2018-08-03。

基金项目: 吉林省科技厅重大科技攻关项目(20170201001NY); 国家自然科学基金项目(31601322); 吉林省农业科技创新工程项目(CXGC2017JQ004, CXGC2017TD002, C7208000409)。

This work was supported by grants from the Major Project for Science and Technology Development of Jilin Province (20170201001NY), National Natural Science Foundation of China(31601322), and Agricultural Science Technology Innovation Project of Jilin Province(CXGC2017JQ004, CXGC2017TD002, C7208000409)。

作者简介: 李文跃(1992-), 男, 硕士研究生, 研究方向为大豆杂种优势利用(E-mail: 569990044@qq.com)。

* 通讯作者(Author for correspondence. E-mail: cbzhang@126.com)。

的遗传系统,它包括线粒体DNA(mtDNA)的多个拷贝,以及mtDNA复制和翻译过程^[2]。mtDNA编码ATP产生所必需的蛋白质,在植物发育和繁殖过程中发挥重要作用。线粒体的功能障碍,与mtDNA的突变存在紧密联系,导致植物发育过程中的各种异常^[3]。

大豆(*Glycine max* (L.) Merrill)含有丰富的脂肪酸和蛋白质,是我国重要的粮食作物之一^[4]。我国对大豆杂种优势的利用处于国际先进水平,目前已利用细胞质雄性不育(*Cytoplasmic male sterility*, CMS)系统在东北及黄淮大豆主产区审定了17个杂交大豆品种,其中一些强优势杂交种已在生产上推广应用。随着大豆杂种优势利用研究的不断深入,细胞质雄性不育机理的解析也迫在眉睫。早在2010年,已经完成大豆核基因组的测序,有关大豆核基因的研究也开展较为深入,然而对其线粒体基因组的研究仍然较少,仅在2012年完成了一种大豆资源的线粒体基因组测序^[5]。由于细胞质雄性不育是母性遗传,研究认为细胞质雄性不育可能是线粒体基因组缺陷的结果,因此提取大豆不育系的mtDNA是开展线粒体基因功能分析、mtDNA突变非功能性分析和线粒体基因组完整序列拼接等研究的关键^[6]。随着第三代测序技术的发展,高通量、大片段测序技术成为一种快速获得大豆线粒体完整序列的方法。目前,水稻(*Oryza sativa* L.)^[7]、油菜(*Brassica napus* L.)^[8]、辣椒(*Capsicum annuum* L.)^[9]、棉花(*Gossypium hirsutum* L.)^[10]和小麦(*Triticum aestivum* L.)^[11]等植物已经具有提取mtDNA成熟的方法。在大豆中仅见李玉秋等^[12]的报道,且该方法仅适用于小量提取,提取的浓度和纯度尚不能满足三代测序的要求。而采用植物线粒体DNA提取试剂盒,价格昂贵且不适用于高通量测序。因此,本研究对前人的提取方法作出改进,优化出一套成本低,快速获得高质量、高纯度并适用于高通量测序的大豆mtDNA提取方法,以期为进一步开展大豆细胞质雄性不育分子机理研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料及主要试剂

实验材料为吉林省农业科学院选育的大豆RN型CMS不育系JLCMS9A。酶及主要试剂为:

DNase I(北京鼎国);限制性内切酶EcoR I(NEB),RNaseA(北京天根);核酸染料Super GelRed(US Everbright);2×EsTaq Master Mix(康为世纪);其余试剂为国产分析纯。缓冲液A、B、C、D的配置参考费晓燕^[13]的方法,其中缓冲液A中加入100 μL的NaCl(5 mol/L)和0.1%的β-巯基乙醇进行微调。

1.2 实验方法

1.2.1 大豆黄化苗培养

取100粒大豆种子放入装好水的豆芽机中,用黑色塑料袋遮光处理,于27℃培养10 d,获得黄化苗。

1.2.2 改良的差速离心法粗提纯大豆线粒体

将培养10 d的大豆黄化苗剪断,称取200 g放入预冷的组织捣碎机中,加入缓冲液A 800 mL,研磨3次,每次5 s,研磨结束后用3层纱布粗滤,再用滤布(Miracloth)过滤1次。

第1次离心后去除细胞碎片等杂质,于4℃、2500 g离心10 min,收集上清。第2次离心收集线粒体沉淀的条件为4℃、18 000 g,离心20 min,倒掉上清收集沉淀。向获得的沉淀中加入30 mL缓冲液B,轻轻悬浮沉淀,并加入300 μL MgCl₂(1 mol/L)、900 μL DNase I(5 mg/mL),冰浴1 h,以消除核基因组DNA污染。冰浴结束后加入3 mL EDTA(0.5 mol/L, pH 8.0)静置3 min以终止DNase I反应,再于4℃、22 000 g超速离心20 min。去上清收集沉淀,并向获得的沉淀中加入6 mL缓冲液B,轻轻悬浮。

1.2.3 改良的密度梯度离心法纯化大豆线粒体

本实验设置了2种蔗糖密度梯度,蔗糖溶液均为2 mL,密度梯度设为,处理1:50%、45%、40%、35%;处理2:60%、52%、36%、20%。分别将2组不同密度梯度的蔗糖溶液铺设入水平超速离心管中,用移液器将提取的粗线粒体悬浮液加入蔗糖溶液,于4℃、160 000 g离心1 h。

在处理1中用枪头吸取离心后的40%~45%蔗糖溶液中的黄色线粒体层,处理2中吸取36%~52%的黄色线粒体层。加入16 mL冲洗液C,于4℃、22 000 g离心15 min,去上清,收集沉淀。

1.2.4 改良的大豆mtDNA抽提方法

向纯化后的线粒体中加入1.2 mL缓冲液D,轻轻悬浮沉淀,再加入30 μL 20 mg/mL蛋白酶K,

20%的 SDS 溶液至终浓度为 2%，58℃下水浴 1 h，水浴结束后加入 130 μ L 醋酸钾溶液(5 mol/L)混匀，置于冰上 20 min。冰浴结束后以 9000 g 离心 20 min，吸取上清，加入等体积的酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)，上下颠倒混匀 3~5 min，12 000 g 离心 10 min，收集上清，并重复 1 次，再次收集上清。向上清液中加入 0.7 倍体积的预冷异丙醇，-20℃下放置 1 h 以析出 DNA，再以 12 000 g 离心 10 min 收集沉淀，加入 70% 的乙醇静置 3~5 min，同样条件离心 5 min，重复 1 次。晾干 DNA，将其溶于 50 μ L 的 TE 溶液中，加入 1 μ L RNase 于 37℃水浴 1 h。

1.2.5 DNA 浓度和质量的检测

吸取 1 μ L 提取的 mtDNA 样品，采用微量分光光度计(Nanodrop 2000)检测浓度和纯度。吸取 2 μ L 样品，加入 18 μ L ddH₂O 稀释 10 倍，吸取 1 μ L 稀释后的样品进行琼脂糖凝胶电泳检测，并以 10 ng 和 30 ng 的 λ DNA 为对照。

采用限制性内切酶 *EcoR* I 对提取的 mtDNA 样品进行酶切，酶切体系为 10 μ L，其中样品 DNA 200 ng/ μ L 0.5 μ L，*EcoR* I 0.5 μ L，10 \times buffer 1 μ L，ddH₂O 8 μ L，于 37℃下水浴 1 h，1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.6 mtDNA 纯度检测

以稀释 10 倍的 mtDNA 为模板，采用大豆细胞核、叶绿体和线粒体基因组特异性引物进行 PCR 扩增，验证其是否存在核基因组 DNA 和叶绿体 DNA 的污染。PCR 反应体系为：模板 DNA 2 μ L，上、下游引物各 1 μ L，2 \times *Es* *Taq* Master Mix 12.5 μ L，ddH₂O 8.5 μ L。PCR 反应条件为：94℃ 预变性

4 min；94℃ 变性 30 s，53℃ 退火 30 s，72℃ 延伸 30 s，共 30 个循环；72℃ 延伸 8 min。

2 结果与分析

2.1 蔗糖密度梯度离心纯化线粒体

研究结果表明，将本实验粗提到的线粒体用缓冲液悬浮，加入到铺设好蔗糖密度梯度的超速水平离心管中，经超速水平离心后出现分层。处理 1 中分层不明显(图 1)，且重复性不高，3 管均出现不同情况的分层，线粒体层聚集不明显，无法准确吸取线粒体层。处理 2 分层效果明显(图 2)，且 3 管分层均相同，可以看到明显的线粒体层，有利于线粒体的收集。实验结果说明处理 2 中改进的蔗糖密度梯度效果最佳。

2.2 mtDNA 浓度与质量检测

本研究将提取到的 mtDNA 通过微量分光光度计检测，浓度为 860.3 ng/ μ L， A_{260}/A_{280} 值为 1.96， A_{260}/A_{230} 值为 2.08，表明无 RNA、蛋白质和离子污染。吸取 2 μ L 提取的 mtDNA 原液，加入 18 μ L 纯水稀释 10 倍，以 10 ng 和 30 ng λ DNA 为对照，电泳检测结果显示条带清晰，表明无 RNA 污染和蛋白质残留现象(图 3)。进一步使用 *EcoR* I 对 mtDNA 进行酶切，电泳检测结果显示总基因组带型成弥散状，酶切后的 mtDNA 带型分布均匀(图 4)。说明本研究提取到的大豆 mtDNA 浓度高、质量好。

2.3 特异基因克隆鉴定线粒体 DNA 纯度

为了检验提取 mtDNA 的纯度，本研究参考大豆已知基因 *NARK*、*psbC* 和 *Cox III* 的序列，设计了 3 对引物(表 1)，分别以提取到的 mtDNA 和大

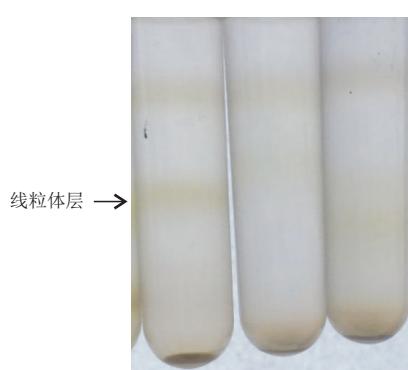


图 1 处理 1 纯化线粒体分层
Fig. 1 Purification of mitochondrial stratification of treatment one

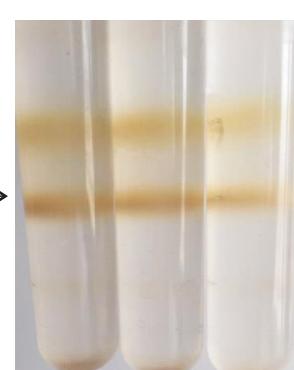
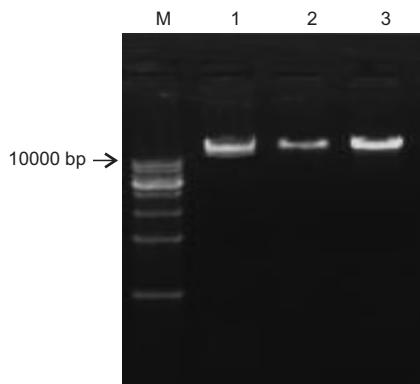


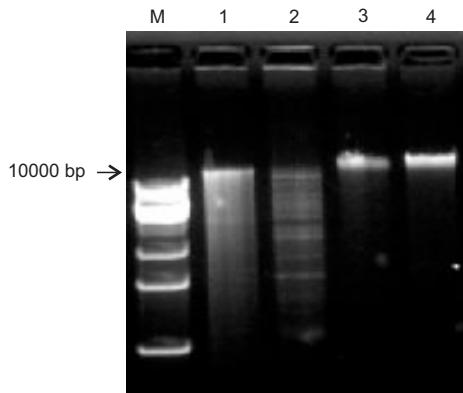
图 2 处理 2 纯化线粒体分层
Fig. 2 Purification of mitochondrial stratification of treatment two



M: 1 kb DNA ladder; 1: mtDNA; 2: 10 ng λ DNA; 3: 30 ng λ DNA.

图3 mtDNA浓度琼脂糖凝胶电泳检测

Fig. 3 Detection of mtDNA concentration by agarose gel electrophoresis



M: 1 kb DNA ladder; 1: 酶切基因组 DNA; 2: 酶切 mtDNA; 3: 酶切前基因组 DNA; 4: 酶切前 mtDNA。
1: Digested genomic DNA; 2: Digested mtDNA; 3: Genomic DNA before digestion; 4: mtDNA before digestion.

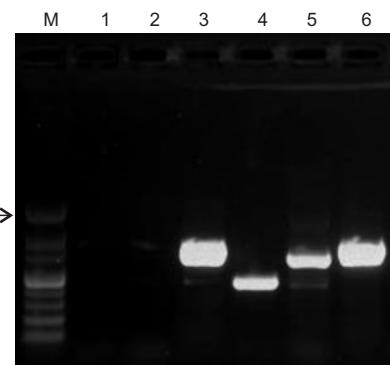
图4 mtDNA酶切凝胶电泳检测

Fig. 4 mtDNA enzyme gel electrophoresis detection

表1 引物序列
Table 1 Primer sequences

基因 Gene	来源 Source	引物序列(5'-3') Primer sequence (5'-3')
NARK	细胞核	F: GTGGAAGGAACGATTACGGA R: AATGAATGGAACCTGGAGCA
psbC	叶绿体	F: GCAGTATTGGGCTTGCG R: TCGGGGAACGCATTAGAT
CoxIII	线粒体	F: GCAGGGGCAATAACAATG R: CGACGAATCCCAACTACG

豆基因组 DNA 为模板, 进行 PCR 扩增。电泳检测结果发现, 提取到的 mtDNA 只有 Cox III 序列引物扩增出了目的条带, 而基因组 DNA 中 3 对引物均扩增出目的条带(图 5), 说明所提取到的 mtDNA 纯度较高, 无核基因组 DNA 和叶绿体 DNA 的污染。



M: 100 bp DNA ladder; 1 ~ 3: 线粒体 DNA; 4 ~ 6: 基因组 DNA; 3, 6: 线粒体 Cox III 基因引物; 2, 5: 叶绿体 psbC 基因引物; 1, 4: 核基因组 NARK 基因引物。

1 ~ 3: Mitochondrial DNA; 4 ~ 6: Genomic DNA; 3, 6: Mitochondrial Cox III gene primer; 2, 5: Chloroplast psbC gene primer; 1, 4: Nuclear genome NARK gene primers.

图5 mtDNA纯度琼脂糖凝胶电泳检测

Fig. 5 mtDNA purity agarose gel electrophoresis detection

3 讨论

研究发现, 高等植物的线粒体基因组相对于动物较大并且结构较复杂, 细胞质雄性不育也与线粒体基因组有着密切联系。因此, 提取高质量线粒体 DNA 对雄性不育、细胞内基因转移及基因进化等研究具有重要意义^[14]。植物细胞总 DNA 包含 3 部分, 核基因组 DNA、线粒体 DNA 和叶绿体 DNA, 因此想要得到高纯度线粒体 DNA, 需要除去核基因组和叶绿体 DNA 等污染。研究发现, 经过差速离心法可以去除大部分核基因组 DNA 污染, 再经 DNase I 消化即可完全去除核基因组 DNA, 但差速离心法无法将沉降系数差异小的叶绿体与线粒体分离开。目前利用 CsCl 梯度法和 Percoll 梯度离心法已分别从拟南芥(*Arabidopsis thaliana* L.)^[15]和小麦^[16]中获得了高纯度的 mtDNA, 但缺点是 CsCl 价格昂贵且有毒, 而 Percoll 梯度离心法则操作过程复杂。王述斌等^[17]利用蔗糖衬垫法, 从辣椒中获得了较纯的线粒体。陈建美^[18]、谢红卫^[19]和苏爱国^[20]均采用蔗糖密度梯度离心法在不同作物中成功地将叶绿体和线粒体分开, 可见利用蔗糖密度梯度法分离线粒体是较好的方法。

本研究结合不同的植物 mtDNA 提取方法, 并对前期本实验室使用的提取方法作出改进, 优化了差速离心过程中的离心力与离心时间, 最大程度地去除了经组织捣碎机捣碎后的一些细胞杂质, 从而获得了大量非纯化线粒体, 并进一步针对蔗糖密度

梯度铺设比例作出改进。结果表明, 改进后的方法能够完全去除叶绿体等杂质污染, 最终获得纯净的线粒体。

研究发现, SDS 作为阴离子型表面活性剂, 具有崩解细胞膜, 通过与膜蛋白疏水部分结合使其与膜分离, 从而使蛋白质中一些非共价键受到破坏甚至改变蛋白质构象的特点。本研究通过提高 mtDNA 提取时 SDS 的浓度和水浴温度, 同时加入醋酸钾除去多余 SDS, 从而获得了浓度大、质量高的大豆 mtDNA, 适用于分子生物学实验和高通量测序等后续研究。

参考文献:

- [1] Lane N, Martin W. The energetics of genome complexity [J]. *Nature*, 2010, 467(7318): 929–934.
- [2] Jarrett SG, Lewin AS, Boulton ME. The importance of mitochondria in age-related and inherited eye disorders [J]. *Ophthalmic Res*, 2010, 44(3): 179–190.
- [3] Cui H, Kong Y, Zhang H. Oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and aging [J]. *J Signal Transduct*, 2012, 2012: 646354.
- [4] 魏孟辉, 袁建, 何荣, 张斌, 赵腾. 大豆主要品质指标对其力学特性的影响 [J]. 粮食储藏, 2017, 46(1): 19–24.
Wei MH, Yuan J, He R, Zhang B, Zhao T. Effects of main quality indexes of soybean on its mechanical properties [J]. *Grain Reserve*, 2017, 46(1): 19–24.
- [5] Chang SX, Wang YK, Lu JJ, Gai JY, Li JJ, et al. The mitochondrial genome of soybean reveals complex genome structures and gene evolution at intercellular and phylogenetic levels [J]. *PLoS One*, 2013, 8(2): e56502.
- [6] Zaheer A, Fu YB. An improved method with a wider applicability to isolate plant mitochondria for mtDNA extraction [J]. *Plant Methods*, 2015, 11: 56.
- [7] Xie HW, Peng XJ, Qian MJ, Cai YC, Ding X, et al. The chimeric mitochondrial gene *orf182* causes non-pollen-type abortion in Dongxiang cytoplasmic male-sterile rice [J]. *Plant J*, 2018, 95: 715–726.
- [8] 田志宏. 甘蓝型油菜细胞质雄性不育系的线粒体 DNA 多型性及原生质体融合研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 1998.
- [9] 刘光耀, 巩振辉, 黄炜, 杜羽, 吉姣姣. 辣椒不育系和保持系线粒体差异基因获得及 SNP 分析 [J]. 中国农业大学学报, 2010, 15(5): 19–24.
Liu GZ, Gong ZH, Huang W, Du Y, Ji JJ. Mitochondrial differential gene acquisition and SNP analysis of pepper sterile line and maintainer line [J]. *Journal of China Agric-*
- cultural University
- [10] 胡建斌, 黄晋玲, 郭三堆. 一种棉花线粒体 DNA 的提取方法 [J]. 生物技术通报, 2005(6): 88–90.
Hu JB, Huang JL, Guo SD. A Method for extracting cotton mitochondrial DNA [J]. *Biotechnology Bulletin*, 2005(6): 88–90.
- [11] 李文强, 张改生, 汪奎, 牛娜, 潘栋梁. 小麦线粒体 DNA 的高效提取方法 [J]. 遗传, 2007, 29(6): 771–775.
Li WQ, Zhang GS, Wang K, Niu N, Pan DL. Efficient extraction of wheat mitochondrial DNA [J]. *Hereditas*, 2007, 29(6): 771–775.
- [12] 李玉秋, 张春宝, 赵洪锐, 谭化, 费晓燕. 适于基因组测序的高纯度的大豆线粒体基因组 DNA 提取方法 [J]. 基因组学与应用生物学, 2015, 34(8): 1734–1738.
Li YQ, Zhang CB, Zhao HK, Tan H, Fei XY. High-purity mitochondrial genomic DNA extraction method for genome sequencing [J]. *Genomics and Applied Biology*, 2015, 34(8): 1734–1738.
- [13] 费晓艳. 大豆细胞质雄性不育系及其配套保持系线粒体基因组的测序与分析 [D]. 长春: 吉林大学, 2011.
- [14] 陈志文, 王玉美, 聂虎帅, 王梅燕, 华金平. 植物水平基因转移研究进展 [J]. 中国农业大学学报, 2018, 23(1): 1–11.
Chen ZW, Wang YM, Nie HS, Wang MY, Hua JP. Progress in plant level gene transfer research [J]. *Journal of China Agricultural University*, 2018, 23(1): 1–11.
- [15] Murcha MW, Whelan J. Isolation of intact mitochondria from the model plant species *Arabidopsis thaliana* and *Oryza sativa* [M] // Whelan J, Murcha M, eds. *Plant Mitochondria*; Vol 1305. New York: Humana Press, 2015: 1–12.
- [16] Bartoli CG, Gómez F, Martínez DE, Guiamet JJ. Mitochondria are the main target for oxidative damage in leaves of wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. *J Exp Bot*, 2004, 55(403): 1663–1669.
- [17] 王述彬, 罗向东, 戴亮芳, 陈劲枫, 刘金兵, 等. 辣椒细胞质雄性不育系与其保持系线粒体 DNA 的 RAPD 分析 [J]. 江苏农业学报, 2008, 24(1): 44–47.
Wang SB, Luo XD, Dai LF, Chen JF, Liu JB, et al. RAPD analysis of mitochondrial DNA in cytoplasmic male sterile lines and their maintainer lines in pepper [J]. *Journal of Jiangsu Agricultural Sciences*, 2008, 24(1): 44–47.
- [18] 陈健美. 甘蓝型油菜 2 个细胞质雄性不育系的线粒体基因组研究 [D]. 南京: 南京农业大学, 2011.
- [19] 谢红卫. 一年生野生稻线粒体基因组及其在远缘杂交中的重组 [D]. 武汉: 武汉大学, 2013.
- [20] 苏爱国. 棉花线粒体基因组的测序和序列初步分析 [D]. 北京: 中国农业大学, 2013.