

文章编号: 1674-7054(2012)03-0252-06

# 热带果树基因组 DNA 提取方法的改良 及 Southern blot 分析

彭军<sup>1,2</sup>, 曾凡云<sup>1</sup>, 龙海波<sup>1</sup>, 黄俊生<sup>1</sup>, 郭建荣<sup>1</sup>

(1. 中国热带农业科学院 环境与植物保护研究所/农业部热带农林有害生物入侵监测与控制重点  
开放实验室/海南省热带农业有害生物监测与控制重点实验室 海南 儋州 571737;  
2. 中国农业大学 农学与生物技术学院/农业部植物病理学重点实验室 北京 100193)

**摘要:** 以香蕉、番木瓜、龙眼为代表材料, 建立一套适合热带果树基因组 DNA 提取的方法——改良 CTAB 法。将提取各基因组 DNA 经限制性内切酶完全消化后, 分别以香蕉内源乙烯受体基因(AF113748)、番木瓜八氢番茄红素脱氢酶基因 *PDS*(DQ779922)、龙眼开花相关基因 *LEAFY*(ADQ160214) 为探针进行 Southern blot 杂交。3 种植物的基因组 DNA 适宜上样量的 60  $\mu\text{g}$ , 杂交条带清晰, 背景弱, 说明采用改良 CTAB 法, 能保证基因组 DNA 提取的浓度和纯度, 符合 Southern blot 的要求。

**关键词:** 热带果树; DNA 提取; CTAB; Southern blot

**中图分类号:** Q 78

**文献标志码:** A

热带果树组织中富含多糖、多酚及其他次生代谢物质, 这给基因组 DNA 的提取造成了很大困难。常规 DNA 提取方法(如 CTAB, SDS 等)通过  $V_{\text{氯仿}}:V_{\text{异戊醇}} = 24:1$  抽提、高盐异丙醇沉淀等步骤, 仍不能完全去除果胶类多糖对热带果树基因组 DNA 提取的影响<sup>[1-2]</sup>; 其次, 在细胞裂解的过程中, 多糖、多酚尤其是氧化后的次生产物可以与 DNA 形成胶状混合物, 离心形成浅黄色甚至黄褐色共沉淀, 很难得到高质量的基因组 DNA<sup>[3-6]</sup>; 最后, 即使采用某些 DNA 提取试剂盒或者改进方法得到了基因组 DNA, 其内含的次生物质等也导致 DNA 酶解不完全或者无法酶切, 无法满足 Southern blot、AFLP 等对 DNA 的质和量的实验要求, 制约了后续分子生物学实验的开展<sup>[7-8]</sup>。为此, 笔者根据热带果树本身的特性, 结合多年的实践对 DNA 提取方法进行了改进, 并选取香蕉、番木瓜、龙眼 3 种具有代表性的热带果树为研究对象, 摸索出一套适合热带果树基因组 DNA 提取的改良 CTAB 法。该方法不仅保证了热带果树基因组 DNA 提取的纯度, 而且也保证了 DNA 的产量, 完全符合 Southern blot 的实验要求。

## 1 材料与方 法

**1.1 植物材料** “巴西”蕉(*Musa* spp.) 取自中国热带农业科学院香蕉组培中心, “SunUp”番木瓜(*Carica papaya* L.) 取自海南大学儋州校区环境与植物保护学院教学实践基地, “苗翘”龙眼(*Dimocarpus longan* Lour.) 品种由中国热带农业科学院品种与资源研究所提供, 叶片采集后  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存备用。

**1.2 试剂** 十六烷基三甲基溴化铵(CTAB), Tris, PVP, RNase A 等均为分析纯。限制性内切酶, DL2000 DNA Marker,  $\lambda$ -Hind III digest DNA Marker(D3403), 随机引物标记试剂盒(Random Primer DNA Labeling Kit Ver. 2.0, D6045) 购自 TaKaRa。同位素  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dCTP 购自中国同位素有限公司。

### 1.3 热带果树基因组 DNA 的提取

**1.3.1 液氮研磨** 取 2~5 g 叶片液氮加 PVP 研磨成粉后, 迅速转入 50 mL 离心管中。

收稿日期: 2012-07-09

基金项目: 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金项目(1630042012001); 中国热带农业科学院环境与植物保护研究所引进人才科研启动基金项目(Hzs1201)

作者简介: 彭军(1978-), 男, 湖北天门人, 中国热带农业科学院环境与植物保护研究所助理研究员。

通信作者: 郭建荣(1968-), 男, 博士, Tel: 0898-23307353, E-mail: guojianrong@hotmail.com

1.3.2 预处理 按照  $V_{\text{缓冲液}} : m_{\text{叶片}} = 1 \text{ mL} : 1 \text{ g}$  加入裂解缓冲液 STE ( $700 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 NaCl,  $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  Tris-Cl (pH8.0),  $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 EDTA (pH8.0),  $\mu = 2\%$  的 PVP,  $\varphi = 2\%$  的  $\beta$ -巯基乙醇) 涡旋成糊状后静置 3~5 min,  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$   $5000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 10 min, 弃上清。

1.3.3 DNA 的提取 1) 按照  $V_{\text{缓冲液}} : m_{\text{叶片}} = 5 \text{ mL} : 1 \text{ g}$  的比例加入  $65 \text{ }^{\circ}\text{C}$  预热的  $3 \times$  CTAB 缓冲液 ( $w = 3\%$  的 CTAB,  $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 Tris-Cl (pH8.0),  $25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 EDTA (pH8.0),  $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 NaCl,  $2\%$  的  $\beta$ -巯基乙醇) 涡旋匀浆 30 s; 2)  $65 \text{ }^{\circ}\text{C}$  水浴 30~60 min, 每 10 min 颠倒混匀 1 次; 3) 加入等体积的  $V_{\text{氯仿}} : V_{\text{异戊醇}} = 24 : 1$  涡旋混匀, 静置分层后于  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$   $12000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 15 min; 4) 取上清加入等体积的  $V_{\text{氯仿}} : V_{\text{异戊醇}} = 24 : 1$  涡旋混匀, 静置分层后于  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$   $12000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 15 min (如果界面残留蛋白较多可以重复 1 次); 5) 取上清, 加入 1/10 体积  $65 \text{ }^{\circ}\text{C}$  预热的  $10 \times$  CTAB 缓冲液 ( $w = 10\%$  的 CTAB,  $700 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 NaCl, 颠倒混匀后再加入 2.5 倍体积的无水乙醇,  $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$  放置不超过 1 h; 6) -A (推荐)、直接从 50 mL 离心管中挑取悬浮于液面上层的成簇丝状 DNA 团, 放入 2 mL 离心管, 用  $\varphi = 70\%$  的无水乙醇洗涤 2~3 次,  $5000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 5 min, 收集沉淀, 加入 1~2 mL 高盐 TE ( $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 NaCl,  $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 Tris-Cl,  $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 EDTA, pH8.0),  $65 \text{ }^{\circ}\text{C}$  助溶; 6) -B (或者)  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$   $12000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 10 min, 弃上清, 加入 1~2 mL 的高盐 TE ( $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 NaCl,  $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 Tris-Cl,  $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 EDTA, pH8.0),  $65 \text{ }^{\circ}\text{C}$  助溶后转入 2 mL 的离心管; 7) 每管加入 100  $\mu\text{L}$  的 RNase A ( $\rho = 10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ),  $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$  水浴 60 min (2~3 h 或者过夜效果更好) 后加入等体积  $V_{\text{酚}} : V_{\text{氯仿}} : V_{\text{异戊醇}} = 25 : 24 : 1$  涡旋 30 s 后静置分层, 于  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$   $12000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 10 min; 8) 取上清加入等体积  $V_{\text{氯仿}} : V_{\text{异戊醇}} = 24 : 1$  涡旋 30 s, 于  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$   $12000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 10 min (界面不清可重复氯仿抽提 1 次); 9) 取上清加入 2.5 倍体积的无水乙醇, 颠倒混匀后于  $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$  放置 30~60 min; 10)  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$   $12000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 10 min, 用  $\varphi = 70\%$  的乙醇漂洗 2 次后吹干, 加适量 ddH<sub>2</sub>O 溶解调整质量浓度为  $0.1 \sim 0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$  保存备用。

1.4 DNA 浓度和纯度测定 提取的 DNA 首先进行  $w = 1\%$  的琼脂糖电泳, 其次使用 Nanodrop2000 (Thermo) 测定浓度。

1.5 DNA Southern blot 探针标记及杂交 对应 3 种靶标基因的 PCR 切胶回收产物用 TaKaRa 随机引物标记试剂盒 (Random Primer DNA Labeling Kit Ver. 2.0, D6045) 进行杂交探针标记, 具体操作如下: 在 1.5 mL Eppendorf 离心管中加入切胶回收纯化后的 PCR 产物 (模板 DNA) 10~100 ng, Random Primer ( $1.1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 2  $\mu\text{L}$ ,  $\lambda$ -Hind III fragment ( $0.025 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 0.5  $\mu\text{L}$ , 加水至 14  $\mu\text{L}$ ,  $95 \text{ }^{\circ}\text{C}$  加热 3 min 后迅速置于冰中冷却 5 min; 加入  $10 \times$  buffer, dNTP Mixture 各 2.5  $\mu\text{L}$ , Exo-free Klenow ( $2 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ) 1  $\mu\text{L}$ , 最后在同位素操作室中加入  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dCTP ( $10 \text{ Ci} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 5  $\mu\text{L}$ , 混匀后  $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$  反应 15 min。反应完成后加入 175  $\mu\text{L}$  的 ddH<sub>2</sub>O,  $95 \text{ }^{\circ}\text{C}$  加热 3 min 后, 迅速置冰中骤冷以防探针复性。每个样品消解 10 管共 60  $\mu\text{g}$  的 DNA, 每管取 6  $\mu\text{g}$  的 DNA, 在 100  $\mu\text{L}$  体系中用 60 U 对应的限制性内切酶单酶切 16~20 h 后, 乙醇沉淀 DNA, 溶解在 50  $\mu\text{L}$  去离子水中。加入 5  $\mu\text{L}$   $10 \times$  Loading buffer 后上样, 用  $w = 0.8\%$  的琼脂糖 30 V 电泳 16 h 后转膜, UV 交联后, 用 Church buffer  $65 \text{ }^{\circ}\text{C}$  进行杂交过夜。杂交结束后用 washing buffer ( $2 \times$  SSC,  $\mu = 0.2\%$  的 SDS) 洗 2~3 次, 每次 15~30 min, 磷屏压片后用 Typhoon Trion 扫描成像。

香蕉 (*Musa spp.*) 以乙烯受体基因 (AF113748) 为靶标进行 Southern Blot 杂交, 探针扩增所用的引物序列为 Ethylene receptor-F: GTGGGAGAAAGTGGCATGTT, Ethylene receptor-R: CCTTTTCCAATGCCAT-CACT, 扩增片段大小为 877 bp<sup>[11-12]</sup>。基因组 DNA 采用 BamH I 和 EcoR I 限制性内切酶完全消化后进行后续试验。

番木瓜 (*Carica papaya L.*) 以八氢番茄红素脱氢酶基因 PDS (Phytoene desaturase) 为靶标<sup>[13]</sup>。根据 GenBank DQ779922.2 和 DQ666830.2 的编码序列设计引物扩增序列作为探针。Papaya-PDS-385F: TATTTGGCAGATGCAGGTCA, Papaya-PDS-1563R: AGGTTCAACCTGGGACAG, 扩增片段大小为 871 bp。番木瓜的 DNA 采用 BamH I, Kpn I 2 种限制性内切酶单酶切后进行后续试验。

龙眼 (*Dimocarpus longan Lour.*) 以开花相关基因 LEAFY 为靶标 (DQ160214)<sup>[14]</sup>。探针扩增采用引物序列为: LEY-F: TTCAGGCTTATGGGATCAGG, LEY-R: AATGCATTGGATGCTTCCTC (扩增片段大小为 761

bp) 基因组 DNA 采用 *EcoR* I , *Kpn* I 限制性内切酶完全消化后进行后续试验。

## 2 结果与分析

2.1 改良 CTAB 法提取果树基因组 DNA 笔者建立的提取方法最核心之处在于去除多糖、多酚及其次生物质对 DNA 的影响,保证了 DNA 的浓度和纯度。因此,在液氮研磨后加入核裂解缓冲液,先部分去除多糖多酚等杂质。在 CTAB 裂解、氯仿抽提后采用终浓度为 1 × CTAB 结合多糖类物质使之沉入离心管底而 DNA 则悬浮于液面,手工挑取 DNA 避免离心沉淀中次生物质与 DNA 共沉淀而造成污染。图 1 是 10 × CTAB 结合多糖类物质时的平视及俯视图,第 2 次氯仿抽提是色素颜色,番木瓜是绿色上清,而香蕉为淡黄色上清(图 1)。

### 2.2 不同热带果树基因组 DNA 样品质量检测

常规 CTAB 方法提取的 DNA 为黄褐色并且粘稠,而采用改良 CTAB 法提取的 DNA 呈乳白色,风干后无色透明,没有黄褐色的杂质存在。2 种方法提取的果树基因组 DNA 质量与浓度见表 1。不同果树基因组 DNA 电泳见图 2,每孔上样量为 3 μg。结果显示,改良后提取的 DNA 的纯度较高,蛋白质、酚类、果胶、色素等物质去除比较彻底,RNA 消化的比较完全,提取时残留的氯仿、乙醇等小分子成分基本去除,可以供后续 Southern blot 分析。

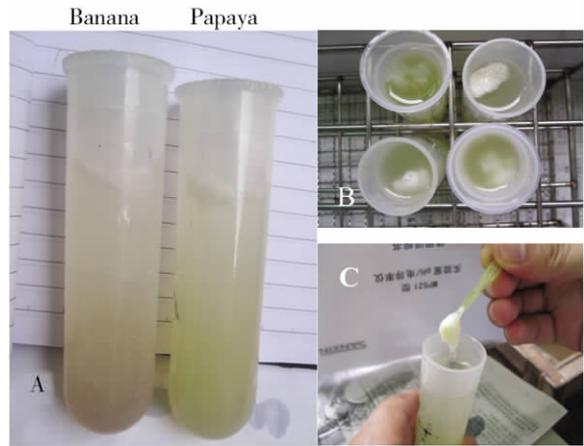


图 1 悬浮于液面上层的白色絮状 DNA 及其挑取示意图  
A: 上层为白色絮状 DNA 团,中间为透明层,下层为 CTAB 结合多糖和色素形成的有色层; B: 俯视图显示絮状 DNA 团悬浮于液面上层; C: 用牙签或者枪头挑取 DNA

表 1 常规 CTAB 法与改良 CTAB 法提取的果树基因组 DNA 质量与质量浓度

种类	方法	$OD_{260}/OD_{280}$	$OD_{260}/OD_{230}$	质量浓度/( $g \cdot L^{-1}$ )
香蕉	常规法	1.46	0.22	0.59
	改良法	1.98	2.40	0.88
番木瓜	常规法	1.67	0.37	1.25
	改良法	1.95	2.02	0.97
龙眼	常规法	1.61	0.39	1.29
	改良法	1.85	1.75	0.42

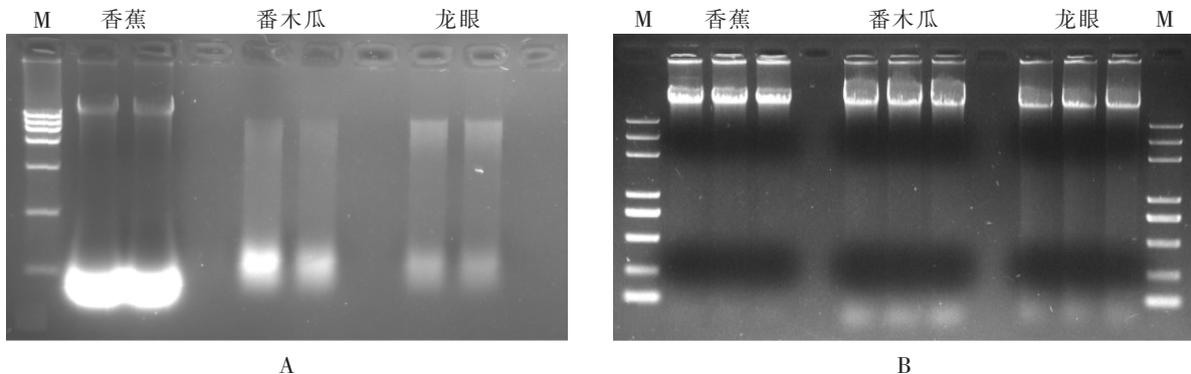


图 2 3 种热带果树基因组不同提取方法的 DNA 电泳图

A: 常规 CTAB 提取不同果树基因组 DNA 电泳图; B: 改良 CTAB 法提取不同果树基因组 DNA 电泳图;  
M: DL2000 DNA Marker

2.3 提取的 DNA 样品的酶切鉴定 常规方法提取的热带果树基因组 DNA 纯度和浓度能够达到要求,但是限制性内切酶消化不完全,这主要是由于沉淀的 DNA 中含有次生物质抑制限制性内切酶的活性,电泳检测时酶切片段不是正态的“smear”分布,中间存在数条清晰可见的条带。这样的 DNA 酶解不完全,

可能导致杂交后存在杂带且图片背景很深,影响对杂交结果的判断(结果未显示)。

改良 CTAB 法提取的 DNA 分别采用不同限制性内切酶消化后,条带弥散呈正态“smear”分布,条带间没有未消解完全的、清晰可见的 DNA 条带,说明限制性内切酶消化完全,可进行后续杂交实验(图3)。

2.4 Southern blot 分析 在 Southern blot 杂交实验中,单一拷贝的基因杂交难度最大,为此,本实验特别选取了香蕉单拷贝的乙烯受体基因进行杂交验证 DNA 提取方法。本实验的杂交结果与文献[11-12]的研究结果一致,香蕉乙烯受体基因在巴西蕉中为单一拷贝。本实验对文献[13]的结果进行了补充,证明 PDS 在番木瓜中是单一拷贝。开花相关基因 *LEAFY* 是目前研究较多的 1 个龙眼基因,主要参与龙眼成花逆转过程。本研究结果和文献[14]均证实龙眼的 *LEAFY* 基因为单一拷贝。

本研究中的 Southern blot 杂交条带清晰,背景弱,没有出现杂带干扰,说明基因组 DNA 酶解完全,进一步验证改良 CTAB 法是一种适合热带作物的高质量 DNA 的提取方法。

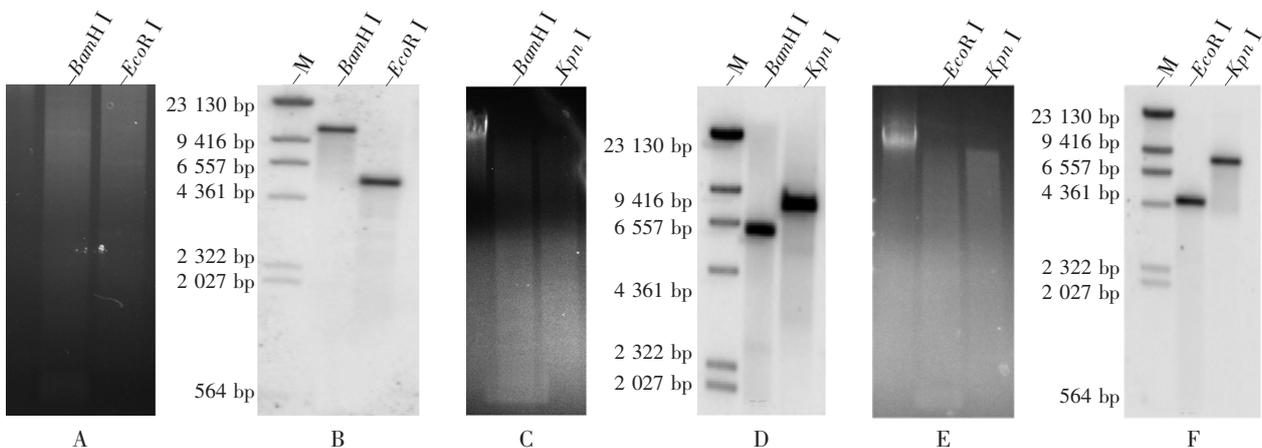


图3 3种热带果树基因组 DNA 单酶切电泳图谱及相应 Southern blot 杂交

A: 香蕉基因组 DNA 单酶切电泳图; B: 香蕉乙烯受体基因的 Southern blot 杂交图; C: 番木瓜基因组 DNA 单酶切电泳图; D: 番木瓜 PDS 基因 Southern blot 杂交图; E: 龙眼基因组 DNA 单酶切电泳图; F: 龙眼 *LEAFY* 基因 Southern blot 杂交图; M:  $\lambda$ -*Hind* III digest DNA Marker

### 3 讨论

随着热带果树功能基因组及遗传转化研究的开展,很多实验对基因组 DNA 的纯度和浓度提出更高的要求,而热带果树中普遍存在较多的多糖、多酚、果胶等物质,常规的 CTAB 和 SDS-蛋白酶 K 等无法满足去除这些杂质的需要<sup>[15-16]</sup>,而相关的 DNA 提取试剂盒都是按照模式作物拟南芥、烟草等设计的,很少有针对热带果树特性设计的 DNA 提取试剂盒。因此,摸索一套适合热带果树通用的 DNA 提取方法显得至关重要。

获得高质量和高纯度的 DNA 是进行热带果树分子生物学研究,特别是 Southern blot, AFLP 等试验的先决条件。笔者选取香蕉、番木瓜和龙眼这 3 种具有典型代表并且自身特性各异的植物材料进行 DNA 提取和 Southern 杂交,摸索出一套适合热带果树可用于 Southern blot 分析的基因组 DNA 提取方法。

在实际操作过程中,由于不同植物材料具有一些不同的生理生化特性, DNA 提取过程中某些步骤可以省略或者跳过,改良 CTAB 法不仅保证了热带果树基因组 DNA 产量,而且保证了其纯度,避免了由于次生物质的存在而导致的  $OD_{260}/OD_{280}$  比值正常而 DNA 无法酶切完全等问题,提取的 DNA 单酶切后电泳均显示正态“smear”分布,保证了后续 Southern blot 实验的顺利进行。

3.1 DNA 提取步骤的改进 DNA 纯度是进行 Southern blot 分析的关键因素之一。而热带果树中多糖、多酚等物质一旦与 DNA 不可逆结合后采用氯仿、高盐或 CTAB 等均无法去除时,可以采用预处理的方法在核裂解提取 DNA 之前先用核分离 STE 缓冲液处理,充分混匀后将细胞内的大部分多糖和果胶类物质溶解后离心弃上清,然后再用 CTAB 提取缓冲液进行 DNA 抽提<sup>[17-18]</sup>。这样,不仅保证了核细胞和 DNA 的完整性,而且去除了大部分的多糖和果胶,这样可能有部分 DNA 损失,但是保证了后续 DNA 的纯度。

另外,在DNA乙醇沉淀的步骤中,挑取悬浮于液面上成簇的丝状DNA,用 $\varphi = 75\%$ 的乙醇清洗后直接后续纯化。而常规DNA乙醇沉淀后常常得到非常多的胶状沉淀,这些胶状物质理化性质与DNA相似,常规的酚、氯仿、高盐等方法无法去除。

**3.2 DNA的纯化** CTAB(十六烷基三甲基溴化铵)是一种阳离子去污剂,在高离子强度的溶液中( $>0.7 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的NaCl),CTAB与蛋白质和多聚糖形成复合物,使DNA游离出来<sup>[19]</sup>。基于此原理,在DNA沉淀步骤中,为了进一步去除残存的多糖和果胶类物质,加入了1/10体积的 $10 \times$ CTAB,即等体积的 $1 \times$ CTAB,充分混匀结合多糖后再加入无水乙醇沉淀DNA,结合后的复合物一般沉入离心管底,这更方便在液面上挑取纯净的DNA团。另外,沉淀时间过长容易导致CTAB与多糖类物质的复合物与DNA共沉淀,因此,控制沉淀时间以不超过1h为宜。

离心后用高盐TE 65℃溶解DNA沉淀,然后加入RNase A降解RNA,最后用酚/氯仿等进行抽提。这样既避免了其他与DNA共沉淀杂质对后续DNA纯度的影响,也可以将RNase A作为外源蛋白杂质清除。在高盐TE溶解DNA沉淀的时候,经常可以看到离心管底有一些不溶的黄褐色粘稠状物质,这些物质就是CTAB、多糖、DNA三者复合物,可以用牙签或者枪头给予剔除。

**3.3 提取方法考虑不同植物自身的特性和差异** 热带果树不同的材料之间存在很大差异<sup>[20]</sup>。番木瓜叶片研磨后直接加入CTAB缓冲液会变得十分粘稠,涡旋无法使其匀浆,这时必须使用核裂解缓冲液STE预处理,否则沉淀的DNA会含有大量的果胶,无法使用<sup>[21]</sup>。香蕉非常容易褐化,因此,防止样品褐化是最重要的,不进行预处理对DNA的影响不大。另外,香蕉材料的DNA产率比较低,无水乙醇沉淀步骤中成簇DNA较少、较短,为了增加DNA产量,在研磨的时候可以按比例适度增加样品的量<sup>[22]</sup>。龙眼是典型的顽拗性植物,除了多糖、多酚和次生物质外,其DNA产率相当低,嫩叶产率高于老叶,建议加大样品的研磨量以提高DNA产量<sup>[23]</sup>。

另外,采用本方法尝试荔枝、菠萝蜜、芒果等热带果树的基因组DNA提取,均可获得高质量的DNA,其产量和质量都完全满足PCR和Southern blot的要求,与Mace等报道的方法相比较<sup>[24]</sup>,更适合作为一种通用的热带果树DNA提取方法。

## 参考文献:

- [1] CRUZ M, WHITKUS R, MOTA-BRAVO L. Tropical tree DNA isolation and amplification [J]. *Molecular Ecology*, 1995, 4: 787-789.
- [2] SHARMA A D, GILL P K, SINGH P. DNA isolation from dry and fresh samples of polysaccharide-rich plants [J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2002, 20(4): 415.
- [3] JOBES D V, HURLEY D L, THIEN L B. Plant DNA isolation: a method to efficiently remove polyphenolics, polysaccharides, and RNA [J]. *Taxon*, 1995, 44: 379-386.
- [4] ANGELES J G C, LAURENA A C, MAETECSON-MENDOZA E. Extraction of genomic DNA from the lipid, polysaccharide, and polyphenol-rich coconut (*Cocos nucifera* L.) [J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2005, 23: 297-298.
- [5] KEB-LLANES M, GONZALEZ G, CHI-MANZANERO B, et al. A rapid and simple method for small-scale DNA extraction in Agavaceae and other tropical plants [J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2002, 20(3): 299.
- [6] CONDIT R, HUBBELL S P. Abundance and DNA sequence of two-base repeat regions in tropical tree genomes [J]. *Genome*, 1991, 34(1): 66-71.
- [7] WOODHEAD M, DAVIES H V, BRENNAN R M, et al. The isolation of genomic DNA from black currant (*Ribes nigrum* L.) [J]. *Molecular Biotechnology*, 1998, 9: 243-246.
- [8] CHENG Y J, GUO W W, YI H L, et al. An efficient protocol for genomic DNA extraction from citrus species [J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2003, 21: 177-178.
- [9] AHMED I, ISLAM M, ARSHAD W, et al. High-quality plant DNA extraction for PCR: an easy approach [J]. *Journal of Applied Genetics*, 2009, 50: 105-107.
- [10] KOTCHONI S O, GACHOMO E W. A rapid and hazardous reagent free protocol for genomic DNA extraction suitable for genetic studies in plants [J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2009, 27: 1633-1636.
- [11] NAKATSUKA A, MURACHI S, OKUNISHI H, et al. Differential expression and internal feedback regulation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase, 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase, and ethylene receptor genes in tomato fruit during development and ripening [J]. *Plant Physiology*, 1998, 118: 1295-1305.

- [12] 冯斗 张春发 张颖. 香蕉乙炔受体基因 cDNA 的克隆及其表达分析[J]. 热带作物学报 2004(1): 6-10.
- [13] YAN P, GAO X Z, SHEN W T, et al. Cloning and expression analysis of phytoene desaturase and  $\zeta$ -carotene desaturase genes in *Carica papaya* [J]. Molecular Biology Reports 2011 38: 785-791.
- [14] 曾黎辉 王庆莲 洪自同 等. 龙眼 *LEAFY* 同源基因片段的克隆和表达[J]. 热带作物学报 2006(4): 69-73.
- [15] CHENG F S, BROWN S K, WEEDEN N F. A DNA extraction protocol from various tissues in woody species [J]. Hort-Science 1997 32: 921-922.
- [16] CHUNG C H, KWON O C, YI Y B, et al. Isolation of quality genomic DNA from tenacious seeds of sesame and perilla [J]. Plant Tissue Culture and Biotechnology 1998 4: 42-48.
- [17] GAWEL N J, JARRET R L. A modified CTAB DNA extraction procedure for *Musa* and *Ipomoea* [J]. Plant Molecular Biology Reporter 1991 3: 262-266.
- [18] POREBSKI S, GRANT BAILEY L, BAUM B R. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components [J]. Plant Molecular Biology Reporter 1997 15: 8-15.
- [19] DEL SAL G, MANFIOLETTI G, SCHNEIDER C. The CTAB-DNA precipitation method: a common mini-scale preparation of template DNA from phagemids, phages or plasmids suitable for sequencing [J]. Biotechniques 1989 7(5): 514-520.
- [20] 陈桂信 潘东明 吕柳新 等. 果树核 DNA 提取、目的基因分离与克隆技术研究进展 [J]. 福建农林大学学报: 自然科学版 2002 31(1): 44-50.
- [21] 赵琳娜 胡凤月 吴孝槐 等. 用于转基因检测的番木瓜基因组 DNA 提取方法的比较 [J]. 现代食品科技 2010 26(2): 188-191.
- [22] 易干军 于晓英 霍合强 等. 香蕉种质资源的 AFLP 鉴别与分类中 DNA 模板的制备 [J]. 果树学报 2001 18(6): 345-348.
- [23] 肖璇 孙敏 王燕 等. 顽拗植物龙眼基因组 DNA 提取方法的研究 [J]. 生物技术 2005 15(1): 44-47.
- [24] MACE E S, BUHARIWALLA H K, CROUCH J H. A high-throughput DNA extraction protocol for tropical molecular breeding programs [J]. Plant Molecular Biology Reporter 2003 21: 459-460.

## A Modified DNA Extraction Method for Tropical Fruit Trees and Southern Blot Analysis

PENG Jun<sup>1,2</sup>, ZHENG Fan-yun<sup>1</sup>, LONG Hai-bo, HUANG Jun-sheng<sup>1</sup>, GUO Jian-rong<sup>1</sup>

(1. Environment and Plant Protection Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences;

Ministry of Agriculture Key Laboratory of Monitoring and Control of Tropical Agricultural and Forest Invasive Alien Pests;

Hainan Key Laboratory of Monitoring and Control of Tropical Agricultural Invasive Alien Pests, Danzhou 571737, China;

2. Department of Plant pathology China Agricultural University; Ministry of Agriculture Key Laboratory of Plant Pathology, Beijing 100193, China)

**Abstract:** Tissues of most tropical fruit trees contain polysaccharide and polyphenolics that restrict the extraction of high-quality genomic DNA for further molecular biology analysis. This experiment was conducted to develop a simple, universal and effective modified CTAB method for genomic DNA extraction from tissues of tropical fruit trees for southern blot analysis. This optimized procedure includes two steps. First, before the DNA was extracted, the polysaccharide and polyphenolics were pre-removed through the STE lysis buffer by centrifugation. In addition, possible contamination by secondary metabolites could be avoided by picking up the cotton-shaped genomic DNA floccules resuspended in liquid at the DNA precipitation step with ethanol. With the modified CTAB method, high-quality DNAs were extracted from young leaves of the three representative tropical fruit trees, banana (*Musa* spp.), papaya (*Carica papaya* L.) and longan (*Dimocarpus longan* Lour.). After digested with different restriction enzymes, fragments of banana ethylene receptor gene (GenBank accession No. AF113748), papaya phytoene desaturase gene (DQ779922) and longan flowering-related *LEAFY* homologous gene (DQ160214) were used as probes for further Southern blot analysis, respectively. The hybridization bands were clear with high background. The results indicate that the modified CTAB method, with pre-treated conjugation by DNA pick-up, is a simple and effective protocol for genomic DNA isolation from tropical fruit trees, which produces high-quality genomic DNA available for further Southern blot analysis and other tests in molecular biology.

**Key words:** tropical fruits tree; DNA extraction; modified CTAB method; Southern blot analysis