

· 技术方法 ·

火龙果茎基因组DNA提取方法改良

农全东^{1,2,3}, 张明永^{1,2}, 张美², 简曙光², 陆宏芳², 夏快飞^{1,2*}, 文和明^{3*}

¹中国科学院华南植物园, 中国科学院华南农业植物分子分析与遗传改良重点实验室, 广州 510650

²中国科学院华南植物园, 广东省应用植物学重点实验室, 广州 510650; ³文山州农业科学院, 文山 663099

摘要 火龙果(*Hylocereus undulatus*)是近年发展起来的一种新兴热带水果, 其茎富含多糖、多酚及其它次生代谢物, 黏性极大, 很难从中提取高质量的DNA。特别是一年生以上的老茎, 目前尚未有较好的DNA提取方法。为了解决这一难题, 该研究对CTAB+Tris-HCl洗涤法进行了3种方式的改良。结果表明, “改进三”方法可不受取样时期和取样部位的限制, 从一年生以上火龙果茎中提取的DNA质量最好且不含黏性物质, 可用于酶切与分子标记等生化和分子生物学实验。该研究探索了一条较为理想的火龙果茎DNA提取方法, 值得推广应用。

关键词 火龙果, 茎, DNA提取, 改进CTAB+Tris-HCl洗涤法

农全东, 张明永, 张美, 简曙光, 陆宏芳, 夏快飞, 文和明 (2019). 火龙果茎基因组DNA提取方法改良. 植物学报 54, 371–377.

火龙果(*Hylocereus undulatus*)又称红龙果、青龙果和仙蜜果等, 为蔓藤类仙人掌科(Cactaceae)量天尺属(*Hylocereus*)(或蛇鞭柱属(*Selenicereus*))植物, 是近年发展起来的一种新兴热带亚热带果树(邓仁菊等, 2011); 其风味独特, 营养丰富, 含有一般植物少有的植物性白蛋白、花青素, 丰富的维生素和水溶性膳食纤维, 以及黄酮类、植物甾醇类化合物和多糖等活性物质, 对人体健康非常有益(申世辉等, 2015; 张桂春等, 2017)。火龙果花、茎、果实皆可食用和观赏, 是集果树、花卉和蔬菜于一体的特色植物。火龙果原产于墨西哥及美洲大陆等地, 是当地传统的食物来源和经济作物。我国于20世纪90年代开始引种火龙果, 现已在海南、广东、福建、广西、云南及贵州等省自治区广泛种植(罗小艳和郭璇华, 2007; 田新民等, 2015)。然而, 目前我国火龙果种质资源鉴定和评价工作较为落后, 在育种上还是以传统育种技术为主, 一定程度地影响了火龙果的育种研究进程(董美超等, 2013)。现代生物技术的高速发展有效提高了育种效率并缩短了育种周期, 故在植物育种中的应用越来越广泛(冯建成, 2006; 李建生, 2007; 邱丽娟等,

2007; 程文等, 2016; 马小军和莫长明, 2017)。DNA是现代分子生物学研究的主要对象之一, DNA质量的优劣直接影响以其为基础的各项分子生物学实验(詹少华和尹艺林, 2008; 罗焜等, 2012; 吴敏娜等, 2015; 傅建敏等, 2015)。因此, 能否提取到高质量的DNA对分子生物学研究极为重要。

植物基因组DNA的提取方法有很多, 常用的有普通CTAB法(Murray and Thompson, 1980)、SDS法(梁雪莲等, 2007; 韩静丹等, 2012)、高盐沉淀法(吴丽圆, 2004)和试剂盒提取方法(李会等, 2013)等。对不同植物, 由于其所含成分不同, DNA提取方法也不尽一致。火龙果组织富含多糖、植醇、维生素E、白蛋白及其它次生代谢物质等黏性成分, 显著增加了其DNA提取难度。目前, 火龙果DNA主要通过微量CTAB法(余志雄等, 2010)和试剂盒提取方法(陈明贤, 2012; 张冰雪等, 2013)从其嫩茎中提取。而相关研究表明, 微量CTAB法并不能够从抽生3个月以上的嫩茎中提取质量较好的DNA (陈明贤, 2012; 吴琳, 2016)。试剂盒提取方法虽然可从火龙果茎中提取到质量较好的DNA, 但提取的DNA量少, 且成本高。此

收稿日期: 2018-06-11; 接受日期: 2018-10-14

基金项目: 中国科学院A类战略性先导科技专项(No.XDA13020500)和广州市科技计划(No.201804010409)

* 通讯作者。E-mail: xiakuaifei@scbg.ac.cn; 441586713@qq.com

外,我们的研究发现,使用普通植物基因组DNA提取试剂盒提取一年生以上火龙果茎DNA需严格控制样品量,否则容易造成柱子堵塞。火龙果主要以枝条(茎)扦插方式繁殖,鉴于其花和果具有季节性,导致野外取样不方便。因此,探索一种不受取样时间和部位限制、成本低且容易操作的火龙果DNA提取方法势在必行。

CTAB+Tris-HCl洗涤法(张芬等, 2011)是针对兰花植物中多糖等黏性物质建立的一种DNA提取方法。该方法先对样品黏性物质进行洗涤,然后再进行DNA萃取,有可能适用于火龙果茎DNA的提取。然而经尝试,发现该方法尚不能从火龙果老茎中提取质量较好的基因组DNA。因此本研究基于此方法,对样品的预处理、洗涤和萃取过程进行改良,同时简化了DNA提取过程,建立了一种较好的适用于火龙果茎DNA提取的方法。

1 材料与方法

1.1 植物材料

以一年生以上的火龙果(*Hylocereus undulatus* Britt.)茎为材料,按照颜色和大小分为绿色宽大型、绿色窄小型和紫红窄小型。实验用火龙果种植于中国科学院华南植物园火龙果种质资源圃中(经度113°21', 纬度23°10'12")。

1.2 DNA提取

参考张芬等(2011)的CTAB+Tris-HCl洗涤法,并进行以下3种不同的改进:

改进一: (1) 取0.2–0.3 g去除中间髓部分的火龙果茎,液氮研磨成粉末,移入2 mL离心管中,加入1.5 mL Tris洗涤液(200 mmol·L⁻¹ Tris-HCl; 40 mmol·L⁻¹ EDTA; 5 mol·L⁻¹ NaCl), 摇匀,静置10分钟,室温下12 000 ×g离心10分钟,弃上液;重复洗涤3–4次。(2) 加入1.3 mL CTAB裂解液(2% CTAB; 100 mmol·L⁻¹ Tris-HCl; 20 mmol·L⁻¹ EDTA; 1.4 mol·L⁻¹ NaCl), 振荡混匀, 65°C水浴45分钟, 每10分钟轻摇1次; (3) 室温下12 000 ×g离心10分钟, 将上清液转入另一个1.5 mL离心管中, 加入等体积的氯仿:异戊醇(24:1, v/v)混合液抽提, 室温下12 000 ×g离心10分钟; (4) 将上清液转移至新的离心管中, 加

入等体积的氯仿:异戊醇(24:1, v/v)混合液再次抽提, 室温下12 000 ×g离心10分钟; (5) 将上清液转移至新的离心管中, 加入2/3体积的异丙醇, 轻摇, 使其充分混匀, 置于–20°C下30分钟; (6) 室温下12 000 ×g离心15分钟, 弃上清液, 可见絮状沉淀, 即为DNA沉淀, 用75%乙醇洗涤2遍, 置于室温风干; (7) 加入50 μL 50 μg·L⁻¹ RNase水溶解沉淀, 放置–20°C冰箱中保存。

改进二: 对“改进一”中的步骤1和3同时优化, 步骤1优化后变为: 取0.5–1.0 g去除中间髓部分的火龙果茎, 液氮研磨成粉末, 移入50 mL离心管中, 加入45 mL Tris洗涤液(200 mmol·L⁻¹ Tris-HCl; 40 mmol·L⁻¹ EDTA; 5 mol·L⁻¹ NaCl), 摇匀, 静置10分钟, 室温下8 000 ×g离心10分钟, 弃上液。将沉淀转移至2 mL离心管中继续用Tris洗涤3–4次。步骤3的优化为将氯仿:异戊醇(24:1, v/v)混合液改为酚:氯仿:异戊醇(25:24:1, v/v/v), 其余步骤同“改进一”。

改进三: 在“改进二”的基础上将步骤1改为: 取0.5–1.0 g去除中间髓部分及含90%以上肉质部分的火龙果茎, 液氮研磨成粉末, 移入50 mL离心管中, 加入45 mL灭菌蒸馏水, 摇匀, 静置10分钟, 室温下8 000 ×g离心10分钟, 弃上液。将沉淀转移至2 mL离心管中继续用Tris洗涤3–4次。其余步骤同“改进二”。

1.3 DNA质量检测

1.3.1 紫外分光光度计检测

取1 μL DNA于Thermo Scientific Nano Drop 2000c检测仪上进行DNA质量检测。

1.3.2 琼脂糖凝胶电泳检测

取3 μL DNA和5 μL DL5000 DNA Marker点样于含有溴化乙锭的1%琼脂糖凝胶中进行电泳, 在电压176 V、电流300 A条件下电泳25分钟, 然后经紫外凝胶成像扫描结果。

1.3.3 酶切反应检测

分别对通过3种新方法提取的基因组DNA进行单酶切和双酶切反应。10 μL单酶切反应体系为: 200 ng DNA模板, 1 μL 10× FastDiest green Buffer, 0.5 μL *Hind*III, 加ddH₂O至10 μL。10 μL双酶切反应体系为: 250 ng DNA模板, 1 μL 10× FastDiest green Buffer,

0.5 μL *Hind*III, 0.5 μL *Eco*RI, 加ddH₂O至10 μL 。反应条件: 37℃酶切30分钟。最后, 使用琼脂糖凝胶电泳检测反应结果。

1.3.4 ISSR扩增反应检测

以3种新方法提取的火龙果基因组DNA为模板, UB-C808为引物进行ISSR扩增。10 μL PCR反应体系为: 5 μL 2× Ex *Taq*, 1 μL 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ UBC808, 50 ng DNA模板, 加ddH₂O至10 μL 。反应程序为: 94℃预变性5分钟; 94℃变性30秒, 54℃退火30秒, 72℃延伸5分钟, 35个循环; 72℃延伸5分钟。最后, 通过琼脂糖凝胶电泳检测PCR扩增结果。

2 结果与讨论

2.1 DNA提取

在用3种改进的CTAB+Tris-HCl洗涤法提取火龙果成熟茎DNA的过程中发现, 经过第1步的洗涤后, “改进二”与“改进三”的沉淀很容易与CTAB裂解液混

匀, “改进一”的沉淀则很黏稠, 无法与CTAB裂解液混匀(图1)。而与“改进二”相比, “改进三”更容易洗掉黏液; 故从洗涤效果上看, 3种方法中“改进三”最佳。

另外, 3种改进方法提取的DNA经紫外分光光度计检测, 结果(表1)显示DNA的OD₂₆₀与OD₂₈₀比值均介于1.90–3.83之间, 说明DNA中蛋白质去除地比较干净, 而大部分比值高于2.0, 说明DNA有所降解或有RNA污染; OD₂₆₀与OD₂₃₀比值为0.48–1.79, 说明DNA中有糖类或盐类的污染, 但“改进三”的污染程度最低。由于在溶解DNA的过程中“改进二”与“改进三”均未发现有黏性物质, 而“改进一”有黏性物质, 但“改进一”提取DNA的OD₂₆₀/OD₂₈₀和OD₂₆₀/OD₂₃₀值均优于“改进二”, 说明紫外分光光度计检测结果不很准确, 3种改进方法的优劣需进一步通过琼脂糖凝胶电泳检测加以判断。

将3种方法提取的DNA进行琼脂糖凝胶电泳检测, 结果(图2A)发现“改进一”的1号和3号点样孔亮,

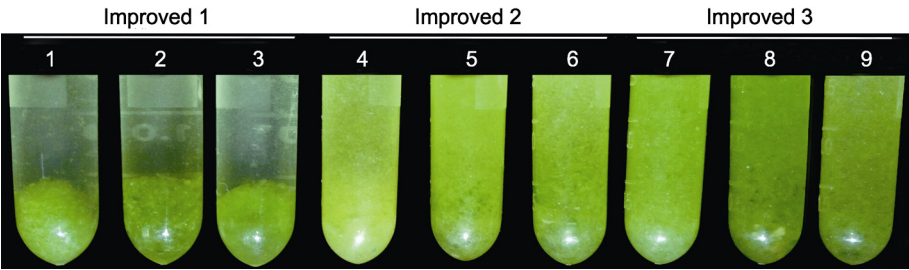


图1 洗涤后的火龙果样品加入CTAB裂解液混匀图
1–3: 样品与CTAB难以均匀混合; 4–9: 样品与CTAB容易混合

Figure 1 The washed samples of pitaya mixed with CTAB lysate
1–3: Represented the precipitation can not be mixed with CTAB lysate; 4–9: Represented the precipitation can be mixed with CTAB lysate

表1 3种改进CTAB+Tris-HCl洗涤法提取的火龙果DNA的OD₂₆₀/OD₂₈₀和OD₂₆₀/OD₂₃₀值

Table 1 The OD₂₆₀/OD₂₈₀ and OD₂₆₀/OD₂₃₀ of DNA extracted from pitaya by 3 different improved CTAB+Tris-HCl washing methods

No.	Improved 1		Improved 2		Improved 3	
	OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀	OD ₂₆₀ /OD ₂₃₀	OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀	OD ₂₆₀ /OD ₂₃₀	OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀	OD ₂₆₀ /OD ₂₃₀
1	1.99	1.38	3.83	0.48	2.06	1.51
2	1.90	1.16	2.12	0.92	2.04	1.79
3	2.03	1.30	2.69	0.63	2.05	1.65

1, 2和3分别代表3个不同的火龙果材料茎。高质量的DNA通常具有较高的OD₂₆₀/OD₂₃₀值, OD₂₆₀/OD₂₈₀值介于1.8和2.0之间。
1, 2 and 3 represent the stems of three different pitayas, respectively. High quality DNA was generally with a high OD₂₆₀/OD₂₃₀ value and the OD₂₆₀/OD₂₈₀ value between 1.8 and 2.0.

且没有DNA条带,说明DNA中含有黏性物质,这与溶解DNA沉淀时观察到的结果一致;2号点样孔不亮且没有DNA条带,说明该样品未提出DNA。而“改进二”和“改进三”的点样孔清晰且几乎不亮,并有明显的DNA主带,说明这两种方法均提取出了不含黏性物质的火龙果DNA;同时,“改进二”和“改进三”的DNA主带有轻微的拖尾现象,说明DNA有所降解。但“改进二”的DNA主带比较暗淡(相比“改进三”),说明“改进二”提取的DNA浓度较低。基于此可以得出“改进三”方法提取的DNA质量和浓度均最优。

本研究表明,“改进二”与“改进三”方法均可

从火龙果茎中提取不含黏性物质的DNA,但“改进三”的提取效果优于“改进二”,且“改进三”在大离心管中用水作为洗涤液,大大降低了成本。因此,我们初步认为,“改进三”为火龙果茎的最佳DNA提取方法。为了进一步检测“改进三”方法提取DNA的质量,后续进行了生化与分子生物学实验。

2.2 酶切反应检测

用“改进三”方法重新提取7个不同火龙果材料DNA,并以提取的DNA为模板进行单酶切和双酶切反应。DNA、单酶切及双酶切产物经琼脂糖凝胶电泳检测,结果(图2B)显示,DNA泳道有明显的DNA主带,几乎无拖尾或拖带现象,且DNA能够完全酶切,说明

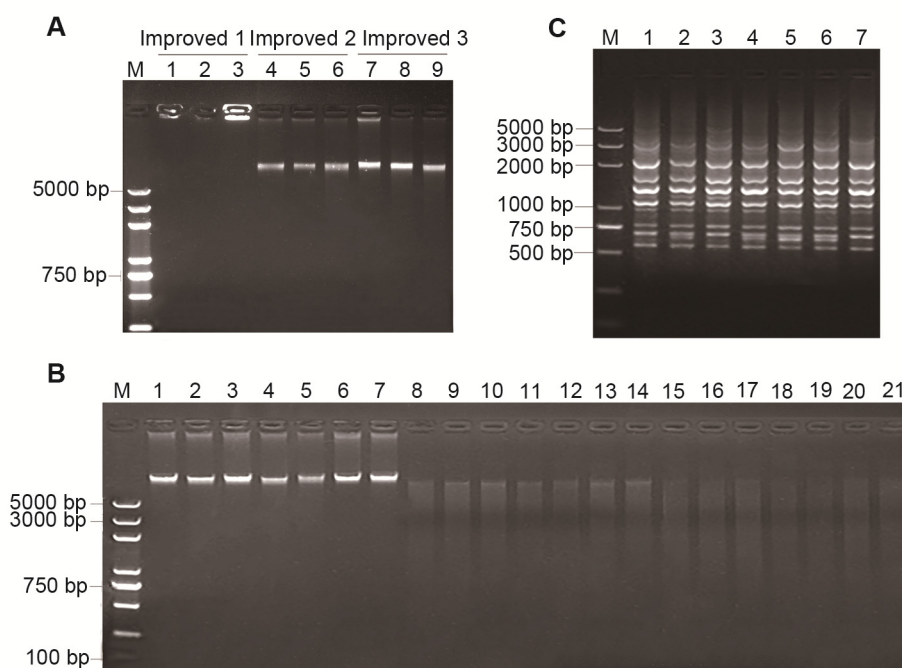


图2 火龙果DNA、酶切及ISSR扩增电泳图

(A) 3种改进方法提取的DNA电泳图(M: DNA marker; 1–3: 用“改进一”方法提取的DNA; 4–6: 用“改进二”方法提取的DNA; 7–9: 用“改进三”方法提取的DNA); (B) 用“改进三”方法提取的火龙果DNA及酶切产物电泳图(M: DNA marker; 1–7: DNA; 8–14: *Hind*III酶切产物; 15–21: *Hind*III和*Eco*RI酶切产物; 8–14及15–21所用模板DNA分别对应于1–7泳道中的DNA); (C) ISSR扩增电泳图(M: DNA marker; 1–7: 以“改进三”方法提取的7个DNA为模板进行ISSR扩增的产物)。

Figure 2 Electrophoretograms of pitaya DNA, enzyme digestion and ISSR amplification

(A) Electrophoretogram of DNA extracted by 3 different improved methods (M: DNA marker; Lane 1–3: DNA extracted by improved 1 method; Lane 4–6: DNA extracted by improved 2 method; Lane 7–9: DNA extracted by improved 3 method). (B) Electrophoretogram of pitaya DNA extracted by improved 3 method and enzyme digestion (M: DNA marker; Lane 1–7: DNA; Lane 8–14: DNA digested by *Hind*III; Lane 15–21: DNA digested by *Hind*III and *Eco*RI; The DNA template of 8–14 and 15–21 is corresponding to the DNA in 1–7 lanes, respectively). (C) Electrophoretogram of ISSR amplification (M: DNA marker; Lane 1–7: Products of 7 different DNA templates ISSR amplification).

提取的DNA质量能够满足酶切反应的要求。

2.3 ISSR扩增反应检测

以酶切反应实验中提取的7个DNA为模板进行ISSR扩增(图2C),发现7个泳道中均有很多清晰的条带,说明这7个DNA能够较好地进行ISSR扩增,从而说明“改进三”提取的DNA可满足ISSR多态性扩增的基本要求。

2.4 讨论

DNA作为分子生物学主要的研究对象之一,其质量的好坏关乎下游实验的成败。不同实验目的对DNA质量的要求不同,对于普通PCR检测,含有杂质较多的DNA也能达到实验目的。然而,高灵敏度的分子生物学实验(如分子标记分析实验及以酶切为基础的实验等)对DNA的质量要求比较高(郑育声等,2007)。不同植物种类由于其组织成分、含量差异较大,致使DNA提取难易不尽相同。例如,用普通CTAB法即可提出水稻(*Oryza sativa*)质量较好的DNA,而春兰(*Cymbidium goeringii*)和珙桐(*Davidia involucre*)等植物的叶片由于富含多酚和多糖等物质,用普通CTAB法很难提取到高纯度的DNA,需要在CTAB法的基础上进行改良(张芬等,2011;张玉晶等,2011;李金璐等,2013)。本研究基于前人和笔者以前的工作,选择CTAB+Tris-HCl洗涤法并加以改进,探索火龙果茎的DNA提取方法。其中,“改进一”的沉淀经洗涤后黏性依然很大,很难与CTAB抽提液混匀,这是由于加样量偏多,造成第1次洗涤时混合液过于黏稠,之后再多洗涤几次也无法将黏液清洗掉,结果造成“改进一”方法无法从火龙果茎中提取质量较好的DNA。可见,欲通过该方法提取火龙果茎DNA,首先必须控制好加样量。

紫外分光光度计检测是DNA质量检测的方法之一。然而,本研究中该方法并不能很好地判断DNA质量的优劣,这可能是由于“改进一”中DNA含有黏性物质,致使DNA中杂有的各成分不能完全混匀,从而造成吸取1 μL DNA进行检测的不准确性;“改进二”的DNA $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ 值偏高, $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{230}$ 值偏低,而DNA又不含黏性物质,推测可能是由于“改进二”的DNA盐类污染严重,及DNA浓度过低所致。

“改进二”和“改进三”都能提取不含黏性物

质的火龙果DNA,但“改进三”方法效果更佳,主要原因如下。(1) Tris缓冲液为有机溶剂,水为无机溶剂,“改进三”将有机溶剂与无机溶剂结合使用,洗涤效果更好,这可能也是“改进三”提取DNA的 $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{230}$ 值最高的原因之一;此外,实验结果证明,先用水洗涤1次并不会造成DNA的严重降解,这可能是由于在洗涤过程中已将研磨时细胞破裂产生的DNA连同黏性物质一起洗掉,提取的DNA可能大部分为CTAB裂解液重新抽提出来的,因此洗涤过程对DNA的降解影响极小。再有,在大离心管中用水洗涤,大大降低了成本。(2) 火龙果茎肉质部分含有的物质成分不仅多且黏性大,“改进三”方法在样品研磨前已将这部分去除,故大大降低了样品的黏性。而“改进二”研磨时将肉质部分一起研磨,不仅使样品的黏性更大,导致难以除尽黏性物质,而且还造成了洗涤后沉淀含量少,进而影响DNA的提取量。

虽然“改进三”方法提取的DNA质量最好,且基本满足酶切反应及ISSR分子标记实验等要求。但是,其DNA $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{230}$ 的最高值为1.79,而高纯度DNA该比值为2.0–2.2 (Kaczyńska et al., 2013)。同时,DNA有轻微降解,说明“改进三”方法可进一步优化以提取更高质量的DNA。通过分析本研究结果不难发现,3种方法提取的DNA都不同程度地受到盐类污染,可能是由于洗涤液中使用了5 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl的缘故。因此,降低洗涤液中的NaCl浓度或许可达到降低盐类污染的目的。此外,本研究离心均是在室温条件下进行,将室温下离心改为4 $^{\circ}\text{C}$ 下离心可在一定程度上避免DNA的降解。

我们对CTAB+Tris-HCl洗涤法进行了3种不同方式的改进,结果表明“改进三”方法提取的DNA质量最好,可直接用于下游的生化实验,满足酶切及分子标记等高灵敏度实验的基本要求,且不受取样时期和部位的限制。“改进三”的基本步骤如下:(1) 取0.5–1.0 g去除中间髓部分及含90%以上肉质部分的火龙果茎,液氮研磨成粉末,移入50 mL离心管中,加入45 mL灭菌蒸馏水,摇匀,静置10分钟,室温下8 000 $\times g$ 离心10分钟,弃上液。将沉淀转移至2 mL离心管中继续用Tris-HCl (200 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl; 40 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ EDTA; 5 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl)洗涤3–4次,室温下12 000 $\times g$ 离心3–10分钟,弃上液;(2) 加入1.3 mL CTAB裂解液(2% CTAB; 100 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl; 20

mmol·L⁻¹ EDTA; 1.4 mol·L⁻¹ NaCl), 振荡混匀, 65°C 水浴30–60分钟, 每10分钟轻摇1次; (3) 室温下12 000 ×g离心10分钟, 将上清液转入新的2 mL离心管中, 加入等体积的酚:氯仿:异戊醇(25:24:1, v/v/v)混合液抽提, 室温下12 000 ×g离心10分钟; (4) 将上清液转移至新的2 mL离心管中, 加入等体积的氯仿:异戊醇(24:1, v/v)混合液再次抽提, 室温下12 000 ×g离心10分钟; (5) 将上清液转移至新的1.5 mL离心管中, 加入2/3体积的异丙醇, 轻摇, 使其充分混匀, 置于–20°C下30分钟; (6) 室温下12 000 ×g离心15分钟, 弃上清液, 可见絮状沉淀, 即为DNA沉淀, 用75%乙醇洗涤2遍, 置于室温风干; (7) 加入30–50 μL含50 μg·mL⁻¹ RNase水溶解沉淀, 于–20°C冰箱中保存。

参考文献

- 陈明贤 (2012). 福建省火龙果种质资源ISSR分析及耐盐生理研究. 硕士论文. 福州: 福建农林大学. pp. 11–26.
- 程文, 夏正俊, 冯献忠, 杨素欣 (2016). 一种快速、无损大豆种子DNA提取方法的建立和应用. 植物学报 51, 68–73.
- 邓仁菊, 范建新, 蔡永强 (2011). 国内外火龙果研究进展及产业发展现状. 贵州农业科学 39(6), 188–192.
- 董美超, 岳建强, 李进学, 高俊燕 (2013). 火龙果育种研究进展. 热带农业科学 33(5), 56–59.
- 冯建成 (2006). 分子标记辅助选择技术在水稻育种上的应用. 中国农学通报 22(2), 43–47.
- 傅建敏, 梁玉琴, 孙鹏, 姬燕晓, 谭晓风 (2015). 柿属植物叶绿体DNA提取方法优化. 中南林业科技大学学报 35(12), 25–28.
- 韩静丹, 秦萌, 王献 (2012). 铁线蕨总DNA提取方法比较分析. 河南农业大学学报 46, 182–187.
- 李会, 任志莹, 王颖, 王建忠 (2013). 不同DNA提取试剂盒提取作物种子基因组DNA效果的比较. 湖北农业科学 52, 1956–1958.
- 李建生 (2007). 玉米分子育种研究进展. 中国农业科技导报 9(2), 10–13.
- 李金璐, 王硕, 于婧, 王玲, 周世良 (2013). 一种改良的植物DNA提取方法. 植物学报 48, 72–78.
- 梁雪莲, 郑奕雄, 陈晓玲, 曾锦姬 (2007). 花生DNA提取方法比较. 生物技术 17, 41–44.
- 罗焜, 马培, 姚辉, 宋经元, 陈科力, 刘义梅 (2012). 中药DNA条形码鉴定中的DNA提取方法研究. 世界科学技术——中医药现代化 14, 1433–1439.
- 罗小艳, 郭璇华 (2007). 火龙果的研究现状及发展前景. 食品与发酵工业 33(9), 142–145.
- 马小军, 莫长明 (2017). 药用植物分子育种展望. 中国中药杂志 42, 2021–2031.
- 邱丽娟, 王昌陵, 周国安, 陈受宜, 常汝镇 (2007). 大豆分子育种研究进展. 中国农业科学 40, 2418–2436.
- 申世辉, 马玉华, 蔡永强 (2015). 火龙果研究进展. 中国热带农业 (1), 48–52.
- 田新民, 李洪立, 何云, 洪青梅, 胡文斌, 李琼 (2015). 火龙果研究现状. 北方园艺 (18), 188–193.
- 吴丽圆 (2004). 4种思茅松总DNA提取方法的比较. 福建林学院学报 24, 237–240.
- 吴琳 (2016). 火龙果种质资源评价及繁育研究. 硕士论文. 南宁: 广西大学. pp. 11–61.
- 吴敏娜, 武亚琦, 屈艳, 魏纪东, 钟根深 (2015). 四种小鼠肠道微生物DNA提取方法比较. 生态学杂志 34, 1183–1188.
- 余志雄, 欧高政, 陈清西, 袁亚芳 (2010). 火龙果总DNA提取方法比较研究. 中国农学通报 26, 300–303.
- 詹少华, 尹艺林 (2008). 大豆基因组DNA提取纯化方法研究. 安徽农业科学 36, 9871–9872, 9928.
- 张冰雪, 范付华, 乔光, 宋莎, 文晓鹏, 刘涛 (2013). 贵州地方火龙果芽变种质DNA指纹图谱及遗传多样性的ISSR分析. 果树学报 30, 573–577.
- 张芬, 李达, 吕长平, 张力, 冯岳东, 许威, 张宏志 (2011). 兰花SRAP指纹图谱的构建. 湖南农业科学 (3), 129–132.
- 张桂春, 刘玉静, 李延敏, 牟萍, 曲明娟, 李清, 周菊华 (2017). 火龙果果皮中可溶性膳食纤维的提取方法. 植物学报 52, 622–630.
- 张玉晶, 李牡丹, 石旭, 关萍 (2011). 珙桐基因组DNA的提取及ISSR-PCR体系的优化. 山地农业生物学报 30(3), 211–214.
- 郑育声, 李东栋, 王哲魁 (2007). 椰子不同组织基因组DNA的提取及质量分析. 海南大学学报自然科学版 25, 51–56.
- Kaczyńska A, Łoś M, Węgrzyn G (2013). An improved method for efficient isolation and purification of genomic DNA from filamentous cyanobacteria belonging to genera *Anabaena*, *Nodularia* and *Nostoc*. *Oceanol Hydrobiol Stud* 42, 8–13.
- Murray MG, Thompson WF (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res* 8, 4321–4325.

Improvement in Extraction Methods of Genomic DNA from Pitaya Stems

Quandong Nong^{1,2,3}, Mingyong Zhang^{1,2}, Mei Zhang², Shuguang Jian², Hongfang Lu²,
Kuaifei Xia^{1,2*}, Heming Wen^{3*}

¹Key Laboratory of South China Agricultural Plant Molecular Analysis and Genetic Improvement, South China Botanical Garden, CAS, Guangzhou 510650, China; ²Guangdong Provincial Key Laboratory of Applied Botany, South China Botanical Garden, CAS, Guangzhou 510650, China; ³Wenshan Academy of Agricultural Sciences, Wenshan 663099, China

Abstract Pitaya (*Hylocereus undulatus*) is a tropical fruit developed in recent years. Because its stem is full of polysaccharides, polyphenols and other secondary metabolites, extracting high-quality DNA from the stem is difficult, especially from stems more than 1 year old. At present, there is no good method for DNA extraction. We examined three methods to improve DNA extraction based on the CTAB+Tris-HCl washing method for better and easier DNA extraction. The third method obtained the best-quality DNA without sticky substances from pitaya stem more than 1 year old and was not restricted by sampling data and sampling site. The extracted DNA can be used in enzyme digestion and inter-simple sequence repeat amplification experiments. Our study provides an ideal method for extracting DNA from pitaya stem, which is worth popularizing.

Key words pitaya, stem, DNA extraction, improved CTAB+Tris-HCl washing method

Nong QD, Zhang MY, Zhang M, Jian SG, Lu HF, Xia KF, Wen HM (2019). Improvement in extraction methods of genomic DNA from pitaya stems. *Chin Bull Bot* **54**, 371–377.

* Authors for correspondence. E-mail: xiakuaifei@scbg.ac.cn; 441586713@qq.com

(责任编辑: 孙冬花)