

4种石山植物 DNA提取方法筛选*

Total DNA Extraction from Four Limestone Plants

申 丹^{1,2}, 曾 杰^{1*}, 周世良³, 徐太平¹, 白嘉雨¹Shen Dan^{1,2}, Zeng Je¹, Zhou Shiliang³, Xu Daping¹, Bai Jiayu¹

(1. 中国林业科学研究院热带林业研究所, 广东广州 510520; 2. 北京中医药大学药学院 北京 望京 100102; 3. 中国科学院植物研究所系统与进化植物学开放实验室, 北京香山 100093)

(1. Research Institute of Tropical Forestry, Chinese Academy of Forestry, Guangzhou, Guangdong, 510520, China; 2. School of Chinese Materia Medica, Beijing Univ. of Chinese Medicine, Wangjing, Beijing, 100102, China; 3. Laboratory of Systematic and Evolutionary Botany, Institute of Botany, Chinese Academy of Science, Xiangshan, Beijing, 100093, China)

摘要: 以石山木本植物掌叶木 (*Handeliodendron bodinieri*)、东京桐 (*Deutzianthus tonkinensis*)、伊桐 (*Itoa orientalis*) 和肥牛树 (*Cephalomappa sinensis*) 为材料, 在常用 CTAB 法的基础上改良, 开发出适合这 4 种木本植物总 DNA 提取的 3 种方法, 并将提取出的 DNA 样品进行 ISSR 分析, 确定出提取这 4 种石山木本植物的总 DNA 最佳方法, 为研究石山木本植物的遗传多样性奠定基础。

关键词: 植物 DNA 提取 ISSR 石山

中图分类号: Q347 文献标识码: A 文章编号: 1005-9164(2005)04-0340-03

Abstract Genetic diversity of limestone plants was less reported in China. In this paper the methods were developed on the basis of CATB, to extract total DNA from young leaves of four limestone plant species including two species involved in the Red Book of Chinese Plants (Vol. 1) such as *Handeliodendron bodinieri* and *Deutzianthus tonkinensis*, and two species with high economic value such as *Itoa orientalis* and *Cephalomappa sinensis*. The DNA samples were successfully used in ISSR analysis. The improved methods will be used in studies on genetic diversity of these species in the future.

Key words plants, DNA, extraction, ISSR, limestone

我国石灰岩山地分布面积大, 植物种类繁多, 然而其遗传多样性方面的研究少见报道, 仅见周厚高等^[1]应用等位酶标记研究了广西石灰岩地区蜈蚣蕨 (*Pteris vittata*) 天然居群的遗传多样性。随着现代分子生物学的快速发展, RAPD ISSR AFLP 以及 SSR 等分子标记逐渐应用于遗传多样性研究领域, 促进了植物遗传多样性研究的发展。植物总 DNA 的提取是开展这些研究的前提, 我们以国家一级保护植物掌叶

木 (*Handeliodendron bodinieri*)、二级保护植物东京桐 (*Deutzianthus tonkinensis*) 以及具有重要经济价值的伊桐 (*Itoa orientalis*) 和肥牛树 (*Cephalomappa sinensis*) 等 4 种石山木本植物为对象, 在常用 CTAB (十六烷基三甲基溴化胺) 法^[2]的基础上设计 3 种 DNA 提取方案, 通过比较分析, 确定出最佳的总 DNA 提取方法, 为其遗传多样性研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验材料

试验材料均于 2004 年 5 月采自天然林, 掌叶木采于广西百色市老山林场, 伊桐和东京桐采于广西木论自然保护区, 肥牛树采于广西天等县。供试样品均为嫩叶, 用硅胶快速干燥。

收稿日期: 2005-07-05

修回日期: 2005-08-22

作者简介: 申 丹 (1985-), 女, 湖南邵东人, 主要从事生物化学研究

* 中央级科研院所社会公益研究专项资金项目“石质岩山地生态综合整治技术研究与示范” (项目编号: 2001DIB10067) 的部分内容。

** 通讯作者。

1.1.2 主要试剂

高盐溶液: 5 mol/L NaCl; 1% β -巯基乙醇; 1.5% PV P (聚乙烯基吡咯烷酮) 40000

提取缓冲液 A: 200 mmol/L Tris-HCl pH值 8.0; 250 mmol/L NaCl; 50 mmol/L EDTA (乙二胺四乙酸); 1.5% PV P40000; 1% β -巯基乙醇

提取缓冲液 B: 100 mmol/L Tris-HCl pH值 8.0; 20 mmol/L EDTA; 1.4 mol/L NaCl; 2% CTAB (十六烷基三甲基溴化胺)

提取缓冲液 C: 100 mmol/L Tris-HCl pH值 8.0; 25 mmol/L EDTA; 1.5 mol/L NaCl; 3% CTAB

0.1× TE: 10 mmol/L Tris-HCl pH值 8.0; 1 mmol/L EDTA

高盐 TE: 1 mol/L NaCl; 10 mmol/L Tris-HCl pH值 8.0; 1 mmol/L EDTA

1.2 DNA提取方法

1.2.1 方法一

(1)取 40 mg 干叶,加入少量石英砂,研磨成粉末后,加入 1 ml 冰上预冷的提取缓冲液 A,冰浴 10 min, 7000 rpm 离心 10 min,弃上清液。若上清液粘稠,用提取缓冲液 A 再抽提 1 次。

(2)加入 600 μ l 提取缓冲液 C,置于 65 $^{\circ}$ C 下温浴 1 h,不时摇晃。

(3)加入等体积的 Cl(氯仿:异戊醇 = 24:1),缓慢摇动 10 min, 10000 rpm 离心 10 min,转移上清液。若上清液浑浊,重复此步。

(4)往上清液中加入 1/2 体积 (300 μ l) 5 mol/L NaCl,轻轻混匀,加入 2/3 体积 (600 μ l) 冰冷的异丙醇,于 -20 $^{\circ}$ C 下放置 1 h,缓慢颠倒析出沉淀, 10000 rpm 离心 10 min,弃液体。

(5)加入 1 ml 70% 的酒精清洗沉淀,风干后溶于 100 μ l 的高盐 TE 中。

(6)加入 2 倍体积 (200 μ l) 冰冷的无水酒精, -20 $^{\circ}$ C 下放置 30 min, 10000 rpm 离心 10 min,用 70% 的酒精清洗沉淀,风干后溶于 100~200 μ l 0.1× TE 中。

1.2.2 方法二

(1)取 40 mg 干叶片,加入少量石英砂,研磨成粉末后,加入 1 ml 冰上预冷的高盐溶液, 65 $^{\circ}$ C 温浴 30 min, 10000 rpm 10 min,弃上清液。

(2)加入 100 μ l NaCl (5 mol/L) 和 600 μ l 提取缓冲液 B, 65 $^{\circ}$ C 下温浴 30 min,加入 600 μ l Cl 抽提 2 次。

(3)往上清液中加入 2/3 体积 (400 μ l) 冰冷的异丙醇, -20 $^{\circ}$ C 下放置 1 h,缓慢颠倒析出沉淀, 10000

rpm 10 min,弃液体。

(4)同方法一的 (5)~(6)步

1.2.3 方法三

(1)取 40 mg 干叶片,加入少量石英砂,研磨成粉末后,加入 1 ml 提取缓冲液 B, 10 μ l 1% β -巯基乙醇, 30 mg PV P40000, 65 $^{\circ}$ C 温浴 1 h

(2)同方法一的 (3)~(6)步。

1.3 DNA检测

1.3.1 琼脂糖电泳检测

将 DNA 样品在 37 $^{\circ}$ C 下用 RNA 酶 (购自上海生物工程公司) 处理,去除 RNA 后,取 2 μ l 用 0.8% 琼脂糖凝胶进行电泳检测。

1.3.2 ISSR 扩增反应

统一采用方法一提取出的 DNA,稀释为 10 ng / μ l,以之作为模板进行 ISSR-PCR 试验。

采用 25.0 μ l PCR 反应体系,包括 10× PCR 缓冲液 2.5 μ l, 2 mmol/L dNTP 2.5 μ l, 50% DMSO (二甲基亚砷) 4.0 μ l, 5 μ mol/L 引物 2.0 μ l, 5 unit μ l Taq DNA 聚合酶 0.2 μ l, 25 mmol/L MgCl₂ 1.5 μ l, 模板 DNA 2.0 μ l (约 20 ng), ddH₂O 10.3 μ l。扩增反应程序为 94 $^{\circ}$ C 2 min; 94 $^{\circ}$ C 45 s, 46 $^{\circ}$ C 40 s, 72 $^{\circ}$ C 2 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。

1.3.3 ISSR 检测条件

将扩增产物在 1.5% 琼脂糖凝胶中进行电泳检测。采用 100bp DNA Ladder (购自北京鼎国生物技术有限责任公司) 作为分子量标准。

2 结果与分析

2.1 琼脂糖电泳检测

从图 1 可以看出,对于伊桐和肥牛树而言,3 种方法均能提取出较多的 DNA,而且 DNA 质量高,无拖尾现象,孔内基本上无残留;但 DNA 数量从高到低依次为方法三 > 方法二 > 方法一。对于掌叶木来说,方法一提出的 DNA 质量和数量均高于方法二、方法三;方法二、方法三提取出的 DNA 多糖含量高,其电泳速度比其他样品慢 (见图 1 中第 5、6 泳道)。用方法一、方法二提取东京桐的 DNA,效果较为理想,不但 DNA 含量高而且质量好;而用方法三提取的 DNA 数量很少。

2.2 ISSR 扩增

从图 2 可以看出,18 号引物 (序列为 (AC)₇-T) 对 4 种石山植物的扩增效果都较好,而 15 号引物 (序列为 GGA-(GTG)₄) 对掌叶木、伊桐和肥牛树的扩增效果较差,扩增的条带要么多而模糊,要么条带偏少,而较适合于东京桐,扩增出的条带较多且清晰。

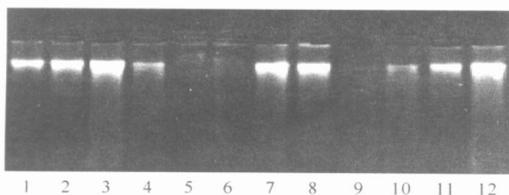


图 1 3种方法提取 DNA 的琼脂糖凝胶电泳图谱

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of DNA prepared by three protocols

材料: 1~ 3为伊桐, 4~ 6为掌叶木; 7~ 9为东京桐; 10~ 12为肥牛树。方法: 1 4 7 10为方法一, 2 5 8 11为方法二, 3 6 9 12为方法三。

Materials 1~ 3, *Itoa orientalis*; 4~ 6, *Handeliiodendron bodinieri*; 7~ 9, *Deutzianthus tonkinensis*; 10~ 12, *Cephalomappa sinensis*. Methods 1, 4, 7, 10, Protocol one; 2, 5, 8, 11, Protocol two; 3, 6, 9, 12, Protocol three.

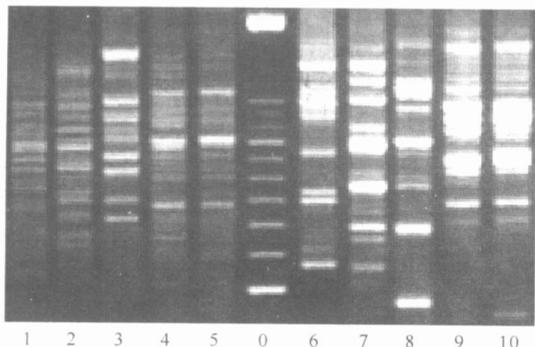


图 2 1. 5% 琼脂糖凝胶电泳检测 ISSR-PCR 反应产物

Fig. 2 1. 5% agarose gel electrophoresis of ISSR-PCR products of 4 species

引物: 1~ 5为 15号引物, 6~ 10为 18号引物, 0为 Marker 样品号: 1 6为掌叶木; 2 7为伊桐; 3 8为东京桐; 4 5 9 10为肥牛树。

Primers 1~ 5, Primer 15; 6~ 10, Primer 18; 0, Marker.

Samples 1, 6, *Handeliiodendron bodinieri*; 2, 7, *Itoa orientalis*; 3, 8, *Deutzianthus tonkinensis*; 4, 5, 9, 10, *Cephalomappa sinensis*.

3 结论

在提取 DNA 的过程中,多糖等次生代谢物质的干扰影响到 DNA 粗提物的数量和质量^[3]。本研究设计的 3 种 DNA 提取方法去多糖的程度不同,依次为方法一>方法二>方法三。相同提取方法提取出的 4 种不同石山植物的 DNA 初提物中,掌叶木的沉淀最多,产率最低,因此对于一些象掌叶木之类含多糖等次生代谢物质多的顽拗植物(难以提取高质量 DNA 的植物),最好选择去多糖效果最佳的方法一;用方法三提取东京桐的 DNA,产率太低,亦与其多糖等次生物质含量高有关,而方法一、二提取的 DNA 数量和质量相差不大,对于东京桐而言,高盐去糖(方法二)效果也十分明显,而且相对经济、省时、易操作,宜作为东京桐 DNA 的提取方案;对于 DNA 提取较为容易的伊桐和肥牛树,3 种方法均有效,方法一的操作程序繁琐,最为费时,而且提取过程中损失的 DNA 量多,因此宜选择方法二或方法三。

参考文献:

- [1] 周厚高,谢义林,黎桦,等.广西石灰岩地区蜈蚣蕨居群的遗传多样性研究[J].广西植物,2002,22(1):67-70.
- [2] 邹喻萍,葛颂,王晓东.系统与进化植物学中的分子标记[M].北京:科学出版社,2001.
- [3] 邹喻萍,汪小全,雷一丁,等.几种濒危植物及其近缘类群总 DNA 的提取与鉴定[J].植物学报,1994,36(7):528-533.

(责任编辑:邓大玉)

科学家用毛囊干细胞治愈神经损伤

美国麻省理工学院、加州大学圣迭戈分校和日本北里大学的研究人员在实验中成功地诱导毛囊干细胞分化成了许旺氏细胞,然后,研究人员将毛囊干细胞生成的许旺氏细胞注射到坐骨神经损伤的瘫痪实验鼠体内。一段时间后,他们发现实验鼠已能正常行走。解剖显示,许旺氏细胞已在实验鼠坐骨神经的轴突外围形成了髓鞘,在新形成的髓鞘内,原先断裂的神经轴突已经修补好。研究人员推测,这是因为毛囊干细胞分化成的许旺氏细胞刺激了神经轴突的生长,促使神经损伤愈合。

这一研究成果显示毛囊干细胞有更广泛的医疗应用潜力。毛囊干细胞可以从患者自身取得,来源几乎无穷无尽,在医疗中“将是一种有潜力的选择”。

(据科学网)