

太白红杉总 DNA 的提取及鉴定

阎桂琴, 李 珊, 王祎玲, 王戌梅, 赵桂仿

(西北大学 生命科学学院, 陕西 西安 710069)

摘要: 用抗氧化剂和整合剂组合的方法, 成功地从太白红杉的叶组织中提取和纯化了总 DNA, 并对其产率、质量和纯度作了鉴定。用此方法能有效地去除酚类化合物、多糖、萜类化合物和未知化合物的干扰, 为太白红杉的分子生物学研究提供了一套迅速、经济和可靠的技术方案。

关键词: 太白红杉; 总 DNA 抽提; 抗氧化剂和整合剂组合提取 DNA 法; RAPD(随机扩增多态性 DNA)

中图分类号: Q949.66⁺5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-274 X(2001)01-0053-04

成功地从组织细胞中提取总 DNA, 是进行一切有关分子遗传学和分子生物学研究的前提。在植物研究中, 一些重要经济作物, 如小麦、水稻和玉米等的总 DNA 提取已有成熟的方法, 但对其他植物的总 DNA 提取制备, 还需要根据所研究植物的不同情况来进行实验。最近, 我们对太白红杉进行遗传多样性研究时^[1~4], 发现太白红杉的针叶内含有较高的多酚、萜类、多糖化合物和一些未知的化合物, 用许多现有的成熟方案^[5~12]未能解决太白红杉总 DNA 的提取。通过反复实验, 我们探索出一种迅速、简便、经济的分离纯化太白红杉总 DNA 的方法, 应用该法可有效地去除太白红杉叶内的酚类、萜类和多糖化合物^[13~14], 提取的总 DNA 不经任何纯化处理, 便可进行 PCR(Polymorase Chain Reaction)扩增, 为太白红杉的进一步研究奠定技术基础。

1 材料与方 法

1.1 材料采集

实验材料分别采自柞水牛背梁、长安光头山、秦岭主峰太白山、佛坪大涧沟和宝鸡玉皇山。在每个采样地依海拔高度(每升高 50 m), 阴坡, 半阴坡, 设横向跨度等随机取样。在每棵样树上尽可能取幼嫩、健康的带叶枝条数枝, 将采集的材料放于塑料袋中, 并淋水, 尽快地带回实验室, 放于-80℃超低温冰箱保

存备用。

1.2 总 DNA 提取

取超低温冰冻保存的健康无病斑叶子(约 1 g), 放置在冰冻的研钵中, 在研磨时加入足够量的抗坏血酸(Ascorbic acid)和聚乙烯吡咯啉酮(Polyvinyl pyrrolidone PVP), 用冰冻的研杵快速研磨成干粉状。装入 1.5 mL Eppendorf 管中, 迅速加入 500 μ L 不含有 CTAB 或 SDS 的缓冲液和 1 mL 的丙酮, 充分混匀, 低速(7 000 r/min)离心 10 min, 弃上清液; 可重复 2~3 次; 在 Eppendorf 管中迅速加入等体积的、65℃预热的 2 \times CTAB 缓冲液和 β -巯基乙醇(β -mercaptoethanol)(终浓度 3%), 并上下颠倒轻摇数次, 使材料与缓冲液充分混匀, 然后置于 60~65℃水浴 1 h; 取出 Eppendorf 管稍冷却, 加入等体积的氯仿-异戊醇(24:1)混合液和适量无水乙醇(终浓度 10%~20%), 混合后于 4 000 r/min 离心 15~20 min, 取上清液, 重复此步骤 2~3 次; 加入 2 倍体积的冷乙醇或 2/3 体积的异丙醇, 4℃静置 20~30 min, 白色絮状总 DNA 沉淀已清晰可见, 4℃, 12 000 r/min 离心 10 s, 弃上清液; 加入 500 μ L DNA 洗涤缓冲液, 放置 30 min, 离心后将所得沉淀用 70%乙醇洗涤 2 次, 空气干燥后, 溶于 100 μ L 0.1 \times TE 中, -20℃保存备用。

1.3 总 DNA 纯度检测

用 754 型分光光度计(上海第三光学分析仪器厂), 在波长 230, 260 及 280 nm 处测定吸光度, 根据

收稿日期: 2000-06-02

作者简介: 阎桂琴(1956-), 女, 山西临猗人, 山西师范大学副教授, 西北大学博士生, 从事分子生态遗传学研究。

260 nm 的吸光度值计算总 DNA 产率,根据 260 nm 和 280 nm 处吸光度的比值判断总 DNA 的大致纯度,根据 260 nm 和 230 nm 处吸光度比值判断有无残存的盐和小分子杂质,如核苷酸、氨基酸、酚等。在 0.5% 的琼脂糖凝胶中,于 5V/cm 电压下电泳,以 λ -DNA 为标准,检测总 DNA 的分子质量,总 DNA 样品的纯度,总 DNA 样品量;用 UVP (combridge) 软件包 SW2000 进行高精度的分析,更精确地估算出总 DNA 样品的含量。

1.4 扩增反应

以所提取的总 DNA 为模板,用 10 个碱基寡核苷酸片段的单引物,在 TEMP·TRONIC 热循环仪 (Barnsteel/Thermolyne 公司) 上进行扩增。反应体积为 30 μ L,成分为 12 μ L/L 引物,50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.3), 2.5 mmol/L $MgCl_2$, 1 μ mol/min Taq 聚合酶 (华美生物工程公司), 0.2 μ mol/L dNTP。扩增程序为^[15]: 96°C 下预变性 330 s, 95°C, 70 s, 35°C, 100 s, 72°C, 140 s, 40 个循环, 72°C 再续补延伸 390 s。程序进行完毕,置样品于 4°C 冰箱中片刻,然后在 1.8% 的琼脂糖凝胶 (EB⁺) 中电泳,紫外光 (254 nm) 观察并照相记录。

2 结果与分析

对提取和纯化的总 DNA,测定其 200~300 nm 内的紫外吸收光谱。总 DNA 在 260 nm 处有一个明显的吸收峰。波长 260 nm 和 280 nm 处吸光度的比值在 1.79~1.84 之间,表明所提取的总 DNA 纯度是比较高的,基本上没有 RNA 分子、蛋白质或酚的污染。根据在 260 nm 吸收值计算的总 DNA 含量高达 mg 级。波长 260 nm 和 230 nm 处吸光度比值为 2.3,表明溶液中基本上没有盐和小分子杂质。在 0.5% 琼脂糖凝胶上总 DNA 样品呈现出一条迁移率很小的整齐条带,在溴酚蓝前没有弥散的荧光区出现,这表明提取的总 DNA 样品是比较纯的 (图 1)。

用总 DNA 作为模板,用 10 个碱基的寡核苷酸片段作为引物进行随机扩增 RAPD (随机扩增多态性 DNA),结果表明可作为有用的分子标记来检测多态性 (图 2)。

3 讨论

从太白红杉组织中提取总 DNA 分子是对其进

行植物分子生物学方面研究的必要前提。要进行 Southern 杂交, RFLP, RAPD 分析等研究,都需要高质量的总 DNA。20 世纪 80 年代以来,普遍采用 CTAB 法提取植物总 DNA。CTAB 是一种去污剂,既能裂解细胞,又能有效沉淀多糖,因此有其独特的优点。但是,对裸子植物,尤其是太白红杉总 DNA 的提取是失败的。能成功地从太白红杉叶组织中提取总 DNA 的关键是如何有效地去除多酚类、多糖和萜类化合物,以及某些未知化合物。



图 1 提取的太白红杉基因组 DNA

Fig. 1 Extracted genome DNA of *Larix chinensis*

不同泳道的样品如下: 1 到 12
分别为 1, 2, 3, 4, 5, 6 居群

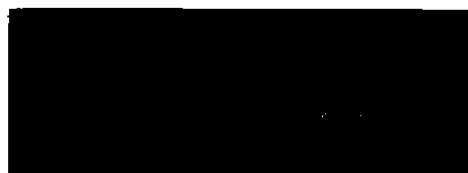


图 2 太白红杉自然居群 RAPD 指纹图谱

Fig. 2 The RAPD fingerprint of *Larix chinensis* natural populations

不同泳道的引物如下: 1 泳道内 s17, 2 至 11
泳道为 s7, s26, s51, s83, s90

3.1 酚类化合物的干扰和去除

许多植物组织都富含酚类化合物,而且其含量会随着植物的生长而增加,因而选取幼嫩的植物材料提取总 DNA 比较好。针叶类植物中多酚的含量比其他植物要高得多,当组织被研磨,细胞破碎后,酚类化合物被释放而且被氧化后会与总 DNA 不可逆的结合,产生褐化效应 (browning effect),导致总 DNA 的活性丧失以及在使用苯酚、氯仿抽提时的丢失。目前,去除酚类化合物的一般途径是在提取的初始阶段防止其氧化,然后再将其与总 DNA 分开。用常规的方法去除太白红杉总 DNA 提取中酚类化合物效果不佳,用足量的 PVP 和 VC,是利用它的“CO—N=基”有很强的结合多酚化合物的能力,其结合

能力随着多酚化合物中芳环羟基数量的增加而加强。然后,可以直接通过离心去除掉或在苯酚和氯仿抽提时除去。用“-SH 基”防止褐变以及可以打断多酚氧化酶的二硫键而使之失活来防止酚类化合物被氧化;酚类化合物的种类很多,用-70℃的丙酮抽提冷冻研磨的太白红杉材料会进一步提高分离总 DNA 的质量。

3.2 多糖的干扰和去除

太白红杉叶组织中富含多糖,在沉淀总 DNA 时,同时也产生多糖的絮状沉淀,这种含有多糖的总 DNA 沉淀难溶于水,或溶解后产生粘稠状的溶液。由于多糖可以抑制许多种酶的活性,因此,污染了多糖的总 DNA 样品无法用于进一步的分子生物学研究。在常规的方法中,通过 SDS-盐酸胍处理可以部分去除一些多糖;在高盐低 pH 值条件下,通过苯酚、氯仿抽提可以除去一些多糖。但是,在太白红杉总 DNA 的抽提中,即使通过这些步骤,仍会发现有多糖与总 DNA 混杂在一起。为进一步除去多糖对总 DNA 提取的影响,在沉淀太白红杉总 DNA 过程中加入乙醇(终浓度 10%),使得去除多糖的效果明显提高。

参考文献:

- [1] 郑万钧. 中国树木志. 第 1 卷[Z]. 北京:中国林业出版社,1983. 237-253.
- [2] 于永福. 国家重点保护野生植物名录(第 1 批)[J]. 植物学杂志,1999,(5):5.
- [3] 狄维忠,于兆英. 陕西省第一批国家珍稀濒危保护植物[M]. 西安:西北大学出版社,1989. 41-44.
- [4] 中国科学院西北植物研究所. 秦岭植物志. 第 1 卷,第 1 册[Z]. 北京:科学出版社,1976. 13-14.
- [5] 石福臣,木佐贯博光,铃木和夫. 中国东北落叶松植物亲缘关系的研究[J]. 植物研究,1998,18(1):55-62.
- [6] 邹喻苹,汪小全,雷乙丁,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.
- [7] DOYLE J J, DOLYE J L. Isolation of plant DNA from fresh tissue[J]. Focus, 1990,2:13-15.
- [8] SCOTT O R, BENDICH A J. Extraction of DNA from plant tissue[J]. Plant Mol Biol Manual,1988,6:1-10.
- [9] ROGERS S O, BENDICH A J. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues[J]. Plant Mol Biol,1985,(5):69-76.
- [10] DOLYE J J, DOLYE J L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue[J]. Phytochem Bull,1987, 19:11-15.
- [11] DELLAPORTS S L, WOOD J, HICHS J B. A plant DNA minipreparation. Version II[J]. Plant Mol Biol Rep, 1983, (1):19-21.
- [12] PIERRE G, HAURENC M D. Isolation of plant DNA: Afast, inexpensive and reliable method[J]. Plant Mol Biol Rep,1992,10:60-65.
- [13] 姚新生. 天然药物化学[M]. 北京:人民卫生出版社,1997. 71-75;115-117;201-202.
- [14] 肖崇厚,陆蕴如. 中药化学[M]. 上海:上海科学技术出版社,1997. 323-329;191-201.
- [15] 赵桂仿,FELBER F,KUEPFER P. 应用 RAPD 技术研究阿尔卑斯山黄花茅居群内的遗传分化[J]. 植物分类学报,2000,38(1):64-70.

(编辑 徐象平)

3.3 未知化合物的去除

在用 CTAB 和 SDS 方法对总 DNA 的提取中,发现某些未知化合物与总 DNA 凝聚成不溶性的复合物,并且这种未知化合物在 230 nm 和 270 nm 处有强的吸收峰,从而干扰了总 DNA 的紫外吸收测定。污染有这种不溶性复合物的总 DNA 不能进行下游的分子生物学的操作。我们采用抗氧剂和螯合剂的组合方案,能使白色絮状沉淀物容易地溶解在 1/10 的 TE 溶液中,在 260 nm 处有一个明显的吸收峰。

在总 DNA 提取时,要特别注意取材。尽可能选取幼嫩的叶组织。由于个体的不同发育时期,组织细胞内的组成成分不同,以及随着个体发育,植物组织细胞内外的组成成分更加复杂多样,尤其是酚类化合物,多糖、萜类化合物,以及一些次生代谢物和一些未知化合物含量的增加,都会给总 DNA 的提取带来困难。不同的植物含有不同的干扰成分,即使是同一种植物的不同组织,或来源于同种植物不同的种群的材料,其总 DNA 的提取都会遇到不同的难点。随着材料的不同,总 DNA 的提取方法要不断地探索和积累经验。

Isolation and characterization of total DNA from *Larix chinensis*

YAN Gui-qin, LI Shan, WANG Yi-ling, WANG Xu-mei, ZHAO Gui-fang

(College of Life Science, Northwest University, Xi'an 710069, China)

Abstract: An extraction medium with the combination of antioxidants and chelants, which can remove phenolic compound, polysaccharide and terpenoid, was successfully used to obtain total DNA from the leaf tissues of *Larix chinensis* beissn. The DNA yields, quality and purity were characterized. These isolated DNA could be used directly for PCR reaction, RFLP and RAPD analysis. A rapid, inexpensive and reliable procedure has been developed for further study of genetic diversity of this species.

Key words: *Larix Chinensis* beissn; total DNA extraction; an extraction medium with the combination of antioxidants and chelants; RAPD(Rahdorn Amplified Polymorphism DNA)

· 学术动态 ·

我校“211 工程”“十五”(二期)建设项目 顺利通过专家论证

2000 年 10 月 27 日下午,我校党政领导、校内各单位负责人和在校博士生导师等 100 多人参加了陕西省教育厅在我校举行的“211 工程”“十五”(二期)建设项目专家论证会。在会上,专家组组长安芷生院士代表专家组宣布:专家组一致同意《西北大学“211 工程”“十五”(二期)建设项目论证报告》,建议陕西省将西北大学“211 工程”列入陕西省“十五”建设规划,并尽早启动、组织实施,给予更大力度的支持。这标志我校“211 工程”“九五”建设以来所取得的成绩得到专家们的充分肯定,同时也标志着我校“211 工程”建设将会进入到一个新的发展阶段。

根据国务院颁布的《面向 21 世纪教育振兴行动计划》、教育部关于“211 工程”二期建设的有关要求和省政府批示精神,受陕西省发展计划委员会的委托,陕西省教育厅组织由 4 位知名院士和数名著名学者、管理专家组成的专家组对《西北大学“211 工程”“十五”(二期)建设项目论证报告》进行论证。在论证会开幕式上,我校党委书记李军锋代表学校致欢迎词,省政府副秘书长薛汉军和省计委助理巡视员张石庄分别代表省政府和省计委致辞并对论证会提出一些具体要求。我校校长孙勇教授作了《以重点学科建设为核心,建设国内一流大学》的报告,对我校“211 工程”、“九五”建设成效以及“十五”(二期)建设项目立项准备的有关情况进行了详细汇报。专家们在考察了重点学科实验室、展室等我校“211 工程”“九五”建设项目后,经过认真评议,形成“西北大学《‘211 工程’‘十五’(二期)建设项目论证报告》专家组论证意见”,对我校“211 工程”和“九五”建设所取得的成绩及西大人在建设中表现出的巨大凝聚力和奋斗不息精神给予了充分肯定和高度评价,并认为我校提出的《论证报告》理由充分,具有极强的说服力,报告思路清晰,重点突出,符合国家有关“211 工程”二期建设的要求,也符合西北大学的实际,建设目标定位准确,发展方向明确,提出“211 工程”“十五”(二期)期间的 5.26 亿元建设经费符合学校建设和发展客观实际,建设任务设置和经费安排合理,切实可行,同时对我校下一步的建设提出了一些很好的建议。

在闭幕式上,省教育厅副厅长郝瑜代表主管部门对我校“211 工程”“十五”建设提出希望,希望我校再接再厉,在今后的建设中取得更好的成绩;孙勇校长代表学校致答谢词,他向各位专家、向省上有关部门领导多年来对西大的关心和支持表示衷心的感谢,并表示全校上下要继续发扬西大人在“211 工程”一期建设中表现出的孜孜不倦、不遗余力的创业精神,把二期建设做得更好,用成倍的成果来回报党和人民的关心和支持。

(薛 鲍)