

一种高效提取虎耳草科植物基因组 DNA 的方法

张得钧^{1,2}, 高庆波², 段义忠², 张发起², 陈世龙^{*}

(1. 中国科学院高原生物适应与进化重点实验室 中国科学院西北高原生物研究所, 青海西宁810001; 2. 中国科学院研究生院, 北京100039)

摘要 [目的] 探索从虎耳草科植物中提取 DNA 的有效方法。[方法] 采用改进的 CTAB 法, 从 11 种虎耳草科植物中提取 DNA。以提取的 DNA 为模板, 利用通用引物“psb AF”和“trn HR”对虎耳草科植物叶绿体 DNA psbA trnH 片段进行 PCR 扩增。[结果] 通过该方法提取的 DNA 纯度较高, 质量较好。用所得 DNA 进行 psbA trnH 扩增的产量高, 可用于后续的测序等分析。对山地虎耳草的 PCR 产物纯化后进行测序, 得到 262 bp 的序列。将其与 GenBank 中的虎耳草属其他植物的 psbA trnH 序列进行比对分析, 证实该序列为目标 psbA trnH 片段的区域。[结论] 该方法可有效去除次生物质对 DNA 的干扰, 提取的基因组 DNA 可用于叶绿体 psbA trnH 测序分析和其他遗传学分析。

关键词 虎耳草科; 基因组 DNA 提取; psbA trnH

中图分类号 Q781 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)16-06673-02

An High effective Method of Extracting Genomic DNA from Saxifragaceae Plants

ZHANG De-jun et al (Key Laboratory of Adaptation and Evolution of Plateau Flora, Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining, Qinghai 810001)

Abstract [Objective] The research aimed to explore the effective method of extracting DNA from Saxifragaceae plants. [Method] DNA was extracted from 11 species of Saxifragaceae plants by using the modified CTAB method. With the extracted DNA as template, the universal primers “psb AF” and “trn HR” were used to make PCR amplification on psbA trnH fragment in chloroplast DNA from Saxifragaceae plants. [Result] DNA with higher purity and better quality was obtained by this method. The yield of PCR amplification on psbA trnH with the obtained DNA was high and it could be used in analysis such as the subsequent sequencing. The PCR products of *Saxifraga montana* H. Smith were purified and sequenced, and a sequence with the size of 262 bp was obtained. It was compared with psbA trnH sequence in other plants *Saxifraga* L. on GenBank website, which proved that this sequence was target region of psbA trnH sequence. [Conclusion] This method could wipe off the disturbance of secondary substances to DNA and the extracted genomic DNA could be used in sequencing analysis of chloroplast psbA trnH and other genetic analysis.

Key words Saxifragaceae; Extraction of genomic DNA; psbA trnH

虎耳草科(Saxifragaceae)植物是双子叶植物,80 属,约有 1 200 种,广泛分布于全球,主产温带。我国约有 28 属,约 500 种,南北均产,主产西南,该科大部分植物均具有重要的利用价值,被广泛应用于农业生产和人民生活中。山梅花(*Philadelphus incanus*)、虎耳草(*Saxifraga stolonifera*)、溲疏(*Deutzia scabra*)、西南绣球(*Hydrangea davidi*)、岩白菜(*Bergenia purpurascens*)、八仙花(*Hydrangea macrophylla*)等植物可美化环境,为常用园艺观赏植物。虎耳草、黑蕊虎耳草(*S. stolonifera*)、岩白菜、落新妇(*Astile chinensis*)、华金腰(*Chrysosplenium sinicum*)、七叶鬼灯檠(*Rodgersia aesculifolia*)、尖叶茶藨子(*Ribes naxi noviczianum*)等均具有药用价值,如黑蕊虎耳草中岩白菜素没食子酸酯类对丙型肝炎丝氨酸蛋白酶有抑制作用^[1];尖叶茶藨子提取物对蕃茄早疫病菌、西瓜枯萎病菌、苹果炭疽病菌、黄瓜腐霉病菌、玉米小斑病菌、小麦赤霉病菌、甘薯黑疤病菌均具有强烈的抑制作用,是一种潜在的新型杀菌剂^[2];七叶鬼灯檠、羽叶鬼灯檠(*R. pinnata*)等的叶和根均具鞣质,可提制烤胶。此外,虎耳草科岩白菜属的所有植物均具有药用价值^[3]。

DNA 分子标记试验和其他许多分子生物学试验一样,是从研究生物个体的基因组 DNA 开始的,能否得到高质量的基因组 DNA 成为 DNA 分子标记技术关键的一步。目前有多种 DNA 提取方法:CTAB 法、高盐低 pH 法、SDS 法^[4]、苯酚法^[5]和试剂盒法^[6]等;但对于植物体内含有大量影响高质量 DNA 分离的酚类、多糖等次生物质的虎耳草科植物来说,采用常规的方法很难提取出高质量的 DNA,而试剂盒法成本相

对较高,因而需要改良常规的分离方法。目前,针对虎耳草科植物 DNA 的提取方法研究十分缺乏。因此,笔者选取虎耳草科具有药用价值的植物为研究材料,在 Doyle 等提取 DNA 方法^[7]的基础上对其进行适当改进,建立了一套经济高效的 DNA 提取方法,并对获得的 DNA 进行了 psbA trnH 片段的扩增。

1 材料与方 法

1.1 材料 供试材料为采集于青海、西藏、四川等地区的 11 种虎耳草科植物,植物名称、采集地点见表 1。

1.2 主要提取试剂配方 B 缓冲液:100 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 1.4 mol/L NaCl, 25 mmol/L EDTA。3 × CTAB 缓冲液:100 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 1.5 mol/L NaCl, 25 mmol/L EDTA, 3% CTAB。5 mol/L NaCl; C: 氯仿/异戊醇(24:1); 异丙醇; β-巯基乙醇; PVP; 75% 乙醇。

1.3 DNA 的提取 参照 Doyle 等的方法^[7]并作适当改进,进行基因组 DNA 的提取。提取步骤如下:在灭菌好的研钵中加入 0.1~0.5 g 硅胶干燥的叶片,再加少许液氮和 PVP 干粉后进行研磨,使其成粉末状;将粉状物转入 2.0 ml 离心管后,加入 1 ml 65℃ 预热的 B 提取缓冲液,放入 65℃ 水浴恒温震荡箱中 10 min 左右;取出于 4℃ 10 000 r/min 离心 10 min,弃上清液。加入 1 ml 左右 65℃ 预热的 3 × CTAB 提取缓冲液和 12 μl β-巯基乙醇,放入 65℃ 水浴恒温震荡箱中 60 min 左右,每隔 10 min 将离心管拿出后来回摇匀;取出加入等体积的 C,缓慢摇晃离心管 10 min,使内含物充分混匀后形成乳浊液,放入冷冻高速离心机中 4℃ 10 000 r/min 离心 10 min 使其分层,然后将上清转入 1.5 ml 离心管;重复上一步,用等体积的 C 再抽提 1 次,并把抽提液转入另一离心管;在抽提后的水相中加入 1/2 体积的 5 mol/L NaCl 和 2/3 体积 -20℃ 保存的异丙醇后,将离心管中的混合液轻轻摇匀, -20℃ 静置

基金项目 国家自然科学基金资助项目(30670130)。

作者简介 张得钧(1975-),男,青海乐都人,在读博士,助理研究员,从事植物学研究。* 通讯作者。

收稿日期 2008-03-21

3~4 h 或过夜;4 10 000 r/min 离心 10 min 后倒出上清液, 收集沉淀;用 75% 的乙醇对沉淀进行清洗,10 000 r/min 离心 6 min, 收集沉淀;重复上一步 2~3 次, 然后将沉淀放入 37 恒温箱或室温下进行风干;加入 100 μ l TE 或三蒸水, 加入适量 RNase 至终浓度为 10 μ g/ml (37 $^{\circ}$ C 水浴 30 min 左右);取出于 -20 $^{\circ}$ C 保存, 备用。

表1 材料来源

Table 1 Material source

材料编号及泳道号 Material No. and lane No.	分类群 Taxa	采集地 Collection site
1	羽叶鬼灯檠 <i>Rodgersia pinnata</i>	四川茂县 Ma County in Schuan
2	三脉梅花草 <i>Parnassia trinervis</i>	西藏聂拉木 Nyalamin Tibet
3	岩白菜 <i>Bergenia purpurascens</i>	西藏林芝 Linzi in Tibet
4	山地虎耳草 <i>S. sinomontana</i>	青海大武 Dawu in Qinghai
5	龛齿虎耳草 <i>S. unbellulata</i> var. <i>pectinata</i>	西藏昌都 Changdu in Tibet
6	爪瓣虎耳草 <i>S. unguiculata</i>	青海大里加山 Dajia Mountain in Qinghai
7	小芽虎耳草 <i>S. gemmiger</i> var. <i>gemmuligera</i>	青海达日 Dai in Qinghai
8	唐古特虎耳草 <i>S. tangutica</i>	青海大武 Dawu in Qinghai
9	红虎耳草 <i>S. sanguinea</i> Franch.	青海久治 Juzhi in Qinghai
10	小伞虎耳草 <i>S. unbellulata</i>	西藏加查 Jiacha in Tibet
11	朗县虎耳草 <i>S. nangxiensis</i>	西藏错那 Cuona in Tibet

1.4 DNA 样品的鉴定

1.4.1 DNA 样品检测。琼脂糖电泳检测:取提取的 DNA 样品 2 μ l, 加 2.0 μ l 的溴酚蓝指示剂, 琼脂糖凝胶浓度为 1% (含 EB); 在 DYY-5 型双稳电泳仪下, 使用 100 V 左右的恒定电压电泳 30~40 min; 电泳缓冲液为 pH 值 8.0 的 1 \times TAE; 于 Bio-RAD 凝胶成像系统上观察并照相, 以检测成功率。

1.4.2 植物叶绿体 DNA psbA trnH 片段的 PCR 扩增。采用通用引物 "psbAF" (5'-GTTATGCATGAACGTAATGCTC-3') 和 "trnHR" (5'-CGCGCATGGTGGATTCACAAATC-3') 扩增叶绿体片段 psbA trnH^[8]; 扩增反应在 Bionera thermal cyder PCR 扩增仪上进行。PCR 反应总体积为 25 μ l, 内含 2.5 μ l 的 10 \times PCR 缓冲液 (含 1.5 mmol/L MgCl₂), 0.3 μ l 10 mmol/L dNTP, 正反引物 (5 pM) 各 1.25 μ l, 0.2 μ l (1.25 U) Taq DNA 聚合酶, 18.5 μ l 双蒸水和 1 μ l (10~20 ng) 的总 DNA 模板。PCR 扩增的反应程序为: 94 $^{\circ}$ C 预热 4 min, 接以 32 个循环的 94 $^{\circ}$ C 加热变性 50 s, 56 $^{\circ}$ C 低温退火 50 s, 72 $^{\circ}$ C 适温延伸 60 s, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 4 min 结束。

进行 PCR 产物检测: 对 PCR 产物在 1% 琼脂糖凝胶中电泳, 拍照。

2 结果与分析

2.1 提取 DNA 的纯度、浓度 DNA 在凝胶电泳上呈现清

晰、整齐的条带, 且电泳图谱拖带较少, DNA 分子量较大 (图 1), 说明所提 DNA 纯度较高, 质量较好。

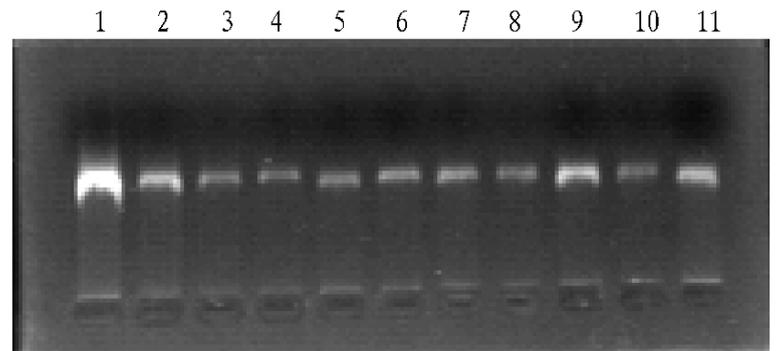


图1 虎耳草科 11 种植物 DNA 凝胶电泳检测

Fig.1 Detection of DNA gel electrophoresis of 11 species of Saxifragaceae

2.2 psbA trnH 片段的扩增 用改进的 CTAB 法提取的 DNA 为模板, 以通用引物 "psbAF" 和 "trnHR" 进行 psbA trnH 片段的扩增, 扩增结果见图 2。图 2 表明, 改进的 CTAB 法提取的 DNA 质量较好, 用所得 DNA 进行 psbA trnH 扩增的产量高, 能很好地用于后续的测序等分析。

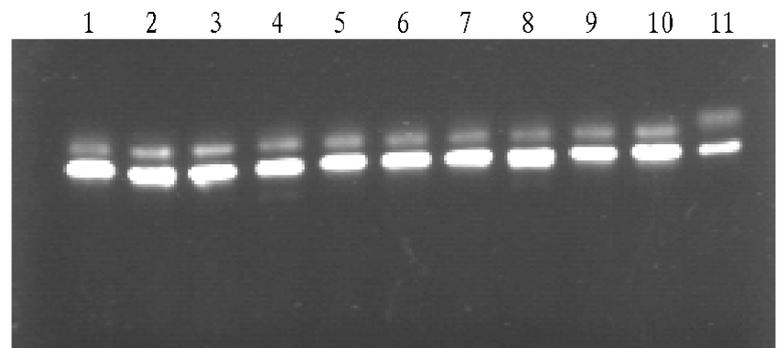


图2 虎耳草科植物 11 种植物 psbA trnH 扩增产物

Fig.2 psbA trnH amplification products of 11 species of Saxifragaceae

2.3 序列分析 对山地虎耳草的 PCR 产物纯化后进行测序, 得到了长度为 262 bp 的序列。经与 Genbank 中调取的虎耳草属的其他植物 psbA trnH 序列比对分析, 证实该序列为目标 psbA trnH 片段的区域。

3 讨论

由于虎耳草科植物体内含有较多的酚类、多糖等次生代谢物, 用常规的 CTAB 法不能获得较高质量的基因组 DNA。因此, 笔者在 Doyle 等提取方法的基础上, 对其进行了适当改进。主要改进的地方有以下几个方面: 一是将植物叶片加入液氮研磨后, 在 65 $^{\circ}$ C 水浴锅中先用 B 缓冲液洗去大部分多糖和其他次生物质。二是酚类物质是芳香族环上的氢原子被羟基或功能衍生物取代后生成的化合物, 广泛分布于植物体内, 是植物体内重要的次生物质之一。酚类物质经氧化后易与 DNA 共价结合引起褐变, 使 DNA 失活^[9], 而 β -巯基乙醇、PVP 为抗氧化剂, 可有效防止酚类物质被氧化。鉴于此, 在提取过程中, 加入了 PVP 粉, 并将 β -巯基乙醇的用量由常规的 8 μ l 增加至 12 μ l。三是在提取介质中采用 3% CTAB 而不是通常用的 2% CTAB。提高 CTAB 的浓度, 一方面可有效地裂解细胞膜, 使细胞内含物充分释放出来; 另一方面, 核酸与 CTAB 在不同的盐浓度下选择性地生成沉淀^[10]。同时用高浓度 NaCl 和异丙醇进行沉淀处理, 最终达到分离多糖和核酸的目的。四是应用 RNase 降解 RNA, 防止 RNA 对提取物的污染。五是在用 75% 酒精清洗沉淀时, 最好事先对酒精进

30 000 kg/hm², 或腐熟的人粪尿 15 000 ~ 22 500 kg/hm²、过磷酸钙 225 kg/hm² 和硼砂 11.25 kg/hm² 做底肥。每公顷大田(土)应准备 1 200 ~ 1 500 m² 苗床。苗床地整好后,在播前先浇清粪水以保持土壤湿润,待土壤吸水后再松土平整播种。

3.1.2 种子处理。播种前进行种子精选、晒种、消毒;播时用敌克松粉剂 1 g 加水拌种,或用百菌清、广枝灵拌种防虫害。

3.1.3 播种。一般在 9 月 5 日左右,播种时将种子拌入适量细泥沙混匀,分 3 次撒播,达到稀播匀播,一般播种量为 4 500 ~ 5 250 g/hm²。播后用秸秆覆盖苗床,当种子发芽子叶伸出(未展开)时揭去覆盖物,并随时保持土壤湿润。

3.2 苗床管理

3.2.1 早匀苗、早定苗。苗多、苗密的地方,在 2 片真叶时进行 1 次疏苗;拔去病虫苗,保证苗齐、苗壮。

3.2.2 追肥促苗。追肥按前促、中稳、后控的原则进行,且在间苗、定苗后追施。如遇天旱,匀苗后可用稀释的清粪水泼施 1 次;2 ~ 3 叶时,施清粪水 15 000 ~ 22 500 kg/hm²,或用尿素 37.5 ~ 45.0 kg 对清粪水 15 000 ~ 22 500 kg/hm² 泼施;3 ~ 4 叶时,看苗施肥,如秧苗叶片发黄,应及时追肥。而叶片嫩绿,生长正常,则可适当少施或不施;移栽前 4 ~ 6 天,用 30 ~ 45 kg 尿素对清粪水 15 000 ~ 22 500 kg/hm² 施 1 次“送嫁肥”。

3.2.3 控苗、炼苗。幼苗长到 2 ~ 3 片真叶时,苗床地用 1.5% 的多效唑粉剂 750 g 对水 750 kg/hm² 喷施 1 次控苗;炼苗主要是防止苗床过湿而形成高脚苗,可采用深沟高厢,追肥时适当少用水,雨水多时改用尿素 37.5 ~ 45.0 kg/hm² 直接撒施,也可用灰肥吸湿。

3.2.4 去杂除劣。4 ~ 5 叶期,拔除叶色、株型不一致的异型苗。

3.2.5 病虫害防治。苗床地的虫害主要有菜青虫、蚜虫、跳甲、地老虎、蟋蟀、蝼蛄等,一般用 2.5% 的敌百虫粉、1.5% 的 1605 粉、甲敌粉、氧化乐果、抗蚜威或杀灭菊脂等防治菜青虫、蚜虫、跳甲等;用甲敌粉、敌百虫等配成毒饵诱杀地老虎、蟋蟀、蝼蛄等。毒饵配制:用甲敌粉 200 ~ 250 g 拌油枯渣或鲜菜碎叶 1.5 ~ 2.0 kg,撒施于苗床;防蟋蟀可用 90% 的晶体敌百虫 50 g,温水溶化后与 2 kg 麦麸和 0.5 kg 油枯混合,再滴少量菜油炒香配制后撒于苗床上。

3.3 大田移栽

3.3.1 整地。及时晒田:稻田在水稻黄熟时及时开沟排水,做到谷黄田燥,确保按时移栽。翻犁:要求细犁 20 ~ 25 cm 深,同时开沟做厢、碎土,厢宽根据土质的排水性能好坏

而定,一般不超过 7 m,土质粘重、排水性较差的土壤,厢宽不超过 3 m。开沟方向应有利于整个繁殖区田块排水,每一块地除厢沟外,都要开中沟、边沟,达到沟沟相连、块块相通。

3.3.2 基肥施用。用总肥量的 50% ~ 60% 作基肥。施有机肥 15 000 ~ 22 500 kg/hm²,磷肥 375 ~ 420 kg/hm²,氯化钾 135 ~ 195 kg/hm²,硼肥约 11.5 kg/hm²,混匀后施于沟、穴中作基肥。

3.3.3 栽植。窝行距 30 cm × 50 cm,每窝 3 ~ 4 株;行向应尽量与常年风向垂直;在 5 叶 1 心时移栽。为确保移栽质量,起苗前 1 天检查苗床湿度,如湿度不够应将苗床浇透,以保证起苗时带土不伤根系。起苗时去除病、虫、杂苗,并按大小苗分级移栽,边起苗边移栽。根栽直,苗栽稳,不栽吊根苗和隔夜苗。栽完苗及时浇施定根肥水,注意不要冲翻秧苗。

3.4 大田管理

3.4.1 查苗补缺。返青成活后应结合去杂,逐厢、逐行进行查窝补缺,及时补上缺苗和除掉病、杂苗。

3.4.2 中耕施肥。第 1 次中耕施肥应在幼苗成活后浅中耕时,用 45 ~ 75 kg/hm² 尿素对清粪水灌施;第 2 次施肥在开盘期,应结合中耕重施,入冬前根据秧苗长势施尿素 90 ~ 105 kg/hm²,或复合肥 225 ~ 300 kg/hm²,施后中耕培土。如冬季气温高,生长迅速,有徒长现象,可用 1.5% 的多效唑粉剂 11 250 g 对水 11 250 kg/hm² 喷施 1 次。

3.4.3 花期管理。主要是去杂除劣,在初花期、盛花期或终花期各清理 1 次田间异型株和杂株,并将清除的杂株全部运出繁殖区外作饲料或沤肥,以保证种子纯度。

3.4.4 检疫。一般在苗期、青荚期请当地植物保护检疫部门进行检疫。

3.4.5 病虫害防治。越冬前主要防治菜青虫、蚜虫和跳甲;开春后重点防蚜虫和菌核病。盛花前后,用 70% 甲基托布津 1 000 倍液,或 50% 多菌灵 500 倍液喷施 1 ~ 2 次防治病虫害。

3.5 成熟收获 成熟后的种子应全部按照田块进行单收、单晒、单藏,防止人为或机械混杂,严格杜绝非该品种的种子混入。收获的种子用近红外分析仪进行品质分析,同时进行纯度检验,不合格种子全部作为杂种子处理。将所有合格种子进行精选加工、均匀混合后,包装作为杂交油菜生产用种。

参考文献

- [1] 肖华贵. 黔油 12 号双低杂交油菜制种技术研究——V 母本可育株的不同识别拔除技术与制种产量[J]. 种子, 2005(5): 88 - 90.
- [2] 饶勇, 李大雄, 刁攀莲, 等. 甘蓝型油菜品种“黔油双低 2 号”品质保优控制技术规程[J]. 种子, 2000(4): 55 - 56.
- [3] 代文东. 黔油系列杂交油菜制种技术研究——黔油 14 号制种父母本种植方式[J]. 贵州农业科学, 2006, 34(1): 25 - 27.
- [4] 周延清. DNA 分子标记技术在植物研究中的应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 9 - 10.
- [5] 徐广, 郭予元. SDS 苯酚法提取高质量的棉铃虫 DNA[J]. 昆虫知识, 2000, 37(3): 177 - 178.
- [6] 王艳, 李韶山, 刘颂豪. 植物总 DNA 样品的快速制备[J]. 激光生物学报, 2000, 9(1): 79 - 81.
- [7] DOYLE J J, DOYLE J L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf material[J]. Phytochemical Bulletin, 1987, 19: 11 - 15.
- [8] SANG T, CRAWFORD D J, KIMS G, et al. Chloroplast DNA phylogeny, reticulate evolution, and biogeography of *Paeonia* (Paeoniaceae)[J]. Amer J Bot, 1997, 84: 1120 - 1136.
- [9] 金晓玲, 乌云塔娜, 张智俊, 等. 桦属植物总 DNA 提取方法研究[J]. 植物研究, 2004, 24(1): 107 - 110.
- [10] MURRAY M G, THOMPSON W F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA[J]. Nucleic Acids Research, 1980, 8: 4321 - 4325.

(上接第 6674 页)

行预冷,防止 DNA 的机械损伤,以提高 DNA 的得率。

通过检验,说明该方法可有效地去除次生物质对 DNA 的干扰,提取的基因组 DNA 可用于叶绿体 psbA-trnH 测序分析和其他的遗传学分析。

参考文献

- [1] 左国营, 李正全, 陈丽蓉, 等. 黑蕊虎耳草中岩白菜素没食子酸酯类及其对丙型肝炎丝氨酸蛋白酶的抑制作用[J]. 云南植物研究, 2007, 29(4): 486 - 488.
- [2] 钮绪燕, 吴文君, 刘虎奇, 等. 虎耳草科植物杀菌活性的初步研究[J]. 西北农业科学, 1996, 5(2): 61 - 65.
- [3] 潘锦堂. 中国植物志[M]. 北京: 科学出版社, 1992: 35 - 231.