

野生芋属植物干叶片 DNA 的提取及 PCR 扩增

蔡秀珍^{1, 2}, 刘克明¹, 龙春林^{2*}

(1. 湖南师范大学 生命科学学院 植物学系, 湖南 长沙 410081;

2. 中国科学院 昆明植物研究所, 云南 昆明 650204)

摘要 野生芋属植物体内多糖、色素、酚类等次生物质含量较高, 严重影响从中提取的 DNA 的质量。针对这一问题, 作者以 6 种芋属植物的干叶片为材料, 摸索出一种适合芋属植物的 DNA 提取方法, 并对提取的 DNA 进行了纯度鉴定和 PCR 检测, 结果表明此方法可有效去除次生物质对 DNA 的干扰, 样品 DNA 的质量和纯度较高, 可用于下游分子生物学操作。

关键词 DNA 提取; 多糖; 色素; 酚类

中图分类号: Q 523

文献标识码: A

文章编号: 1006-9690(2008)01-0051-03

DNA Extraction from Dried Leaves and PCR Amplification of *Colocasia*

Cai Xiuzhen^{1, 2}, Liu Keming¹, Long Chunlin²

(1. Botanical Department College of Life Sciences Hunan Normal University Changsha

410081, China; 2. Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of

Sciences Kunming 650204 China)

Abstract The contents of polysaccharides, pigment, phenolic compound and other secondary metabolites are high in *Colocasia* Schott, which influence frequently the yield and quality of DNA when being extracted. In this study, a new method was introduced which do best for characterization the purity and concentration of DNA. The result showed that it could effectively eliminate the affections of the secondary materials to extracted DNA from *Colocasia*, and which be suitable for other molecular analysis.

Key words DNA extraction, polysaccharide, pigment, polyphenol

获得大量的高纯度 DNA 是分子生物学研究的基础。提取植物 DNA 通常使用的是新鲜幼嫩的材料, 这样实验材料的来源就受到了时间和地域上的限制; 现在野外采集时可将新鲜叶片或嫩芽用变色硅胶快速干燥, 这样可防止细胞死亡过程中次生物质的释放和 DNA 的原位降解, 方便了材料的保存。目前, 国内外已形成多种较成熟的植物 DNA 提取方法^[1-4], 同时也有新的 (或改良的) 方法见于报刊^[5-8]。但是由于植物体内含有较多的色素、酚类

和多糖等次生物质, 它们可在不同程度上使 DNA 失活, 因此对于不同的物种可能需要寻找适当的提取方法来去除这些次生物质, 以获得高质量的 DNA 样品用于下游操作。

芋属 (*Colocasia* Schott) 植物为天南星科多年生常绿草本, 分布于亚洲热带、亚热带及许多温暖地区^[9-10]。该属植物具有十分重要的经济价值, 一些种类是重要的经济作物、观赏和药用植物资源, 如: 芋 (*C. esculenta*) 是世界著名的粮食作物, 全球有 6 000 万人以此为主食; 异色芋 (*C. heterochroma*) 叶片墨绿色, 有暗紫色花纹和银光效果, 是很好的盆栽观叶植物; 大野芋 (*C. gigantea*) 叶色碧绿, 被长而粗壮的淡绿色叶柄盾状撑起, 株型十分优美, 可用作蔬菜和庭园观赏, 其根茎入药, 有解毒、止痛、消肿之功

收稿日期: 2007-04-18

基金项目: 国家自然科学基金 (30170102 和 30470130) 和国家科技基础条件平台项目 (2005DKA210006)

作者简介: 蔡秀珍 (1979-), 女, 湖南人, 硕士, 博士研究生, 从事植物系统学和分子生物学研究。

* 通讯作者

效, 主治口疮、肿毒、烫火伤。近年来在芋的研究中应用生物技术, 使得芋在抗性和品质改良方面均取得了较大进展; 但是芋属植物的叶片较肥厚, 是一类多糖含量植物, 其叶片常有紫色大斑块, 含色素也较多, 使得总 DNA 的提取较为困难, 质量较低, 从而直接影响其下游分子生物学操作。针对这些问题, 我们对 Doyle 和 Doyle^[11] 提取植物 DNA 的 CTAB 法进行了改良, 用此方法提取了 6 种野生芋属植物的 DNA, 并对此进行了纯度鉴定和 PCR 检测, 获得了较理想的效果。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料分别采自云南勐腊基诺山、盈江姐冒、高黎贡山等地 (表 1)。取野生植株刚展开、生长旺盛的幼嫩鲜叶 10 g 左右, 撕成面积不超过 2 cm² 的碎

片, 置于 12 cm × 8 cm 封口袋中, 立即放入 100 g 变色硅胶中干燥常温保存, 硅胶变色后及时更换硅胶, 直至叶片完全干燥为止 (以手指捻时发出噼啪声为准)。凭证标本均保存于湖南师范大学植物标本馆 (HHNU)。

1.2 主要仪器和提取试剂

DYY-6B 型稳压稳流电泳仪 (北京六一仪器厂), 台式高速低温离心机 (Signa 公司), HW-8B 型超级微量恒温器 (浙江永嘉分析仪器厂)。CTAB 组成成分: $\rho = 2\%$ CTAB (十六烷基-三甲基溴化铵), 1.4 mol/L NaCl, 0.02 mol/L EDTA (乙二胺四乙酸), 0.1 mol/L Tris-HCl pH8.0, TE 缓冲液: 0.01 mol/L Tris-HCl pH8.0, 0.001 mol/L EDTA。水洗 Buffer 组成成分: 8 mL 灭菌水、100 μ L β -巯基乙醇。去多糖 Buffer 组成成分: 0.2 mol/L Tris-HCl, 0.05 mol/L EDTA, 0.25 mol/L NaCl, pH8.0。

表 1 材料来源

编号	种名	凭证标本	采集地点	采集日期
1	芋 <i>C. olocasia esculenta</i>	CA I 03020	昆明植物园	2003.07.15
2	异色芋 <i>C. heterochroma</i>	CA I 03023	云南德宏盈江	2003.07.16
3	花叶芋 <i>C. bicolor</i>	CA I 04019	云南勐腊基诺山	2004.07.11
4	龚氏芋 <i>C. gongii</i>	CA I 04018	云南德宏盈江	2004.07.10
5	贡山芋 <i>C. gaoligongensis</i>	CA I 04014	云南高黎贡山	2004.07.09
6	大野芋 <i>C. gigantea</i>	CA I 04007	云南勐腊南公山	2004.06.22

1.3 提取方法

(1) 取干燥叶片 0.5 g 置于研钵中, 加少许固体 PVP (聚乙烯吡咯烷酮) 和石英砂, 迅速研磨成粉末。(2) 将粉末转至 10 mL 的 EP 管中, 加满水洗 Buffer 混匀, 6 000 r/min 离心 5 min 弃上清。若色素仍较多, 可重复此步骤, 直至沉淀为鲜绿色。(3) 加满去多糖 Buffer 混匀, 6 000 r/min 离心 5 min 弃上清。(4) 加 4 mL 2 × CTAB 和 120 μ L β -巯基乙醇混匀, 使沉淀溶解。(5) 65 °C 水浴 1 h, 前 30 min 不时颠倒离心管, 使沉淀充分溶解。(6) 冷却后每管加入 1.2 mL 5 mol/L KAC 混匀, 冰浴 1 h。(7) 加 4 mL 的 24 1 (V/V) 氯仿-异戊醇溶液, 电动混匀 10 min, 4 °C, 10 000 r/min 离心 10 min。(8) 吸取上清, 重复 (7) 步骤。(9) 吸取上清, 加 3.2 mL -20 °C 的冰冷异丙醇混匀, -20 °C 下静置 30~60 min 至白色絮状 DNA 沉淀出现。(10) 4 °C, 10 000 r/min 离心 10 min。(11) 弃上清, 加 2 mL 75% 乙醇, 4 °C, 5 000 r/min 离

心 5 min, 重复 2 次。(12) 弃上清, 加 2 mL 100% 乙醇, 4 °C, 5 000 r/min 离心 5 min。(13) 弃上清, 等沉淀自然风干后, 加 300 μ L 1 × TE 溶液使其充分溶解。(14) 若多糖产物太多, 可等沉淀控干后加 2 mL 水溶解, 再加 1.2 mL 5 mol/L NaCl 和等体积的冰冷异丙醇混匀, -20 °C 下静置 30~60 min, 重复 (10)~(13) 步骤。(15) -20 °C 保存备用。

2 结果与分析

2.1 DNA 纯度、浓度检测

使用紫外分光光度计 (德国 Eppendorf 公司), 分别测定样品 A 230 nm、A 260 nm、A 280 nm 处的光吸收值 (OD 值)。A 260/A 280 nm 的值即为样品 DNA 的纯度。260 nm 与 230 nm 的光吸收比值确定 DNA 的纯度。在波长 260 nm 紫外线下, 1 OD 值的光密度相当于双链 DNA 浓度为 50 μ g/mL, 由此可计算出 DNA 的浓度 (表 2)。

DNA 在波长 260 nm 处有一个明显的吸收峰, 本实验提取的 DNA 经检测知: A 260 nm / A 280 nm 的值在 1.706~1.811 之间, 说明得到的 DNA 纯度较高, 蛋白质、酚类及多糖类杂质去除较完全, 提取时残留的氯仿、乙醇等小分子成分已基本除去。DNA 的浓度在 8.15~9.60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之间。由此可见, 用本文所述的方法已基本可将蛋白质、多糖等杂质以及一些带正电荷的杂质去除干净, 得到较纯的 DNA 样品。

2.2 PCR 扩增反应及电泳检测

为了进一步证实此改良法 DNA 提取方法的效果, 我们对此又进行了 PCR 检测。以所提 DNA 为模板, 引物为 2 个 ITS 序列扩增双向通用引物, 在 Eppendorf 公司的 PCR 自动扩增仪上进行 PCR 扩增。PCR 扩增条件及扩增程序参见 William 等人的方法^[12]。95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min, 接着以 95 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 56~58 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 50 s 循环 2 次; 再以 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 56~58 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 50 s 循环 38 次; 最后在 72 $^{\circ}\text{C}$ 保温 10 min。1.0% 琼脂糖凝胶电泳, 约 1 h 后在紫外分析仪和凝胶成像分析系统下拍照。

用该方法提取的总 DNA 样品进行 ITS 序列引物 PCR 扩增也可获得清晰的带谱 (图 1), 说明所得 DNA 可以用于 PCR 扩增及其它后续分子生物学操作。

表 2 6 种芋属植物基因组 DNA 浓度及产率

编号	OD260	OD280	OD260/ OD280	DNA 浓度 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$
1	0.163	0.090	1.811	8.15
2	0.185	0.103	1.796	9.25
3	0.167	0.094	1.777	8.35
4	0.184	0.102	1.804	9.20
5	0.192	0.106	1.811	9.60
6	0.176	0.101	1.743	8.80

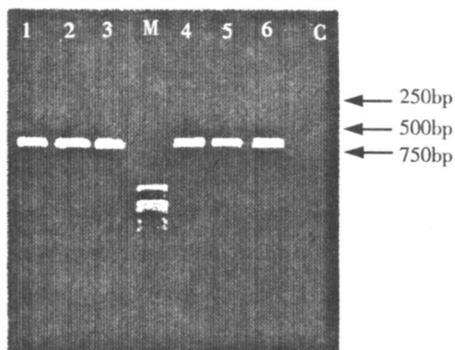


图 1 6 种芋属植物 ITS 区的 PCR 扩增产物电泳图谱

3 讨论

芋属植物的叶片较为肥厚, 多糖含量较高, 多糖可与 DNA 同时沉淀使 DNA 提取物呈胶状, 从而影响对 DNA 样品的浓缩。常规提取方法中, 通过氯仿-异戊醇抽提, 高盐低温沉淀可除去一部分多糖。本实验针对芋属植物富含多糖的特点, 在水洗后加入去多糖 Buffer 在 DNA 沉淀控干后视多糖多寡可再加水溶解沉淀, 加 NaCl 和等体积冰冷异丙醇, 混匀, -20 $^{\circ}\text{C}$ 下静置再次沉淀 DNA, 这样可有效除去多糖。酚类物质广泛分布于植物体, 它经氧化后易与 DNA 共价结合引起褐变。一般采取加酚类的结合剂 (如 PVP, PEG 等, 使之与酚类物质结合成复合物通过离心除去) 和抗氧化剂 (如巯基乙醇、亚硫酸钠、半胱氨酸等, 使多酚氧化酶失活从而防止酚类物质被氧化) 这两类方法来去除 DNA 提取过程中的酚类物质。本实验将两类方法结合起来应用, 在研磨时加入 PVP, 在提取液中加入 β -巯基乙醇, 结果证明可以有效去除酚类物质。色素对 DNA 的纯度也有一定的影响, 本实验为除去色素的影响, 在研磨后增加了水洗步骤, 加 8 mL 灭菌水和 100 μL β -巯基乙醇, 离心后弃上清, 视溶液颜色情况可重复 2~3 次。通过以上几项优化处理, 得到了纯度较高的 DNA 样品。

除 DNA 的纯度对后续操作影响较大外, DNA 片断的长度对实验结果也有一定的影响。DNA 对剪切力极为敏感, 为得到尽可能大的 DNA 片段, 在提取过程中要注意以下问题: 提取过程中应温和操作, 避免剧烈震荡, 用较粗的枪头 (剪去先端) 吸取上清液, 吸取过程中避免产生气泡, 加溶液时勿对着 DNA 沉淀冲洗, 而应让溶液顺着离心管壁流下, 不要通过反复吸打的方法助溶 DNA; 应尽量简化操作步骤, 减少转移 DNA 的次数并以适当的次数、速度离心, 离心时达到两相分离即可。这样可保证得到较大片段的 DNA, 扩增效果比较稳定。

致谢: 本文实验操作在云南英茂生物技术实验室和湖南师范大学植物分子实验室完成, 李永谊女士、郭立琳女士协助操作, 谨此致谢!

(下转第 57 页)

核酸析出(周延清, 2005)。研究结果证实, 丹参 DNA 的提取在提取缓冲液中加入一定量的巯基乙醇即可。改良 CTAB 法提取的 DNA 基本上无色, 质量比 CTAB 法与 SDS 法高。在改良 CTAB 法中, 提取缓冲液中加入 0.2% 的 β -巯基乙醇可以防止抽提过程中酚的自发氧化; 将加入 RNAase 的步骤置于第 (3) 步中, 不仅取得了去除 RNA 的良好效果, 还简化了操作步骤, 获得了可用于 ISSR 反应的 DNA。

前人研究指出: SDS 法提取的核酸质量不高但提取的产率较高(彭建营, 2000)。本研究发现: CTAB 法提取的 DNA 污染程度总体上比 SDS 法要轻。尽管理论计算中 SDS 法的 DNA 得率较高, 但是从电泳及 DNA 浓度纯度测定结果可以看出, 相同点样量情况下, SDS 法提取的 DNA 主带的亮度比 CTAB 法弱或亮度相近, 这说明 SDS 法提取的丹参 DNA 产率和 CTAB 法相近或稍低。

参考文献

[1] 李晓燕. 丹参种质资源的 RAPD 分析 [D]. 沈阳农业

大学硕士学位论文, 2004: 20-21.

- [2] 郭宝林, 林生. 丹参主要居群的遗传关系及药材道地性的初步研究 [J]. 中草药, 2002, 33(12): 1113-1116
- [3] 张兴国, 王义明, 罗国安, 等. 丹参品种资源特性的研究 [J]. 中草药, 2002, 33(8): 742
- [4] 汪红, 王强. 丹参及鼠尾草属植物的 rDNA ITS 序列分析 [J]. 中草药, 2005, 39(9): 1381-1385
- [5] 郭宝林. 林生丹参干叶片的 DNA 提取 [J]. 中草药, 2002, 33(5): 418-420
- [6] 吴丽圆. 4 种思茅松总 DNA 提取方法的比较 [J]. 福建林学院学报, 2004, 24(3): 237-240
- [7] 申丹, 曾杰, 周世良, 等. 4 种石山植物 DNA 提取方法筛选 [J]. 广西科学, 2005, 12(4): 340-342
- [8] 周永清. 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: 143-156
- [9] 彭建营, 束怀瑞. 一种适合枣合酸枣基因组 DNA 的提取方法 [J]. 河北农业大学学报, 2000, 23(4): 46-52

(上接第 53 页)

参考文献

- [1] Doly J J, Doyle J L. Isolation of plant DNA from fresh tissue [J]. Focus, 1990, 2: 13-15
- [2] Scott O R, Bendich A J. Extraction of DNA from plant tissue [J]. Plant Mol Biol Manual, 1988, A6: 1-10.
- [3] Roger S O, Bendich A J. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissue [J]. Plant Mol Biol, 1985, 5: 69-76
- [4] Sharp P J, Kreis M, Shewry P R, et al. Location of β -amylase sequences in wheat and its relatives [J]. Theor Appl Genet, 1988, 75: 286-290
- [5] Tan S-L, Dossett M, Katze M G. Extraction of genomic DNA suitable for PCR analysis from dried plant rhizomes/roots [J]. Bio Tech, 1998, 25(5): 796-801
- [6] Doyle J J, Dickson E. Preservation of plant samples for DNA restriction endonuclease analysis [J]. Taxon, 1987, 36(4): 715-722.

- [7] Guillemaut P, Drouard L M. Isolation of plant DNA: A fast, inexpensive, and reliable method [J]. Plant Mol Biol Rep, 1992, 10(1): 60-65
- [8] 王永飞, 王鸣, 邓学勤, 等. 提取大白菜基因组 DNA 的几种方法比较 [J]. 西北农业大学学报, 2002, 8(4): 85-88
- [9] 李恒. 中国植物志 (第 13 卷, 第 2 分册) [M]. 北京: 科学出版社, 1979: 68-74.
- [10] Mayo S J, Bogner J, Beyce P C. The genera of Araceae [M]. Kew: Royal Botanical Gardens, Belgium: Continental Printing, 1997: 280-283.
- [11] Doyle J J, Doyle J L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue [J]. Phytochem Bull, 1987, 19: 11-15.
- [12] William J G, Kubelik A R, et al. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic marker [J]. Nucl Acids Res, 1990, 18(22): 6531-6535.