

落叶期牡丹非叶材料提取 DNA 的方法

杨英军, 楚爱香, 杨占所

(河南科技大学 林学院, 河南 洛阳 471003)

摘 要:以牡丹休眠时期根、茎、芽为材料,用 CTAB 法、SDS 法、高盐低 pH 法进行 DNA 提取。结果表明:采用 CTAB 法、SDS 法、高盐低 pH 法均能从不同采样期的根、茎、芽中提取出 DNA,采样时期对提取效果没有显著影响;以牡丹根采用 CTAB 法提取,所获得的 DNA 产量高、质量优,是获取落叶期牡丹 DNA 的最佳组合。

关键词:牡丹;落叶期;DNA 提取

中图分类号:S 685. 110. 32 **文献标识码:**A **文章编号:**1001 - 0009(2007)10 - 0167 - 03

牡丹(*Paeonia suffruticosa* Andr)属芍药科、芍药属、牡丹组植物,是我国的传统名花,在我国有悠久的栽培历史。尤其是近年来,随着牡丹国花地位的确定和人们生活水平的提高,牡丹的分子生物学方面的研究也随

之兴起^[1-4]。提取高质量的 DNA 是分子生物学研究的基础,经典的提取方法有 CTAB 法和 SDS 法等。叶片是应用最为广泛的提取材料,尤以幼嫩叶片效果为最佳^[1-3]。牡丹叶内酚类、色素和单宁等含量较高,并与核酸形成复合物, DNA 难以溶解或产生不同程度褐变,直接影响提取质量及扩增反应。林启冰^[2]以牡丹嫩叶为材料,成功获得了可用于 AFLP 分析的高纯度 DNA,赵翊^[3]以干燥后的叶提取也获得了同样的结果。

第一作者简介:杨英军(1969-),男,副教授,博士,河南孟津人,现从事果树分子生物学有关研究工作。
基金项目:河南省自然科学基金资助项目(0611030700);河南省科技攻关资助项目(072102140015)。
收稿日期:2007 - 07 - 16

酶蛋白的洗涤剂,因为任何可以吸收激光波长的物质都可以在激光照射下激发出荧光,从而产生杂质峰,对分析结果的影响很大。荧光法对凝胶的要求也较高,因为不象银染法一块玻璃板涂抹 repel silanc,一块涂抹 binding silanc。所以制备好的凝胶液会很容易地贴着涂抹了 binding silanc 的玻璃板往下流。而荧光法的两块玻璃板什么也不涂,所以凝胶液不太容易往下流,而且易产生气泡。因此在制备凝胶混合液时要充分抽滤、

要抽气,以防止气泡的产生。另外,凝胶在使用前至少凝结 2 h,预电泳要进行约 0.5 h 直至温度上升到 51℃。

参考文献

[1] Doyle J J, Doyle L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue[J]. Phytochem Bull 1987, 19: 11-15.
[2] 明军,张启翔,晏小兰. 梅花基因组 AFLP 银染反应的建立和优化[J]. 北京林业大学学报. 2003 25(3) : 17-21.
[3] 郭先锋. 中国芍药部分种和品种亲缘关系研究[D]. 北京林业大学博士学位论文, 2003.

DNA Template Preparation and Technology System Construction for AFLP Analysis in *Paeonia suffruticosa*

ZHU Hong-xia

(Shanghai Polytechnic College of Urban Management, Shanghai 200438 China)

Abstract: The improved method of CTAB-DNA isolation was used to extract total DNA from leaves of *Paeonia suffruticosa* in this study. AFLP analysis in *Paeonia suffruticosa* was established. Clear and high resoluteion DNA fingerprints were obtained in this study, which made a success in DNA extraction, restriction-ligase reaction, pre-amplification and staining techniques. The aim of this paper was to lay a foundation for the establishment of DNA fingerprinting, selection and breeding of eminent cultivars and genetic relationship in *Paeonia suffruticosa*.

Key words: *Paeonia suffruticosa*; Extraction of DNA; AFLP; Fingerprints

然而,牡丹属多年生落叶木本植物,嫩叶的采集受季节影响大(一般9月至翌年3月是牡丹的落叶期,在这段时期里,牡丹嫩叶很难采集),这使DNA获得受到时间限制。如能从根、茎、芽或种子等非叶材料获得较高质量的DNA,便可弥补这一不足。由于牡丹休眠组织中富含单宁、多糖、酚及色素等物质,应用常规提取方法难以获得高质量的DNA。研究在CTAB法、SDS法、高盐低pH法的基础上,筛选适于遗传分析的基因组DNA提取方法,为进一步的牡丹分子生物学研究提供方便。

1 材料与方法

1.1 试材采集

分别于2005年12月10日、31日、2006年1月21日、2月10日采集株龄10a以上的牡丹品种“洛阳红”的根、茎(1a生枝)、芽放入低温冰箱(-40℃)中保存备用。

1.2 主要试剂

Tris、EDTA、CTAB、β-巯基乙醇、可溶性PVP-40为Sigma公司产品, Taq聚合酶、dNTP、λDNA为华美公司生产,随机引物购自上海生物生工公司,其他均为国产分析纯试剂。

1.3 方法

1.3.1 提取前材料处理 在液氮研磨前,对3种材料进行一定的处理:根:去除表皮,削取白色肉质部分;茎:去除表皮,削取浅绿色韧皮部;芽:去除芽表面苞片,以较幼嫩的部分。以上操作应在材料从超低温冰箱取出后立即进行,过程要迅速,尽量保证在材料没有融化前完成。

1.3.2 DNA提取与检测 采用CTAB法、SDS法、高盐低pH法^[5-7]进行提取。取5μL DNA样品与1μL溴酚兰指示剂混匀,在0.8%琼脂糖凝胶上进行电泳,进一步采用RAPD检测。

2 结果与分析

2.1 不同取样时间DNA提取效果

不同采样期所提DNA的电泳结果(图1)表明:3种材料间DNA各带的亮度、形态均没有明显差异,说明在

材料、方法间,DNA的提取不受到采样时间影响。

2.2 不同方法DNA提取效果

2.2.1 牡丹根用不同方法提取 用不同方法对牡丹根所提DNA的电泳结果(图1-1)可见:①CTAB法(泳道A)、SDS法(泳道B)提取DNA的条带亮度相当,高盐低pH法(泳道C)所提DNA的条带亮度较淡,说明CTAB法与SDS法所提DNA的产率相当,而高盐低pH法产率较小;②CTAB法、高盐低pH法所提DNA电泳点样孔亮度较暗;用SDS法所提DNA点样孔均有较亮的条带,这说明CTAB法所提DNA中多糖含量较低,而SDS法所提DNA有更多的多糖存在;③所提DNA的电泳条带基本在一条直线上,且没有明显的拖尾,分子量大小接近λDNA,说明DNA片段长度相当,没有发生降解。综合上述牡丹根提取DNA,最适合用CTAB法。

2.2.2 牡丹茎用不同方法提取效果 不同方法对牡丹茎所提DNA的电泳结果(图1-2)可见:①CTAB法与SDS法提取DNA条带亮度相当,高盐低pH法亮度较大,说明SDS法所提牡丹茎DNA的产率较高;②CTAB法与高盐低pH法点样孔内亮度相当,SDS法则相对较暗,这说明SDS法提取牡丹茎DNA时,去除多糖效果好,所提DNA质量好;③3种方法所提DNA的电泳条带基本在一条直线上,没有明显的拖尾,分子量接近λDNA,没有发生降解。说明牡丹茎提取DNA,3种提取方法差异不显著。

2.2.3 牡丹芽DNA提取 从不同提取方法对牡丹芽所提DNA的电泳结果(图1-3)可见:①SDS法与高盐低pH法DNA条带亮度相当,说明所提牡丹芽DNA的产率均较高,而CTAB法较低;②3种方法的点样孔均有较亮的条带,说明所提DNA样品中均有较多多糖物质。以牡丹芽提取DNA,3种方法所提DNA的纯度均较低,但高盐低pH法和SDS法均产率较高,因而2种方法均较适于牡丹芽DNA的提取。

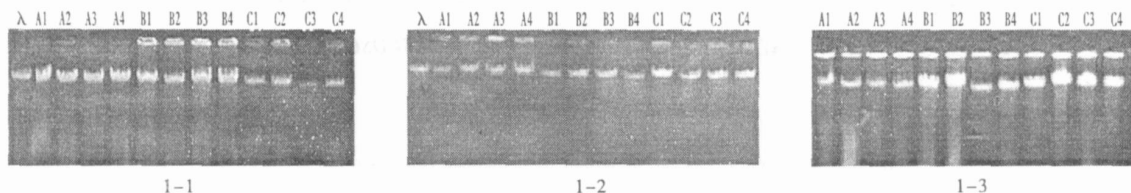


图1 不同时期、方法提取的根1-1、茎1-2、芽1-3 DNA电泳图

注:1~4:4次取样时期;A~C:CTAB、SDS、高盐低pH提取法。

2.3 相同方法、不同材料间电泳结果分析

2.3.1 CTAB法提取效果 不同材料用CTAB法所提DNA电泳结果表明:根(图1-1中A1~A4)较茎(图1-2

中A1~A4)、芽(图1-3中A1~A4)亮得多,电泳孔最亮的为芽所提DNA,茎次之,根最小。说明根所提取的DNA产率最大,纯度最高,CTAB法最适合提取DNA。

2.3.2 SDS 法提取效果 用 SDS 法所提 DNA 的电泳结果(图 1 中的 B1~B4)表明:芽所提 DNA 的电泳条带最亮,根次之,茎最差。这说明用 SDS 法提取的芽 DNA 产率最高、但纯度不高,茎 DNA 纯度较高、但产率最低,根产率较高,纯度较低。根据纯度优先、兼顾产率原则,SDS 法最适合牡丹茎的 DNA 提取。

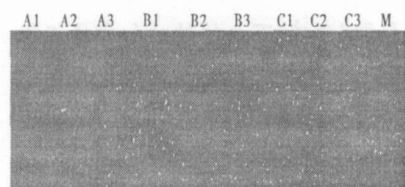


图2 牡丹 DNA 的 RAPD 分析

注: A~C: 随机引物 S1~S3 扩增; 1~3 为根、茎、芽; M 分子量标准 DL 2000, 2 kb, 1 kb, 750 bp, 500 bp, 250 bp, 100 bp。

2.3.3 高盐低 pH 法提取效果 用高盐低 pH 法所提 DNA 的电泳结果(图 1 中的 C1~C4)表明:芽所提 DNA 电泳条带最亮,茎次之,根最暗;芽 DNA 电泳孔最亮,茎次之,根与茎相当。这说明用高盐低 pH 法提取芽 DNA 产率最高,纯度最低;茎、根产率和纯度均较低。因此 3 种提取材料中,高盐低 pH 法也适于牡丹茎 DNA 提取。

综合以上,说明牡丹根与 CTAB 法、牡丹茎与高盐低 pH 法、牡丹茎与 SDS 法是较好的组合。进一步分析发现牡丹根、CTAB 组合有产率和纯度的双重优势,是最佳组合。

2.4 RAPD 检测

用所提取的 DNA 进行 RAPD 反应,获得了清晰稳定的扩增带纹(图 2),进一步用更多的引物试验,同样都取得了较好的扩增结果,表明提取的 DNA 完全适合进行牡丹的分子生物学研究。

3 讨论

3.1 提取方法比较

牡丹叶内酚类、色素、单宁等物质含量较高,这些次生物质与核酸形成复合物, DNA 包埋在这种粘稠的胶状物中,不易暴露出来。试验发现牡丹根、茎、芽同样存在这种问题,特别是根更难提取到 DNA(程度因方法不同而有所区别),为此,对 3 种提取方法进行了一定改进。具体措施是:在提取缓冲液中,均加入了一定的抗氧化剂 PVP;并适当增加 β -巯基乙醇量;在 CTAB 法中增加 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ 的浓度。通过改进,茎、芽的胶状化程度明显减小,并且从根中也提取出了 DNA,并经检测质量很好。

已经知道 PVP、 β -巯基乙醇、 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ 3 种物质对提取的影响是有区别的, PVP 能有效防止多酚类物质氧化,对多糖、蛋白质、RNA 去除较彻底^[9,10]。试验中发

现,如果不加 PVP 而仅提高另外 2 种物质的含量,则提取效果不佳,不能从根中提取出 DNA;加入 PVP 后,即使不改变另外两种物质的含量,提取效果也会有很大改善,能从根中提取出较好的 DNA。这说明:在牡丹根、茎、芽 DNA 的提取过程中, PVP 对提取效果的改善起主要作用,特别是在牡丹根 DNA 的提取中,加入 PVP 是必要的。

3.2 试材处理对提取效果的影响

试材处理对 DNA 的提取效果的影响很大,为保障 DNA 提取质量,一般应注意做到两个确保不融化:①材料从冰箱中取出到开始研磨的过程中,确保不融化。否则,试材会很快氧化变褐, DNA 也会在内源酶的作用下发生降解,从而影响提取效果;②采用液氮研磨时,动作要迅速,在加入提取缓冲液前,确保不融化。

做到这两点对牡丹根尤其重要。在室温下暴露在空气中一段时间或融化后,牡丹根会很快氧化(牡丹茎、芽没有这种现象),一旦根发生颜色变化,将会严重影响 DNA 提取效果,在 DNA 沉淀时发生严重的褐变现象,且沉淀一般呈碎屑状无法挑出。

4 结论

CTAB 法、SDS 法、高盐低 pH 法均能从牡丹根、茎、芽中提取 DNA,且提取效果不受采样时期的影响。

采用 CTAB 法对牡丹根、SDS 法或高盐低 pH 法对牡丹茎进行 DNA 提取是较好的组合;CTAB 法与牡丹根组合是获取落叶期牡丹 DNA 的最佳组合。

参考文献

- [1] 陈向明, 郑国生, 孟丽. 不同花色牡丹品种亲缘关系的 RAPD-PCR 分析[J]. 中国农业科学, 2002, 35(5): 546-551.
- [2] 林启冰, 周志钦, 赵宣, 等. 基于 Adh 基因家族序列的牡丹组(Sect. Moutan D.C.) 种间关系[J]. 园艺学报, 2004, 31(5): 627-632.
- [3] 索志立, 周世良, 张会金, 等. 杨山牡丹和牡丹种间杂交后代的 DNA 分子证据[J]. 林业科学研究, 2004, 17(6): 700-705.
- [4] 陈向明, 郑国生, 张圣旺. 牡丹栽培品种的 RAPD 分析[J]. 园艺学报, 2001, 28(4): 370-372.
- [5] 顾红雅, 瞿礼嘉. 植物分子生物学手册[M]. 北京: 高等教育出版社, 1998: 3-12.
- [6] 傅荣昭, 孙勇如, 贾士荣. 植物遗传转化手册[M]. 北京: 中国科学技术出版社, 1994: 131-136.
- [7] Zou Y P (邹喻苹), Wang X Q (汪小全), Lei Y D (雷一丁), et al. Isolation and characterization of total DNA from several endangered species and their allies[J]. Acta Bot Sin (植物学报), 1994, 36(7): 528-533.
- [8] 赵翮, 赵树进. 濒危植物白木香基因组 DNA 提取方法的研究[J]. 陕西科技大学学报, 2006, 24(1): 29-34.
- [9] 张国防, 陈存及, 邢建宏. 樟树叶 DNA 提取方法的研究[J]. 江西农业大学学报, 2006, 28(1): 111-114.
- [10] 杜道林, 马文儒, 苏杰, 等. SDS、CTAB 和 PVP 法提取香蕉基因组 DNA 的比较研究[J]. 海南师范学院学报(自然科学版), 2003, 16(1): 74-79.