

思茅松不同组织 DNA 的提取

吴丽圆

(云南省林业科学院 云南省森林植物培育与开发利用重点实验室, 云南 昆明 650204)

摘要:以思茅松(*Pinus kesiya* var. *langbianensis*)嫩针叶、半木质化韧皮部、木质化韧皮部及成熟针叶为实验材料,采用高盐沉淀法提取思茅松的总 DNA。结果表明:除成熟针叶外,其它 3 种组织中次生物质含量少,均为提取 DNA 的极好材料, DNA 的得率达到 21.32~29.85 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, A_{260}/A_{280} 值在 1.6 左右。清晰明亮的 RAPD 产物也表明所提取的 DNA 无论在质量还是数量上均可满足 DNA 分子标记的要求。因此,根据不同季节,可选择不同的植物组织来提取高质量的 DNA。

关键词:思茅松;组织;DNA 提取

中图分类号:S722 文献标识码:A 文章编号:1001-7461(2005)02-0083-03

DNA Extraction from Different Tissues of *Pinus kesiya* var. *langbianensis*

WU Li-yuan

(Yunnan Provincial Key Laboratory of Cultivation & Development of Forest Plant, Yunnan Academy of Forest Science, Yunnan, Kunming 650204, China)

Abstract: The genomic DNA was extracted from different tissues of *Pinus kesiya* var. *langbianensis* by high salt precipitation method. The results indicate that except for mature leaf, other tissues, such as young leaf, half-ligneous phloem and phloem can be used to extract DNA easily and successfully. In addition, the value of A_{260}/A_{280} for DNA sample extracted from three kinds of tissues mentioned above is 1.6 or so, and the quantity is 21.32~29.85 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$. Also, clear and bright products of RAPD reveal that the DNA may meet needs of DNA molecular markers. Accordingly, different tissues may be used to extract DNA of good quality in different seasons.

Key words: *Pinus kesiya* var. *langbianensis*; tissue; DNA extraction

在 DNA 水平上进行遗传分析的分子生物学实验方法,如:随机扩增多态 DNA (RAPD),串联重复序列 (SSR),扩增酶切片段长度多态性 (AFLP) 等,这些方法已广泛应用于生物学研究的各个领域,在这些技术的实验过程中, DNA 的质量是影响实验成败的关键因素之一。由于针叶树的针叶内树脂(萜烯类化合物)和酚类化合物含量高,从针叶中提取高纯度 DNA 相对比较困难^[1]。笔者在进行思茅松群体分子遗传多样性研究的工作中,分别以思茅松不同组织器官为实验材料提取 DNA,并对所得到的 DNA 的产量和纯度等进行比较,以利于选择 DNA 得率高、次生物质少的实验材料。

1 材料与方法

1.1 实验材料

思茅松(*Pinus kesiya* var. *langbianensis*)当年生嫩叶、半木质化韧皮部、木质化韧皮部和成熟叶。

1.2 主要药品与试剂

1.2.1 药品 RnaseA、 λ DNA、Primer 等购自 Promegen 公司, Tag polymerase 等购自宝生生物有限公司。

1.2.2 所用主要试剂 (1)提取液:100 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0; 1.4 mmol/L NaCl; 20 mmol/L EDTA; 2% CTAB (W/V); 3% PVP (W/V); 3% β -巯基乙醇。(2) TE 缓冲液:10 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0; 0.1 mmol/L EDTA

1.3 DNA 提取及纯度测定

DNA 的提取采用高盐沉淀法^[2,3],具体操作步骤如下:

(1)分别称取 1 g 样品(嫩叶、半木质化韧皮部、

收稿日期:2004-06-30

基金项目:国家林业局“云南珍稀濒危森林植物保护与繁育重点实验室”开放研究基金(2001C01)

作者简介:吴丽圆(1967-),女,云南人,副研究员,硕士,从事林木遗传育种研究。

木质化韧皮部和成熟叶),用液氮研磨至细粉状后,迅速倒入装有 3 mL DNA 提取液(65 ℃)的 10 mL 离心管中,充分摇匀后,65 ℃水浴保温 30 min;

(2) 5 438 × g 离心 10 min,取上清液,加入等体积氯仿:异戊醇(24:1),充分混匀;

(3) 5 438 × g 离心 10 min,取上清液,加入等体积氯仿:异戊醇(24:1),混匀;

(4) 5 438 × g 离心 10 min,取上清液,加入 2.5 倍体积无水乙醇(预冷),在冰箱中静置 1 h 后,用广口吸管将白色絮状物吸出,转入 1.5 mL 离心管中,4 579 × g 离心 10 min,倒掉水相;

(5) 将所得沉淀用 70% 乙醇洗涤 2 次,风干后溶于 100 μL TE 中。

(6) 待 DNA 充分溶解于 TE 后,加入适量 4 mol/L NaCl,使溶液中 NaCl 的终浓度达到 2.5 mol/L,然后再次用无水乙醇将 DNA 沉淀出来,经洗涤风干后,溶于 100 μL TE 中。

用紫外分光光度计测定所提取 DNA 的 OD₂₆₀ 和 OD₂₈₀ 值,计算 A₂₆₀/A₂₈₀ 值表示 DNA 的纯度,并测定 DNA 的浓度^[4]。

1.4 琼脂糖凝胶电泳

RAPD 扩增反应在 Perkin - Elmer 9700 基因扩增仪上进行,20 μL 反应体系:其中 10 倍反应缓冲液 2 μL(100 mmol/L - pH 8.3 Tris-HCl, 500 mmol/L KCl, 20 mmol/L MgCl₂, 0.01% 明胶),Taq 聚合酶 1 单位,dATP、dTTP、dCTP 和 dGTP 各 100 μmol/L,引物 5 pmol,DNA 模板 20 ng 左右。扩增程序为:94 ℃预变性 1 min;再 40 个循环:94 ℃变性 30 s,37 ℃退火 30 s 和 72 ℃延伸 2 min;最后于 72 ℃延伸 7 min。扩增产物用 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳检测。

2 结果与分析

2.1 DNA 纯度与产量

不同组织所提取 DNA 的纯度和产量有所不同,但均以幼嫩组织所提取 DNA 产量和纯度为高(表 1),它们的 A₂₆₀/A₂₈₀ 都在 1.6 左右,与标准纯 DNA 的 A₂₆₀/A₂₈₀ 比值(1.8)相比,其纯度达到 88.89% 左右。对于成熟叶,其 DNA 纯度低,而且带有褐色。从 DNA 的琼脂糖凝胶电泳结果(图 1)来看,DNA 谱带清晰,拖尾不明显,此外也说明植物组织越嫩,所提取植物基因组的得率也越高。

2.2 DNA 的 PCR 扩增

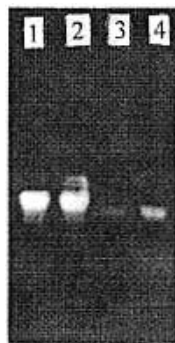
将思茅松不同组织所提取的 DNA 稀释为 10

ng/μL 作为模板进行 RAPD 反应。结果(图 2)表明,这些 DNA 都能扩增出清晰的谱带,片段大小在 250 ~ 2 000 bp。

表 1 思茅松不同组织的 DNA 纯度和产量

Table 1 Purity and yield of DNA on different tissues of *Pinus kesiya* var. *langbianensis*

实验材料	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	得率/μg · g ⁻¹
嫩叶	1.631	29.85
半木质化韧皮部	1.626	27.63
木质化韧皮部	1.597	21.32
成熟叶	1.513	5.11



样品号:1. 半木质化韧皮部;2. 嫩叶;3. 成熟叶;4. 韧皮部

图 1 思茅松不同组织的 DNA 琼脂糖凝胶电泳结果

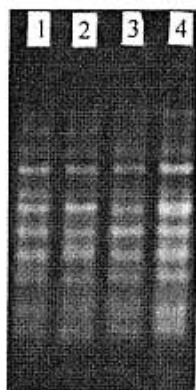
Fig. 1 Results of agarose gel electrophoresis of DNA from different tissues of *Pinus kesiya* var. *langbianensis*

3 结论与讨论

3.1 DNA 提取的方法差异

由于植物组织所含复杂次生化化合物的影响,从植物组织中提取高纯度 DNA 相对比较困难,DNA 的提取往往花去研究者大量的时间和精力。DNA 提取的难易程度首先取决于植物种自身。目前有关植物 DNA 提取的文献大都是关于研究用不同的方法提取不同植物的 DNA^[5-8],如:CTAB 法、SDS 法和 DNA 提取试剂盒等。通常,由 DNA 提取试剂盒提取得到的 DNA 纯度较高,A₂₆₀/A₂₈₀ 在 1.8 左右,但由于 DNA 提取试剂盒价格昂贵,在样品数量较多的情况下,使用 DNA 提取试剂盒提取 DNA 成本较高,因此,大多数研究者都力求寻找其它的有效方法来提取 DNA。本研究针对针叶树的特点,选择了 4 种 DNA 提取方法,即简易提取法、高盐沉淀法、CTAB 沉淀法和高盐低 pH 法,从思茅松嫩叶中提取 DNA,实验结果显示,高盐沉淀法和高盐低 pH 法提取得到的 DNA 在质量和数量上均能满足 RAPD 扩增的需要,但从操作程序的角度考虑,高盐沉淀法

比高盐低 pH 法省时省力,因此,确定高盐沉淀法为提取思茅松总 DNA 的最佳方法,详细情况见文献^[9]。



引物:AGGGCCGTCT;样品号:1. 韧皮部;
2. 成熟叶;3. 嫩叶;4. 半木质化韧皮

图2 思茅松不同组织 DNA 的 RAPD 产物

Fig.2 RAPD products of the genomic DNA from different tissues of *Pinus kesiya* var. *langbianensis*

3.2 DNA 提取的组织间差异

许多数据已经表明植物组织中的多糖和其它一些次生代谢产物,如:酚、酯、萜等,对 DNA 的提取造成很大困难^[7],而且这些物质随着植物器官的增长而增加。因此,在实际工作中人们总是选择幼嫩叶来作为植物 DNA 提取的理想材料。但对于大多数植物种而言,幼嫩叶采集受到季节限制。一般除春季外,一年的大部分时间里都很难采集到幼嫩叶,这

给研究工作带来很大的不便。从思茅松不同组织 DNA 提取的情况来看,除成熟叶外,幼嫩叶、半木质化韧皮部和木质化韧皮部次生物质含量少,都是 DNA 提取的极好材料,所提取 DNA 无论在质量还是数量上均能满足 DNA 分子标记的要求。因此,根据不同季节,可选择不同的植物组织来提取高质量的 DNA。

参考文献

- [1] Pierre G, Haurence M D. Isolation of plant DNA: A fast, inexpensive, and reliable method[J]. Plant Molecular Biology. Reporter, 1992, 10: 61-65.
- [2] Murry H G, Thompson W F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA[J]. Nucleic Acid Res., 1980, 8: 4321-4325.
- [3] Fang G S, Hammar J, Grumet R. A quick and inexpensive method for removing polysaccharides from plant genomic DNA[J]. Bio. Techniques, 1993, 13: 52-56.
- [4] 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术[M]. 北京:高等教育出版社,1993. 365.
- [5] 马艳,马荣才,徐锡增. 扁桃基因组 DNA 的制备和 AFLP 技术体系的建立[J]. 南京林业大学学报,2003,27(3):35-38.
- [6] 邹喻苹,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.
- [7] 彭建营,束怀瑞,彭士琪. 一种适合枣和酸枣基因组 DNA 的提取方法[J]. 河北农业大学学报,2000,10(4):46-49.
- [8] 李晓青,叶冰莹,陈由强,等. 福建柏总 DNA 的快速简便提取和鉴定[J]. 林业科学,1999,35(5):51-56.
- [9] 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.

(上接第 73 页)

属的分析表明,属于热带成分的有 96 属,占总属数 72.7%,其中泛热带比例最高,为 45 属,占总属数的 34.1%。与其他省区相比较,与广东省的共有种最多,有 180 种,其次为广西(165 种),与属的分析是一致的,厦门地区藤本植物属于热带性质。

致谢:本文在调查研究过程中承蒙福建省亚热带植物研究所张永田研究员、厦门植物园名誉主任、高级工程师陈榕生先生的指导和厦门植物园农艺师王成聪先生的帮助,特致谢忱!

参考文献:

- [1] 厦门市地理学会. 厦门经济特区地理[M]. 厦门:厦门大学出版社,1995.
- [2] 蔡永立,宋永昌. 中国亚热带东部藤本植物的多样性[J]. 武汉

植物学研究,2000,18(5):390-396.

- [3] 陈恒彬,陈松河,罗智凤. 厦门地区观赏藤本植物资源及其在园林绿化中的应用[J]. 亚热带植物科学,2003,32(4):36-42.
- [4] 陈登雄,罗智凤,王芬芬. 厦门植物园攀援植物资源及应用评价[A]. 陈榕生. 厦门市园林植物园建园四十周年纪念文集[C]. 福建厦门:厦门大学出版社,2002. 133-138.
- [5] 福建植物志编写组. 福建植物志[M]. 第1卷(修订本),第2~6卷. 福建:福建科学技术出版社,1991,1985,1998,1990,1993,1995.
- [6] 耿桂平. 福建攀援植物区系分析[J]. 中南林学院学报,2001,21(1):40-43.
- [7] 吴征镒. 中国种子植物属的分布区类型[J]. 云南植物研究,1991,增刊(4):1-139.
- [8] 吴征镒. “中国种子植物属的分布区类型”的增订和勘误[J]. 云南植物研究,1993,增刊(4):141-178.