

苔藓植物 DNA 提取方法研究

侯义龙^{1,2,3}, 曹 同^{1,4}, 蔡丽娜², 孙志刚², 崔 琳²

(1. 中国科学院沈阳应用生态研究所, 辽宁沈阳 110016; 2. 大连大学生物工程学院, 辽宁大连 116622; 3. 大连大学生命科学工作室, 辽宁大连 116622; 4. 上海师范大学生命与环境科学学院, 上海 200234)

摘 要: 提取高质量的 DNA 是对苔藓植物遗传多样性进行研究的基础。该文以苔藓植物为试材, 用 5 种方法, 即快速提取法、改良 CTAB 法、CTAB 法、SDS 法及高盐法(第一种为自行设计, 第二种是对原有方法的改进)对苔藓植物 DNA 提取方法进行了比较研究。结果表明, 快速提取法和改良 CTAB 法是 2 种适合于苔藓植物 DNA 提取的方法。这 2 种方法提取的 DNA 浓度和纯度均比较高, 凝胶电泳显示无明显降解现象, 适宜作为 PCR 扩增的模板, 并成功地进行了 RAPD 扩增。

关键词: 苔藓植物; DNA 提取; RAPD 扩增

中图分类号: Q781 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2003)05-0425-04

Study on extraction methods of bryophytes genomic DNA

HOU Yi-long^{1,2,3}, CAO Tong^{1,4}, CAI Li-na²,
SUN Zhi-gang², CUI Lin²

(1. Institute of Applied Ecology, CAS, Shenyang 110016, China; 2. Bioengineering College, Dalian University, Dalian 116622, China; 3. Laboratory of Life Science, Dalian University, Dalian 116622, China; 4. College of Life and Environmental Science, Shanghai Normal University, Shanghai 200234, China)

Abstract: The extraction of high quality DNA was the basis of the study for genetic diversity of Bryophytes. The results of 5 kinds of method for extracting DNA were compared using Bryophytes species as materials. The results showed that the fast extraction method which was designed by our research group and improved CTAB method were 2 kinds of method suitable to the high quality DNA for Bryophytes. The purity of extracted DNA by the two methods was high and their fragment was clearly shown by agarose gel electrophoresis. DNA extracted by the two methods was ready to be used as templates for PCR amplification.

Key words: bryophytes; DNA extraction; RAPD amplification

中国是世界上苔藓植物多样性最丰富的国家之一, 具有较多的中国和东亚特有属种(曹同, 2000)。这些特有类群反映了中国及东亚植物区系的特征, 对深入阐明我国苔藓植物区系起源和在全球植物区系中的地位有特殊的重要科学研究价值。因此, 开展苔藓植物我国和东亚特有属种的遗传多样性研究

十分必要。制备高质量苔藓植物基因组 DNA 并可用于 PCR 扩增, 是在 DNA 水平上开展苔藓植物遗传多样性研究的基础。目前关于植物 DNA 的提取有许多方法, 主要的有氯化铯密度梯度离心法(傅荣昭, 1994)、CTAB 法(米景九, 1990; 刘学春, 1995)、SDS 法(刘育乐, 1990; 戴思兰, 1996)及高盐

收稿日期: 2002-12-16 修订日期: 2003-03-12

基金项目: 国家自然科学基金(30170076); 上海市高等学校科学技术发展基金(01D03-2 和 02D2-47)。

作者简介: 侯义龙(1963-), 男, 辽宁盖州市人, 教授, 博士, 从事植物基因工程研究工作。

法(邹喻苹, 1994; Dirlewanger, 1994)等, 有关苔藓植物分子生物学方面的研究较多(Stenoien, 2000; So, 2000; Shaw, 2000; Boisselier-Dubayle, 1995; 王艇, 2000), 但有关苔藓植物基因组 DNA 提取方法的研究还未见专门报道。本研究采取 5 种不同的方法提取苔藓植物基因组 DNA, 探讨了各种方法的提取效果, 确定了适合苔藓植物基因组 DNA 提取的方法, 并将它们用于 RAPD 扩增, 建立了苔藓植物 RAPD 扩增的优化体系, 为苔藓植物中国和东亚特有属种在 DNA 水平上进行遗传多样性的研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

本研究在大连大学生物工程学院分子生物学实验室和大连大学生命科学工作室进行。试验所用苔藓植物均采自吉林省长白山自然保护区暗针叶林区, 有毛梳藓(*Ptilium crista-castrensis*)、万年藓(*Climacium dendroides*)、树藓 *Girgensohnia rathenica*、塔藓(*Hylocomium splendens*)、垂枝藓(*Rhytidium rugosum*)、木藓(*Thamnium alopecurum*)、扁枝藓(*Homalia trichomanoides*)。

1.2 DNA 提取方法

1.2.1 快速提取法 (1)取苔藓植物 100~200 mg, 加入液氮将其研磨成粉末, 将粉末加入 1.5 mL 离心管中, 再加入 600 μ L 改良 CTAB 缓冲液, 充分研成匀浆, 加入 3% 的 β -巯基乙醇, 震荡混匀, 13 000 rpm, 10 min。(2)取上清液, 加入等体积 CI, 抽提 2~3 次, 13 000 rpm, 3 min, 至蛋白层无明显出现。(3)取上清液, 加 0.3 倍的 NH_4Ac 和 2.5 倍冷无水乙醇 13 000 rpm, 3 min。(4)弃上清液, 用 70% 乙醇 400 μ L 洗 2 次, 室温干燥 DNA, 加入 100 μ L 3 dH₂O 溶解, 再加入 2 μ L 10 mg/mL 的 RNA 酶 A, 37 $^{\circ}\text{C}$, 1 h。(5)加入 400 μ L 3 dH₂O, 再加入 500 μ L CI 抽提, 13 000 rpm, 3 min, 至蛋白层无明显出现。(6)弃去上清液, 以 70% 乙醇洗 DNA, 离心 5 min, 室温干燥 DNA。(7)加入 3 dH₂O 30 μ L, -20 $^{\circ}\text{C}$ 备用。

1.2.2 改良 CTAB 法 (1)取苔藓植物 100~200 mg, 加入液氮将其研磨成粉末, 将粉末加入到 1.5 mL 离心管中, 每管中加入 600 μ L 改良 CTAB 缓冲液, 再加入 3% β -巯基乙醇, 混匀, 60 $^{\circ}\text{C}$ 水浴, 1 h。

(2)加入等体积 CI 抽提 2~3 次, 13 000 rpm, 3 min, 至蛋白层无明显出现。(3)取上清液, 加入 2 倍体积的无水乙醇, 混匀, -20 $^{\circ}\text{C}$ 60 min 沉淀 DNA。(4)取出, 13 000 rpm, 10 min。(5)弃去上清液, 以 70% 乙醇洗 DNA 2 次, 离心 2 min, 室温干燥 DNA。(6)加入 100 μ L 3 dH₂O 溶解, 再加入 2 μ L 10 mg/mL 的 RNA 酶 A, 37 $^{\circ}\text{C}$, 1 h。(7)加入 400 μ L 3 dH₂O, 再加入 500 μ L CI 抽提, 13 000 rpm, 3 min, 至蛋白层无明显出现。(8)弃去上清液, 以 70% 乙醇洗 DNA, 离心 5 min, 室温干燥 DNA。(9)加入 40~50 μ L 3 dH₂O, -20 $^{\circ}\text{C}$ 备用。

1.2.3 CTAB 法 (略), 具体参照文献(米景九, 1990; 刘学春, 1995)。

1.2.4 SDS 法 (略), 具体参照文献(刘育乐, 1990; 戴思兰, 1996)。

1.2.5 高盐法 (略), 具体参照文献(邹喻苹, 1994; Dirlewanger, 1994)。

1.3 DNA 鉴定方法

1.3.1 紫外检测 将所得的 DNA 提取液稀释 100 倍于 DU-70 紫外可见分光光度计上测定波长 260 nm、280 nm 处的吸光度。根据 A260/A280 值判断 DNA 纯度。

1.3.2 电泳检测 将提取的 DNA 于 0.7% 琼脂糖凝胶中电泳, 电压 3~5 V/cm, 电泳时间 1~1.5 h, EB 染色。以 λ DNA 为对照在紫外透射仪上观察 DNA 谱带的完整性, 并照相记录。

1.3.3 RAPD 扩增 以所提取的 DNA 为模板, 进行 RAPD 扩增。RAPD 扩增产物用 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳进行分离, EB 染色, 透射式紫外灯下观察并照相。

2 结果与分析

2.1 五种方法对苔藓植物 DNA 的提取结果

本研究采用了五种方法提取参试苔藓植物基因组 DNA。其中, 快速提取法为本研究自行设计, 改良 CTAB 法是在 CTAB 法基础上加以改进后形成的, 主要是在缓冲液中加入 PVP 和 β -巯基乙醇。

从试验结果看出: 快速提取法和改良 CTAB 法提取的基因组 DNA 的纯度较大(分别为 1.74~1.85 和 1.72~1.82), 浓度较高(分别达到 247~289 ng/ μ L), 而且提取的稳定性好, 基因组 DNA 的完整性都比较高(表 1, 图 1:A、B)。而 CTAB 法提

取的基因组 DNA 虽然完整性较好, 浓度较大(226~268 ng/ μ L), 但纯度较低(1.52~1.60)。SDS 法和高盐法提取的基因组 DNA 纯度较低(分别为 1.45~1.60 和 1.38~1.50), 浓度也较低(分别为 107~132 ng/ μ L 和 104~126 ng/ μ L)。因此, 在实验的初期, 研究小组即决定淘汰 CTAB 法、SDS 法和高盐法, 而保留快速提取法和改良 CTAB 法, 并以之建立 RAPD 扩增体系。值得指出的是, 快速提取法比较适合新鲜样品以及干燥保存时间在半年以内的样品的 DNA 提取, 干燥保存超过半年以上, 则使用该方法的提取浓度下降, 改良 CTAB 法则可弥补快速提取方法在这方面的不足。因此, 本研究认为

为提取苔藓植物 DNA 时, 采用快速提取法和改良 CTAB 法为好, 两方法可以配合使用, 对于新鲜的苔藓植物材料以及干燥保存时间半年以内的样品可采用快速提取法, 这样既能保证提取效果, 又可缩短提取时间, 提高基因组 DNA 提取效率, 如果参试材料干燥保存时间太长, 最好采用改良 CTAB 法。

2.2 RAPD 扩增体系优化

对影响 RAPD 反应体系的主要因子(Mg^{2+} 浓度、dNTP 浓度、引物浓度、Taq DNA 聚合酶浓度和 DNA 模板浓度)的用量设计不同的梯度, 以经济实用为原则, 能扩增出清晰、可重复的谱带为目的, 进行摸索。经过多次研究, 建立了苔藓植物 RAPD 扩

表 1 五种方法提取的苔藓植物 DNA 的纯度与浓度

Table 1 The quality and concentration of DNA extracted by 5 methods

苔藓材料 Materials	纯度 Quality(OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀)					浓度 Concentration(μ g/ μ L)				
	快速提取法 Fast extraction	改良 CTAB Improved CTAB	CTAB	SDS	高盐法 High salt	快速提取法 Fast extraction	改良 CTAB Improved CTAB	CTAB	SDS	高盐法 High salt
毛梳藓 <i>Ptilium crista-castrensis</i>	1.85	1.76	1.56	1.60	1.46	276	245	235	132	104
万年藓 <i>Climacium dendroides</i>	1.78	1.72	1.59	1.57	1.38	289	235	226	127	113
树藓 <i>Girgensohnia rathenica</i>	1.74	1.79	1.53	1.53	1.48	257	268	237	115	124
塔藓 <i>Hylocomium Splendens</i>	1.76	1.78	1.58	1.45	1.51	284	267	258	107	107
垂枝藓 <i>Rhytidium rugosum</i>	1.78	1.75	1.52	1.50	1.49	253	283	267	121	104
木藓 <i>Thamnium alopecurum</i>	1.80	1.82	1.60	1.70	1.50	247	275	268	125	117
扁枝藓 <i>Homalia trichomanoides</i>	1.75	1.76	1.57	1.53	1.48	263	267	257	128	126



图 1 苔藓植物 DNA 电泳结果

Fig. 1 The agarose gel electrophoresis of bryophytes DNA extracted by fast extraction and improved CTAB

A. 快速提取法(fast extraction)提取 DNA 电泳结果; B. 改良 CTAB(improved CTAB)法提取 DNA 电泳结果。

泳道 1~7. 毛梳藓、万年藓、树藓、塔藓、垂枝藓、木藓、扁枝藓。

Lane1 to Lane7: *Ptilium crista-castrensis*, *Climacium dendroides*, *Girgensohnia rathenica*, *Hylocomium Splendens*, *Rhytidium rugosum*, *Thamnium alopecurum*, *Homalia trichomanoides*.

增的优化体系, 反应体系为: $MgCl_2$ 1.5 mmol/L; dNTP 200 μ mol/L; 模板 DNA 0.4 ng/ μ L; TaqDNA 聚合酶 1 U; 随机引物 0.5 μ mol/L。反应程序为: 94 $^{\circ}C$ 预变性 3 min, 94 $^{\circ}C$ 1 min, 36 $^{\circ}C$ 45 s, 72 $^{\circ}C$ 1 min, 进行 45 个循环, 最后一次延伸 72 $^{\circ}C$ 5 min, 冷却至 4 $^{\circ}C$ 保存。RAPD 扩增结果见图 2。

从图 2 可以看出: 苔藓植物 RAPD 扩增结果稳定、清晰, 表明 RAPD 扩增体系已建立起来, 这为苔

藓植物中国和东亚特有属种在 DNA 水平上进行遗传多样性的研究奠定了基础。

3 讨 论

DNA 的质量是决定分子生物学实验成败的主要因素之一。近年来, 有关基因组 DNA 提取方法的应用已有许多文献报道(曹同, 2000; 傅荣昭,

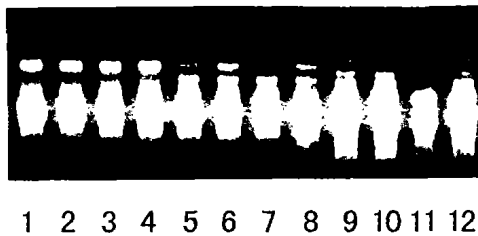


图 2 RAPD 扩增后电泳结果

Fig. 2 The agarose gel electrophoresis of bryophytes RAPD amplification

泳道(Lane)1~2,5~6,9~10:快速提取法(Fast extraction);
泳道(Lane)3~4,7~8,11~12:改良(Improved)CTAB法;
泳道(Lane)1~4:引物(primer)为 S105;泳道(Lane)5~8:
引物(primer)为 S115;泳道(Lane)9~12:引物(primer)为
S119;DNA 模板均为混合模板 Template is mixture.

1994;米景九,1990;刘学春,1995;刘育乐,1990;戴思兰,1996;邹喻苹,1994;Dirlewanger,1994;Stenoien,2000;So,2000;Shaw,2000;Boisselier-Dubayle,1995;王艇,2000;周永红,2000;Kim,1997;Dolyle,1987;Zouhair,2000;Wei,1997)。但是,由于不同植物及同一植物不同组织的结构及生化成分各不相同,而这些结构和成分上的差异对 DNA 的不同提取方法往往会造成不同程度的影响,导致了不同提取方法所得的 DNA 在纯度和质量上的差异。因此,在实际工作中,应根据实验材料的生化成分以及取材时间和材料保存时间长短的特点,筛选或建立适当的提取方法。苔藓植物是一种富含多酚类物质的植物(吴鹏程,1998),由于酚类物质的干扰,使得苔藓植物 DNA 提取较其它植物 DNA 的提取难度大,从本实验结果来看,不同方法提取苔藓植物基因组 DNA 的质量和纯度明显不同。我们在实验中所采用的快速提取法和改良 CTAB 法取得了比较满意的效果,是因为在 CTAB 法的缓冲液中加入了 PVP 和 β -巯基乙醇。PVP 对于抑制多酚氧化酶和细胞色素氧化酶的活性,能起到很好的效果。PVP 是一种重要的稳定剂和抗氧化剂,能有效地减轻杂质的干扰。若提取液中不加 PVP,则难以获得纯白色的 DNA。 β -巯基乙醇具有抗氧化的作用,适当增加其浓度,可以防止氧化褐变,获得较好的 DNA 提取效果。正是这两种物质的作用,才使快速提取法和改良 CTAB 法提取的 DNA 纯度比较高且 DNA 的颜色为纯白色。而在提取缓冲液中未加入这两种试剂的 SDS 法和高盐法提取的 DNA 不同程度地发生了褐变,这是因为在实验过程中苔藓

植物的内源酚类物质被氧化的缘故。从 DNA 纯度、浓度、完整性以及 RAPD 扩增结果来看,快速提取法和改良 CTAB 法是苔藓植物基因组 DNA 提取的适宜方法。

参考文献:

- 吴鹏程. 1998. 苔藓植物生物学[M]. 北京: 科学出版社. 171—177.
- 曹同,沙伟,于晶,等. 2000. 中国苔藓植物多样性及其保育[A]. 2000 年海峡两岸生物多样性及其保育研讨会论文集[C]. 台湾自然科学博物馆,317—329.
- 傅荣昭,孙勇如. 1994. 植物遗传转化技术手册[M]. 北京: 中国科学技术出版社,131—137.
- Boisselier-Dubayle MC, Jubier MF, Lejeune B, *et al.* 1995. Genetic variability in the three subspecies of *Marchantia polymorpha* (Hepaticae)[J]. *Isozymes, RFLP and RAPD markers. Taxon*, **44**: 363—376.
- Dai SL(戴思兰), Chen JY(陈俊愉), Li WB(李文彬), *et al.* 1996. Effect of DNA purification methods on RAPD of 9 kinds of Genus *Dendranthema* (DNA 提纯方法对 9 种菊属植物 RAPD 的影响)[J]. *Acta Horticulturae Sinica* (园艺学报), **23**(2): 169—174.
- Dirlewanger E. 1994. Molecular genetic mapping of peach[J]. *Euphytica*, **77**(1~2): 101—103.
- Dolyle JJ, Dickson EE. 1987. Preservation of plant samples for DNA restriction endonuclease analysis[J]. *Taxon*, **36**(4): 715—722.
- Kim CS. 1997. A simple and rapid method for isolation of high quality genomic DNA from fruit trees and conifers using PVP[J]. *Nucleic Acids Res*, **25**: 1 085—1 086.
- Liu YL(刘育乐), Mi JJ(米景九). 1990. Extraction and identification of DNA of maize and carrot(玉米、胡萝卜 DNA 的提取和鉴定)[J]. *J of Beijing Agricultural University* (北京农业大学学报), **16**(3): 591—594.
- Liu XC(刘学春), Pan CX(潘春欣), Song YZ(宋云枝), *et al.* 1995. A simple procedure of DNA isolation from monocotyledonous plants and its application(一种单子叶植物总 DNA 提取方法的改进及应用)[J]. *J of Shandong Agricultural University* (山东农业大学学报), **26**(4): 491—495.
- Mi JJ(米景九), Lin SK(林书康). 1990. Fast extraction of high molecular weight DNA from plant genome(高分子量植物 DNA 的快速提取)[J]. *J of Beijing Agricultural University* (北京农业大学学报), **16**(3): 580

(下转第 435 页 Continue on page 435)

5. 8S rDNA Sequences(基于 5. 8SrDNA 序列论三白草科的系统发育)[J]. *Acta Botanica Yunnanica* (云南植物研究), **23**(3): 309—312.
- Millington WF, Gunckel JE. 1950. Structure and development of the vegetative shoot of *Liriodendron tulipifera* L. [J]. *Amer J Bot*, **37**: 326—335.
- Quibell CH. 1941. Floral anatomy and morphology of *anemopsis californica*[J]. *Bot Gaz*, **102**(4): 749—758.
- Tucker SC. 1975. Floral development in *Sauveueus cernuus*. 1. Floral initiation and stamen development[J]. *Amer J Bot*, **62**(9): 933—1 007.
- Tucker SC. 1981. Inflorescence and floral development in *Houttuynia cordata* (Saururaceae)[J]. *Amer J Bot*, **68**: 1 017—1 032.
- Wei SC(魏世超), Xu LJ(徐丽君), Zeng Q(曾勤), et al. 1999. Study on inclusion complex of decanoyl acetaldehyde β -cyclodextrin(鱼腥草 β -环糊精包含物的研究)[J]. *Chin Pharm J* (中国药理学杂志), **34**(3): 167—169.
- Wu W(吴 卫), Zheng YL(郑有良), Chen L(陈 黎), et al. 2002a. Isozymes variations among the germplasm resources of *Houttuynia* in Sichuan(川产鱼腥草种质资源的同工酶分析)[J]. *Journal of Chinese Medicinal Materials* (中药材), **25**(10): 695—698.
- Wu W(吴 卫), Zheng YL(郑有良), Chen L(陈 黎), et al. 2002b. RAPD analysis on the germplasm resources of *Herba Houttuyniae* (鱼腥草种质资源的 RAPD 分析)[J]. *Acta Pharmaceutica Sinica* (药理学报), **37**(12): 986—992.
- Wu W(吴 卫), Zheng YL(郑有良), Chen L(陈 黎), et al. 2003. Variations of chromosome number and cytotoxicity of *Houttuynia cordata* Thunb. from China(国产蕺菜的染色体数目变异及核穿壁现象)[J]. *Acta Phytotaxonomica Sinica* (植物分类学报), **41**(3): 245—257.
- Zhang SS(张遂申), Wang Y(王勇). 1982. Preliminary study on the anatomy of Chinese Saururaceae(中国三白草科的解剖学初步研究)[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica* (西北植物研究), **2**(2): 105—111.
- Zhu ZY(祝正银), Zhang SL(张士良). 1998. A new species of *Houttuynia* medicinal plants in Emeishan(峨眉山蕺菜属药用植物一新种)[J]. *Bull Bot Res* (植物研究), **15**(4): 104.
- 583.
- Shaw AJ, Goffinet B. 2000. Molecular evidence of reticulate evolution in the peatmoss (*Sphagnum*), including *S. ehyalinum* sp. nov.[J]. *The Bryophyte*, **103**(2): 357—374.
- So ML, Grolle R. 2000. Description of *Plagiochila detecta* sp. nov. (Hepaticae) from east Asia based on morphological and RAPD evidence[J]. *Nova Hedwigia*, **71**(3~4): 387—393.
- Stenoien HK, Flatberg KI. 2000. Genetic variability in the rare Norwegian peat moss *Sphagnum troendelagicum*[J]. *The Bryophytes*, **103**(4): 794—801.
- Wang T(王 艇), Zhu JM(朱建明), Shu YJ(苏应娟), et al. 2000. PCR-RFLP analysis of *rbcL* gene in some bryophytes(部分苔藓植物 *rbcL* 基因 PCR-RFLP 分析)[J]. *Acta Bot Boreal-Occident Sin* (西北植物学报), **20**(6): 968—973.
- Wei JZ, Campbell WF, Wang RC. 1997. Genetic variability in Russian wild-rye (*Psathyros-tachys juncea*) assessed by RAPD[J]. *Genetic Resources and Crop Evolution*, **44**: 117—125.
- Wei JZ, Wang RC. 1997. Genome-and species-specific markers and genome relationships of diploid perennial species in Triticeae based on RAPD analyses[J]. *Genomy*, **38**: 1 230—1 236.
- Zhou YH(周永红), Zheng YL(郑有良), Yang JL(杨俊良), et al. 2000. Relationships among *Kengyilia* species assessed by RAPD markers(利用 RAPD 分子标记评价仲彬草属的种间关系)[J]. *Acta Phytotaxonomica Sinica* (植物分类学报), **38**(6): 515—521.
- Zou YP(邹喻苹), Wang XQ(汪小全), Lei YD(雷一丁), et al. 1994. Extraction and identification of total DNA in several rare plants and their close relative populations(几种濒危植物及其近缘类群总 DNA 的提取与鉴定)[J]. *Acta Botanica Sinica* (植物学报), **36**(7): 580—586.
- Zouhair R, Corradini P, Defontaine A, et al. 2000. RAPD markers for genetic differentiation of species within *Polytrichum* (Polytrichaceae, Musci)[J]. *Taxon*, **49**: 217—229.

(上接第 428 页 Continue from page 428)