

濒危植物七子花 DNA 的提取及分析

李钧敏, 柯世省, 金则新

(台州师范专科学校生化系, 浙江临海 317000)

摘要: 用不同的方法抽提濒危植物七子花嫩叶 DNA, 利用紫外分光光度法对其质量进行鉴定, 以紫外分光光度法及琼脂糖凝胶电泳-溴化乙锭染色法对其含量进行双重测定, 显示适合七子花 DNA 抽提的最佳方法是改进的 SDS 法, 该法适合 RAPD 分析。用此法对七子花植株不同器官的 DNA 进行抽提, 其含量分别是: 嫩叶 > 枝芽 > 老叶 > 嫩茎 > 老茎。

关键词: 七子花; DNA; 含量

中图分类号: Q946.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2002)06-0499-04

Extraction and determination of DNA from *Heptacodium miconioides*

LI Jun-min, KE Shi-sheng, JIN Ze-xin

(Department of Biology and Chemistry, Taizhou Teachers' College, Linhai 317000, China)

Abstract: DNA was extracted from tender leaves of *Heptacodium miconioides* by using different methods. The quality was determined by UV spectrometers and the quantity was doubly determined by electrophoresis and spectrometers. The best methods for the DNA extraction of *Heptacodium miconioides* was improved SDS method, which was suitable for PCR analysis. DNA was extracted from different organs of *Heptacodium miconioides* using this method. It showed that the maximal DNA content was in tender leaves, and followed by older leaves, twig, older stem, side-bud.

Key words: *Heptacodium miconioides*; DNA; determination

七子花 (*Heptacodium miconioides*) 属忍冬科的单种属植物, 为落叶小乔木, 现资源极少, 列为国家首批二级保护植物^[1]。为了研究七子花的致濒机理, 有必要对其遗传多样性进行分析, 而获得高质量的 DNA 是进行分子生物学研究的前提。植物 DNA 抽提方法多种, 针对不同的植物应采用不同的方法。国内对七子花的研究很少, 尤其是对七子花的生理生化及分子生物学方面的研究未见报道。我们综合文献报道, 结合实验改进, 利用不同的方法抽提七子花嫩叶的 DNA, 从中筛选出最适方法, 所抽提 DNA 适合于 RAPD (random amplification poly-

morphism DNA, 随机扩增多态 DNA) 分析, 并用此方法对七子花植株不同器官的 DNA 进行抽提, 为七子花分子水平遗传多样性研究的进一步开展奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

于 2001 年 5 月下旬, 将分布在浙江省天台山国家森林公园狮子岩坑七子花林林缘的七子花 3 年生幼苗, 分嫩叶 (枝的最上面叶片)、老叶 (枝的最下面

收稿日期: 2001-07-27

作者简介: 李钧敏 (1973-), 女, 浙江临海市人, 硕士, 讲师, 分子生物学专业, 主要从事分子生物学教学与科研工作。

基金项目: 浙江省自然科学基金项目 (399203); 浙江省教委科研计划项目 (1990367)。

叶片)、嫩茎(当年生茎)、老茎(去年生茎)、枝芽 5 个部位进行采集,用湿布包裹,塑料袋封装,立即带回实验室,洗净,晾干,冻于 -70°C 超低温冰箱中,备用。

1.2 植物 DNA 提取方法

1.2.1 方法一 根据刘康德等^[2]的方法改进,将 -70°C 冻存叶片研磨成粉状,取 0.1 g 转入 1.5 mL 离心管中,加入 500 μL 提取缓冲液(3%可溶性 PVP, 20 mmol/L β -巯基乙醇, 20 mmol/L EDTA (pH8.0), 8 000 rpm 离心 5 min, 弃上清, 取沉淀重复洗涤 1 次, 再取沉淀加入 500 μL 裂解缓冲液(100 mmol/L Tris \cdot HCl (pH8.0), 20 mmol/L EDTA (pH8.0), 500 mmol/L NaCl, 1.5% SDS), 65°C 水浴 30 min, 不时轻轻颠倒, 取出加入 500 μL 氯仿/异戊醇(24:1), 颠倒成乳浊状, 10 000 rpm 离心 10 min, 取上清加入 0.6(v/v) 异丙醇, 置 -20°C 冰箱 30 min, 12 000 rpm 离心 10 min, 取沉淀, 溶于 100 μL TE(含 RNase 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 37°C 水浴 1 h, 用等体积的酚/氯仿/异戊醇(25:24:1)、氯仿/异戊醇(24:1)抽提, 取上层加入 1/10(v/v) 3 M NaAc, 加入无水乙醇沉淀, -20°C 冰箱 30 min, 12 000 rpm 离心 10 min, 沉淀用 70% 乙醇洗涤, 晾干后, 溶于 50 μL TE 中, 备用。

1.2.2 方法二 根据姜玲等^[3]方法改进, 取 -70°C 冻存叶片研磨成粉状, 取 0.1 g 转入 1.5 mL 离心管中, 加入 700 μL 提取缓冲液(500 mmol/L NaCl, 100 mmol/L Tris \cdot HCl (pH8.0), 50 mmol/L EDTA (pH8.0), 1% SDS, 20 mmol/L β -巯基乙醇, 1% 可溶性 PVP), 65°C 水浴 30 min, 加入 1/3(v/v) 5 mol/L KAc, 冰上放置 30 min, 10 000 rpm 离心 10 min, 取上清加入等体积氯仿/异戊醇(24:1), 其余同方法 1.2.1。

1.2.3 方法三 按照文献^[4]进行。

1.2.4 方法四 根据尹佟明等^[5]方法改进, 取 -70°C 冻存叶片研磨成粉状, 取 0.1 g 转入 1.5 mL 离心管中, 加入 500 μL 提取缓冲液(100 mmol/L Tris \cdot HCl (pH8.3), 5 mmol/L EDTA (pH8.0), 500 mmol/L NaCl, 1.5% SDS, 350 mmol/L β -巯基乙醇), 65°C 水浴 30 min, 其余同方法 1.2.1。

1.3 DNA 质与量的紫外分光光度法鉴定

用岛津 UV-7401PC 紫外-可见分光光度计进行紫外测定其 A_{230} 、 A_{260} 及 A_{80} , 以 A_{260}/A_{280} 代表 DNA 的纯度与质量, 以 A_{260}/A_{230} 代表 DNA 中污

染杂质的程度^[2]。以 λDNA 为标准品, 以 A_{260} 对 DNA 进行定量。

1.4 DNA 的电泳分析及 DNA 定量

DNA 经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳(1 \times TAE, 含 5 mg/mL 溴化乙锭), 电压 6V/cm, 电泳 2~3 h, 于紫外透射反射分析仪中 302 nm 紫外光透射, Leica 数码相机拍照。电泳图谱经 UTHSCSA ImageTool 软件分析荧光面积, 与标准 DNA 分子量参照物比较定量而得。

1.5 RAPD 扩增反应

采用 15 μL PCR 反应体系, 内含 1 \times PCR 反应缓冲液, 2.5 mM MgCl_2 , 0.1 mM 4 \times dNTP, 3U Tag 酶, 20 ng 模板 DNA, 20 pmol 引物。引物购自上海生工生物工程公司, 其余试剂购自上海华美生物工程公司。

在上海高机公司生产的 SRX-481 型 PCR 仪(6°C 循环水冷却)上进行 PCR 反应, PCR 反应参数为: 94°C 5 min 1 个循环, 再 94°C 1 min, 40°C 1 min, 72°C 2 min 40 个循环; 再 72°C 延伸 5 min。扩增产物取 10 μL 在 1.4% 琼脂糖凝胶(1 \times TAE)上进行电泳分析, 溴化乙锭染色, 于紫外透射反射分析仪观察并 Leica 数码相机拍照。

2 结果与分析

2.1 不同方法抽提七子花嫩叶 DNA 的质量与产量

用不同的方法抽提七子花嫩叶的 DNA, 从 DNA 溶液色泽上来看, 方法一所得的 DNA 基本上是无色的; 而方法四所得 DNA 的色泽为浅褐色, 可能污染有色素或醌类物质, 证明污染有一定的杂质; 方法二所得的 DNA 的色泽为黄褐色, 污染有较多的杂质。各种方法抽提的 DNA 经紫外分光光度法分析结果如表 1 所示, 凝胶电泳结果如图 1 所示。由表 1 可知方法一所抽提 DNA 的纯度较高, 含较少的杂质。从紫外分光光度法与琼脂糖凝胶电泳双重定量可知方法一的得率也较高, 可达 51.7 $\mu\text{g}/\text{g}$ 鲜重, 其次为方法四, 得率为 25.1 $\mu\text{g}/\text{g}$ 鲜重。按文献所述的 CTAB 法进行七子花 DNA 的抽提, 在琼脂糖凝胶电泳上只可见微弱条带的存在。通过增加 CTAB 浓度至 2%, 可以抽提到如图 1 所示的结果。从以上结果分析可知, 方法 1 最适合于七子花 DNA 的提取。另外由图 1 可知, 所抽提的 DNA 的分子量都在 23 kb 以上, 确定是基因组 DNA。

表 1 不同方法抽提七子花嫩叶 DNA 结果分析
Table 1 The results of *Heptacodium miconioides* DNA extracted with different methods

方法 Method	A ₂₆₀	A ₂₈₀	A ₂₃₀	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₃₀	得率(μg/100 mg 鲜重) Yield rate(μg · 100 mg FW ⁻¹)
1	0.110	0.070	0.055	1.67	2.00	51.7
2	0.151	0.097	0.068	1.56	2.22	18.5
3	0.147	0.097	0.073	1.42	2.01	3.1
4	0.183	0.120	0.092	1.53	1.99	25.1

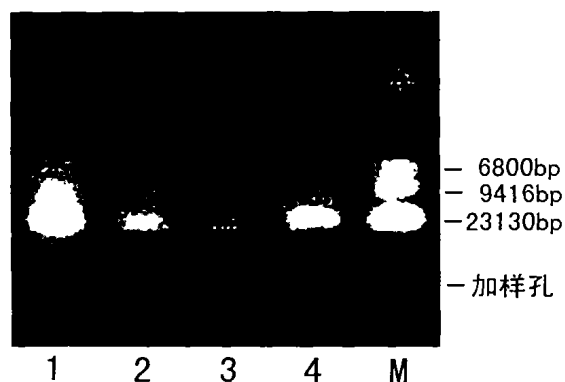


图 1 不同方法抽提七子花 DNA 凝胶电泳结果
Fig. 1 The agarose gel analysis of *Heptacodium miconioides* DNA extracted with different methods

不同方法抽提的七子花 DNA 的 0.8% 琼脂糖凝胶电泳 (含 5 mg/mL 溴乙锭) 鉴定, 1×TAE 缓冲液, 6 V/cm 电压强度。1~4: 方法一至四, 抽提七子花 DNA。

M: λDNA/*Hin* dIII 标准分子量参照物。

Heptacodium miconioides DNA extracted with different methods was determined by 0.8% agarose gel (including 5mg/ml EB), 1×TAE buffer, 6V/cm voltage intensity. 1~4: *Heptacodium miconioides* DNA extracted with different methods listed in Methods. M: λDNA/*Hin* dIII molecular weight standard.

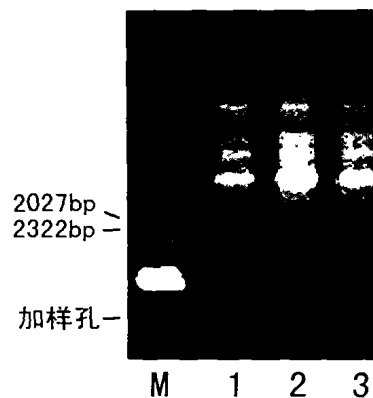


图 2 引物 S302 的 RAPD 图谱

Fig. 2 RAPD profiles generated by primer S302
M: λDNA/*Hin* dIII 标准分子量参照物。1~3: RAPD 反应成分中的 Taq 酶分别为 2U、3U、4U。

M: λDNA/*Hin* dIII molecular weight standard. 1~3: The units of Taq polymerase in RAPD was 2U, 3U and 4U for each.

为了了解方法一所抽提的 DNA 是否适于分子生物学的操作, 我们将所提取的 DNA 用 10 个碱基的随机引物 S302 进行了 PCR 分析, 可得清晰的 RAPD 谱带(图 2)。

表 2 七子花不同器官 DNA 结果比较
Table 2 The results of *Heptacodium miconioides* DNA extracted from different organs

器官 Apparatus	A ₂₆₀	A ₂₈₀	A ₂₃₀	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₃₀	产量(μg/100 mg 鲜重) Yield rate(μg · 100 mg FW ⁻¹)
嫩叶 Tender leaves	0.094	0.054	0.049	1.75	1.92	46.8
老叶 Older leaves	0.038	0.024	0.038	1.58	1.00	10.5
嫩茎 Twig	0.018	0.012	0.018	1.50	1.00	10.3
老茎 Older stem	0.026	0.020	0.038	1.30	0.69	8.1
枝芽 Side-bud	0.034	0.020	0.019	1.70	1.79	14.5

2.2 七子花植株不同器官 DNA 含量的比较

植物不同的器官由于其结构的不同, 所抽提得到的 DNA 的质量与产量都会有一定的影响, 为了了解七子花植株不同器官的 DNA 的含量, 为七子花分子生态学的研究奠定基础, 我们对七子花的嫩叶、老叶、嫩茎、老茎、枝芽的 DNA 进行了抽提与分析, 结果如表 2、图 3 所示。

由表 2 及图 3 可知, 嫩叶抽提的 DNA 产量最高, 质量最好, 适合于进一步的分子生物学操作, 而其余部位所抽提的 DNA 或多或少含有一定的杂质, 尤其是老茎, 其 A₂₆₀/A₂₃₀ 仅有 0.69。从得率上看, 嫩叶 > 枝芽 > 老叶 > 嫩茎 > 老茎, 由于 RAPD 分析等所需 DNA 的量非常少, 因此嫩叶是作为七子花 DNA 提取的一种理想器官。一般地叶片应越

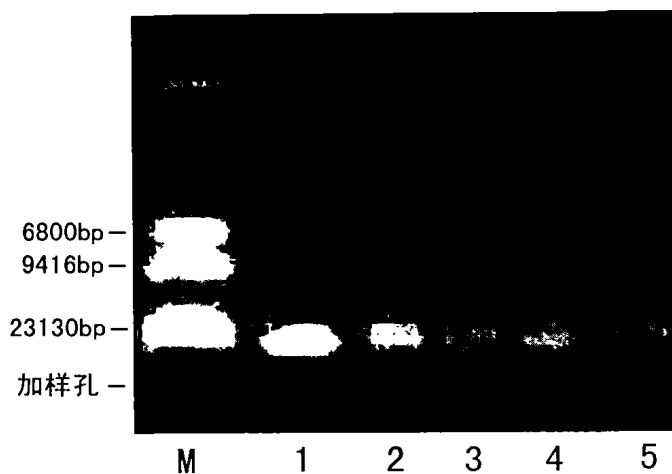


图 3 七子花不同器官 DNA 凝胶电泳结果

Fig. 3 The agarose gel analysis of *Heptacodium miconioides* DNA extracted from different organs

七子花不同器官 DNA。0.8%琼脂糖凝胶电泳(含 5 mg/mL 溴乙锭)鉴定,1×TAE 缓冲液,6 V/cm 电压强度。M: λDNA/*Hind* III 标准分子量参照物。1~5. 七子花的不同器官的 DNA,分别为嫩叶、老叶、嫩茎、老茎、枝芽。

Heptacodium miconioides DNA extracted with different methods was determined by 0.8% agarose gel (including 5 mg/mL EB), 1×TAE buffer, 6 V/cm voltage intensity. M: λDNA/*Hind* III molecular weight standard. 1~5. *Heptacodium miconioides* DNA extracted from different organs, it was tender leaves, older leaves, twig, older stem and side-bud for each.

嫩越好,这样有利于 DNA 的质量的进一步提高。

参考文献:

- [1] 国家环境保护局,中国科学院植物研究所. 中国珍稀濒危保护植物名录(第 1 册)[M]. 北京:科学出版社,1987.
- [2] 刘康德,李建国,彭世清,等. 油梨基因组 DNA 的提取及 RAPD 分析[J]. 热带作物学报,1999, 20(4): 57-61.
- [3] 姜玲,蔡礼鸿. 一种提取银杏中 DNA 的方法[J]. 植物生理学通讯,2000, 36(4): 340-342.
- [4] Clarks MS. 植物分子生物学——实验手册[M]. 北京:高等教育出版社;海德堡:施普林格出版社,1998.
- [5] 尹佟明,韩正敏,黄敏仁,等. 林木 RAPD 分析及实验条件的优化[J]. 南京林业大学学报,1999, 23(4): 21-25.

(上接第 512 页 Continue from page 512)

- [16] Calvin E, Meier Charles C, Grier Dale W. Cole Below-and aboveground N and P use by *Abies amacilis* stand[J]. *Ecology*, 1985, 66(6): 1928-1942.
- [17] Robert L, Sanford JR. Fine root biomass under a tropical forest light gap opening in Costa Rica *Journal of Tropical*[J]. *Ecology*, 1989, 5: 251-256.
- [18] Uta Matthes-Sears, Douglas W. Larson Rooting Characteristics of trees in rock: A study of thwja

Occidentalls on cliff faces Int[J]. *J. Plant Sci.*, 1995, 156(5): 679-686.

- [19] Julie S, Denslow Aaron M, Ellison Robert E. Sanford Treefall gap size effects on above-and belowground Processes in a tropical wet forest[J]. *Journal of Ecology*, 1998, 86: 597-609.
- [20] 孙时轩. 造林学[M]. 北京:中国林业出版社,1992.