

红豆杉属植物三种不同总 DNA 提取方法的分析比较

刘杰^{1,2}, 高连明^{1*}

(1. 中国科学院昆明植物研究所生物多样性与生物地理学重点实验室, 昆明 650204; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要: 红豆杉属植物均为濒危物种,也是国家一级保护植物。以红豆杉属植物叶片为材料,利用三种不同的 DNA 提取方法提取总 DNA,用分光光度计和琼脂糖凝胶电泳方法检测所得总 DNA 的得率和纯度,用 PCR 扩增的方法检测所得总 DNA 的质量,并对三种不同提取方法的结果进行了比较分析。结果表明:CTAB 法提取的 DNA 纯度和得率均较高,可直接用于下游分子生物学实验;用试剂盒提取的总 DNA 质量也很好,纯度高,但得率较低且成本较高;SDS 法提取的总 DNA 质量较差,很难直接用于下游分子生物学实验。同时对影响植物总 DNA 得率和纯度的限制因素进行了讨论,为植物总 DNA 提取方法的改进和选择提供借鉴作用。

关键词: 红豆杉属; DNA 提取方法; PCR 扩增

中图分类号: Q943 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2011)02-0244-06

Comparative analysis of three different methods of total DNA extraction used in *Taxus*

LIU Jie^{1,2}, GAO Lian-Ming^{1*}

(1. Key Laboratory of Biodiversity and Biogeography, Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650204; 2. The Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049)

Abstract: Species of *Taxus* in China are endangered and were listed as the national first-class protected wild plant. In present study, three different methods of total DNA extraction, i. e. SDS, CTAB and DNA extraction Kit (DNeasy Plant Mini Kit), were used to isolate genomic DNA from dried leaf materials of *Taxus*. The total genomic DNA yielded by the three methods were quantified and analyzed by spectrophotometer, agarose gel electrophoresis and PCR reaction respectively. The results of the three methods of DNA extraction were compared and analyzed, which indicated that the CTAB method could yielded relatively pure and high amount total DNA and was highly suited for use directly in downstream applications. The method of DNA extraction using Kit (DNeasy Plant Mini Kit) also could yield high quality total DNA with the highest purity of the DNA comparing to other methods used in this study. However, the relatively lower DNA yield and higher costs of this method might be limited to its wide use. Whereas the SDS method could not yield high quantity of total DNA in most sampled accessions in the present study, which indicated low purity of the yielded DNA of SDS method could not be used in downstream application directly. We also discussed the factors influencing on the total genomic DNA yield and purity, which could help to improve and select the suitable protocol of DNA isolation of plants.

收稿日期: 2010-07-23 修回日期: 2011-01-16

基金项目: 国家自然科学基金(30700042); 云南省自然科学基金(2007C088M); 中国科学院“西部之光”和云南省人才项目(2008PY064) [Supported by the National Natural Science Foundation of China(30700042); Natural Science Foundation of Yunnan Province(2007C088M); the West Light Programme of Chinese Academy of Sciences(9223111W1); the Talent Project of Yunnan Province(2008PY064)]

作者简介: 刘杰(1982-), 男(白族), 云南昌宁人, 在读博士研究生, 主要从事植物保护遗传学和谱系地理学研究。(E-mail) jieliu82@gmail.com.

* 通讯作者: 高连明, 博士, 从事植物系统发育与保护遗传学研究。(E-mail) gaolm@mail.kib.ac.cn.

Key words: *Taxus*; DNA extraction methods; PCR amplification

高质量的总 DNA 是开展保护遗传学研究的基础,也是获得分子遗传学实验成功的关键因素之一(Murray 等,1980),而所提取的植物总 DNA 的纯度是影响 PCR 反应的限制因素之一(Koonjul 等,1999;Xin 等,2003)。因此对植物总 DNA 提取方法的比较分析,改进植物总 DNA 提取方法以获得高质量的 DNA 就显得极为重要。由于植物体内化学成分各异,导致即使在近缘类群中 DNA 提取策略也可能不一样(Matasyoh 等,2008),故有必要针对一些特定类群进行专门的 DNA 提取方法研究。

目前,植物总 DNA 提取的方法很多,主要有 SDS 法、CTAB 法和试剂盒法等。SDS 法是由 Delaporta 等(1983)首先使用,然后几经改进并用于植物总 DNA 的提取(Guillemaut 等,1992;陈莉等,2007;Matasyoh 等,2008)。CTAB 法是最常用的方法之一,Murray 等(1980)用 CTAB 法去除多糖,从植物中快速提取了高分子量的 DNA。后来,Doyle(1987)建立并改进植物总 DNA 的 CTAB 提取法。De la Cruz 等(1997)和谢国文等(2007)基于此方法并进行过多次改进。近年来,随着 DNA 提取技术的不断发展,多种用于 DNA 提取的试剂盒得到了开发。当前 DNA 提取试剂盒主要分为膜吸附法和磁珠法两种。由于用试剂盒(DNeasy Plant Mini Kit)提取 DNA 操作简单、快速,因而得到了广泛的应用,但因试剂盒的价格比较昂贵,提取的总 DNA 的数量有限,因此在群体遗传学研究中受到一定程度的制约。

红豆杉属(*Taxus*)植物是当前提取抗癌药物的重要原料植物,受到很高的关注(Gao 等,2007)。在我国,红豆杉属所有种类均已被列为国家一级保护植物(国家林业局,1999)。由于红豆杉属植物次生代谢产物较多,总 DNA 提取比较困难(Suman 等,1999)。本文利用三种不同方法对红豆杉属不同物种的总 DNA 进行了比较分析,寻找红豆杉属植物总 DNA 提取的最佳方法,用于开展红豆杉属保护遗传学方面的相关研究。同时分析了影响植物总 DNA 提取的主要因素,为野生植物总 DNA 提取方法的改进提供借鉴作用。遵循的主要原则为:可获得高质量的总 DNA(DNA 得率和纯度都高);可直接用于下游的分子生物学研究;降低总 DNA 提取的成本,达到质量与成本的统一。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 植物样品的选择 大多数样品为硅胶干燥的野生红豆杉叶片材料,一个为昆明植物园引种栽培红豆杉的新鲜叶片材料(于使用前 1 h 采集,置于-20 °C 冰箱中备用)。考虑到物种或地域差异可能对实验结果有影响,实验材料包括了红豆杉属的 3 种 2 变种(表 1)。凭证标本存于中国科学院昆明植物研究所标本馆(KUN)。

1.1.2 仪器设备、药品及试剂 实验中使用的主要仪器:冷冻高速离心机;灭菌锅;摇床;PCR 扩增仪;电泳仪;电泳槽;-20 °C 冰箱;制冰机;烘箱等。主要药品试剂:CTAB;SDS;EDTA;Tris;HCl;氯化钠;氯仿;异戊醇;乙醇;异丙醇; β -巯基乙醇;PVP;Taq 酶;dNTP 及 PCR 缓冲液等。提取缓冲液配置:① SDS 提取缓冲液:[1.5% SDS,0.1 mol/L Tris-HCl (pH8.0),0.05 mol/L EDTA·Na₂ (pH8.0),0.5 mol/L NaCl]。② CTAB 提取缓冲液:[4% CTAB,0.1 mol/L Tris-HCl (pH8.0),0.25 mol/L EDTA·Na₂ (pH8.0),1.4 mol/L NaCl,1% PVP-K30]。

1.2 方法

1.2.1 总 DNA 提取方法 (1)SDS 法:本文方法参照 Edwards 等(1991)的方法改进而来。①在液氮中快速研磨硅胶干燥材料成粉末状,迅速称取 0.02 g,转入 2 mL 离心管,并置于冰中。②加入 1 000 μ L 65 °C 预热的 SDS 提取缓冲液,每 1 mL 提取液加 2 μ L β -巯基乙醇。65 °C 水浴保温 30 min,每 5 min 摇动一次,使提取液与样品充分混合。③加入 500 μ L 5 mol/L KAc,剧烈振荡,冰浴保温 20 min。④12 000 r/min 离心 10 min,将上清液转移入一新的 2 mL 离心管中。⑤加入 500 μ L 氯仿-异戊醇(体积比 24:1),摇匀,12 000 r/min 离心 10 min。⑥重复步骤⑤一次。⑦将上清液转移入新的 1.5 mL 离心管中,加入 500 μ L 的异丙醇,-20 °C 沉降 30 min。⑧12 000 r/min 离心 10 min,弃上清液,用 200 μ L 70%乙醇和无水乙醇各洗涤沉降 DNA 两次。⑨加入 100 μ L TE 缓冲液,2 μ L RNase(10 mg/mL),37 °C 恒温箱中保存 2 h,于 4 °C 冰箱中放置 1 d,置于-20 °C 冰箱中备用。

(2)试剂盒法:本研究采用的是德国 QIAGEN 公司生产的 DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany)。DNA 提取步骤按 QIAGEN 公司提供的方法。

(3)CTAB 法:依照 Doyle(1990)的方法改进而来,具体步骤如下:①将研钵洗净烘干。提取总 DNA 前用酒精灼烧研钵,杵子,勺子。65 °C 水浴锅中预热 CTAB 提取液。②选取干净的叶片放于研钵中,加液氮;待材料水份完全损失后,用力研磨使之呈粉末状。迅速称取 0.02 g 材料,置于 2 mL 离心管中,并将离心管置于冰中。③在 2 mL 的离心管中加入 1 000 μ L 预热的 CTAB 提取液和 2 μ L β -巯基乙醇(0.2% V/V),使材料完全分散;置于 65

°C 水浴锅中温浴 1 h,每 10 min 摇匀一次。④将温浴的材料取出置于室温下,待冷却至室温后加 500 μ L 氯仿-异戊醇(体积比为 24:1),摇匀 10 min,离心 10 min(13 000 r/min)。⑤将上清液转移至一新的 2 mL 离心管中。重复步骤④一次。⑥将上清液转移到一新的 1.5 mL 离心管中,加入 70% 体积的异丙醇,沉降 DNA,轻轻颠倒 2~3 次,-20 °C 冰箱中静置 1 h。13 000 r/min 离心 10 min,弃上清液。⑦用 200 μ L 的 70% 的乙醇和无水乙醇各洗 2 次,将离心管放在 37 °C 恒温培养箱中干燥 DNA。⑧待 DNA 干燥后,加 100 μ L TE 溶液和 2 μ L RNase 于 37 °C 烘箱中消化 RNA 2 h,于 4 °C 冰箱中放置 1 d,而后保存于-20 °C 备用。

表 1 红豆杉属植物材料的来源及凭证标本信息

Table 1 Origin and voucher information of *Taxus* samples used in present study

样品编码 Sample code	种类 Taxon	采集地 Locality	凭证标本 Voucher specimen	采集时间 Collection date
KO	<i>T. cuspidata</i>	韩国,月背山	WLS19	2004.09.26
PK	<i>T. fuana</i>	巴基斯坦,NathiaGali	Amin 25004	2005.05.20
GJ	<i>T. wallichiana</i> var. <i>mairiei</i>	广西,金秀	GLM 5986	2005.09.12
FQ	<i>T. wallichiana</i> var. <i>mairiei</i>	福建,福清	ZHXM 506143	2005.07.08
SL	<i>T. wallichiana</i> var. <i>mairiei</i>	山西,陵川	LJ 51060	2005.10.27
HS	<i>T. wallichiana</i> var. <i>mairiei</i>	安徽,黄山	ZHXM 50677	2005.06.28
SP	<i>T. wallichiana</i> var. <i>chinensis</i>	四川,平武	LJ 51005	2005.10.04
FR	<i>T. wallichiana</i> var. <i>wallichiana</i>	云南,昆明植物园	LJ 60001	2006.04.23
DQ	<i>T. wallichiana</i> var. <i>wallichiana</i>	云南,德钦	GLM 24145	2004.04.30
NE	<i>T. wallichiana</i> var. <i>wallichiana</i>	尼泊尔,加德满都	DZL 200508	2005.12.05

1.2.2 DNA 的检测方法 分别采用紫外分光光度计法、琼脂糖凝胶电泳法,检测所得 DNA 的得率和质量;同时对核基因组 ITS 序列和叶绿体的 *trnL-F* 片段,进行 PCR 扩增反应进一步检测所得 DNA 的质量。

(1)紫外分光光度计检测:提取的总 DNA 用美国 Beckman 公司的 DU Series 600 分光光度计进行定量检测。取 4 μ L DNA 样品置于比色皿中加 2 mL ddH₂O,测 DNA 溶液在 260、280 nm 处的光吸收值,记录 A_{260} 、 A_{280} 及其比值(A_{260}/A_{280}),并参考陈莉等(2007)的方法计算总 DNA 得率。

(2)电泳检测:取 5 μ L 总 DNA 与 1 μ L 6 \times Loading Buffer 混匀。用 0.8% 的琼脂糖凝胶(含 0.5 μ g/mL EB)电泳检测。而后用美国 BIO-RAD 公司生产的 Gel Doc 2000 凝胶成像系统检测和照相。电泳缓冲液用 1 \times TAE 溶液(40 mmol/L Tris Base,20 mmol/L Acetic acid,2 mmol/L EDTA),电压 5 V/cm。

(3)总 DNA 的 PCR 扩增:以 ITS 和 *trnL-F* 为目的片断进行 PCR 扩增,ITS 引物使用 White 等(1990)设计的通用引物 ITS4 和 ITS5。*trnL-F* 片段使用通用引物 *trn-c* 和 *trn-f*(Taberlet 等,1991)进行 PCR 扩增。①ITS 的 PCR 扩增:采用 25 μ L 反应体系[16.375 μ L ddH₂O、2.5 μ L 10 \times Buffer、2 μ L dNTP(2.5 μ mol/L)、0.75 μ L Primer(10 μ mol/L)、1.5 μ L DMSO、0.125 μ L Taq Polymerase(5 U/ μ L)和 1 μ L DNA)。反应程序为:94 °C 预变性 4 min,94 °C 变性 1 min,50 °C 退火 1 min 30 s,72 °C 延伸 2 min,34 循环,72 °C 延伸 10 min。②*trnL-F* 的 PCR 扩增:采用 25 μ L 反应体系[17.625 μ L ddH₂O、2.5 μ L 10 \times Buffer、2 μ L dNTP(2.5 μ mol/L)、0.75 μ L Primer(10 μ mol/L)、0.25 μ L BSA(\times 100)、0.125 μ L Taq Polymerase(5 U/ μ L)和 1 μ L DNA]。反应程序为:94 °C 预变性 4 min,94 °C 变性 1 min,50 °C 退火 1 min 30 s,72 °C 延伸 2 min,30 循环,72 °C 延伸 10 min。扩增产物用 1.0% 的琼脂糖

凝胶(含 0.5 μg/mL EB)电泳检测并照相。

2 结果与分析

2.1 总 DNA 的光吸收比值和 DNA 得率

通常将光吸收比值作为衡量总 DNA 纯度的一个重要指标。在三种不同的 DNA 提取方法中,SDS

法所提取的总 DNA 的比值相对较低,介于 1.109~1.919 之间, A_{260}/A_{280} 的平均值为 1.418,只有 KO、FR 和 SL 三个样品的 A_{260}/A_{280} 值近于 1.8。试剂盒法提取的总 DNA 的 A_{260}/A_{280} 值最高,为 1.963~2.126,平均值为 2.022。CTAB 法提取的总 DNA 的 A_{260}/A_{280} 值为 1.639~1.868,平均值为 1.771(表 2)。在总 DNA 的得率方面,SDS 法和试

表 2 三种不同植物总 DNA 提取方法所得结果的比较

Table 2 Comparison of parameters of total DNA isolated by three different methods

样品编码 Code	SDS 法		试剂盒法		CTAB 法	
	吸光值比值 A_{260}/A_{280}	总 DNA 得率 (μg)	吸光值比值 A_{260}/A_{280}	总 DNA 得率 (μg)	吸光值比值 A_{260}/A_{280}	总 DNA 得率 (μg)
KO	1.837	23.00	2.086	16.00	1.781	78.75
PK	1.109	30.00	2.015	17.00	1.682	26.25
GJ	1.225	14.75	1.963	16.00	1.797	57.00
FQ	1.280	9.125	1.987	21.25	1.767	47.25
SL	1.880	56.25	1.986	47.00	1.814	69.00
FR	1.919	77.15	2.054	36.25	1.791	54.25
HS	1.260	4.500	1.973	19.00	1.694	28.00
SP	1.135	3.250	2.126	17.50	1.877	55.25
DQ	1.265	10.75	1.988	17.25	1.639	12.25
NE	1.271	3.125	2.046	34.25	1.868	44.5
Mean(SD)	1.418(0.32)	23.19(24.9)	2.022(0.053)	24.15(11)	1.771(0.078)	47.25(20)

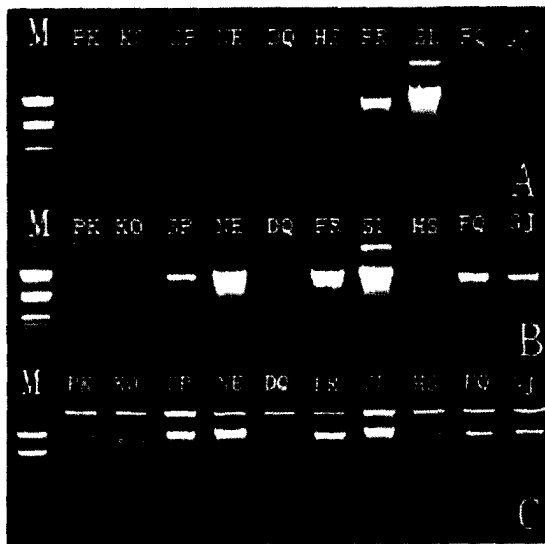


图 1 三种不同提取方法所得总 DNA 的琼脂糖凝胶电泳检测结果

Fig.1 Agarose electrophoresis results of total DNA yielded with three different methods

A: SDS 法; B: 试剂盒法; C: CTAB 法;

样品代码同表 1; M: Markers(λDNA/Hind III)。下同。

试剂盒法比较接近,总 DNA 的平均得率分别为 23.19 μg 和 24.15 μg,而 CTAB 法的总 DNA 得率较高,

平均值为 47.25 μg(表 2)。

2.2 总 DNA 电泳检测结果

三种方法所提取总 DNA 的琼脂糖凝胶电泳检测结果如图 1 所示。图 1 结果表明,不同种类和不同来源的样品其总 DNA 得率存在一定差异;FR 和 SL 在三种不同的提取方法中均能得到较多的总 DNA,而 DQ、PK 和 KO 提取的总 DNA 量则较少。在三种不同的总 DNA 提取方法中,SDS 法提取的总 DNA 效果最差,只有 FR 和 SL 两个样品具有明显的总 DNA 带,而其它样品无清晰的总 DNA 带,表明所提取的总 DNA 量较少。试剂盒法和 CTAB 法所提取的总 DNA 质量较高,每个样品都有清晰的总 DNA 带,并且部分样品(如 NE、FR 和 SL)的带较亮。CTAB 法电泳检测的结果和分光光度计法检测的结果一致。

2.3 PCR 扩增结果

将三种不同提取方法得到的总 DNA 稀释为相同或相近浓度(20~30 ng/μL)用于 PCR 扩增。叶绿体 *trnL-F* 片段和核糖体 ITS 的 PCR 扩增结果见图 2。

叶绿体 *trnL-F* 片段的 PCR 扩增结果表明,用 SDS 法提取的样品中,只有 KO、DQ、FR、SL、HS 五个样品得到了扩增产物,且 HS 和 KO 的扩增条带

较弱。而试剂盒法和 CTAB 法均得到了很好的扩增条带,且试剂盒法提取的总 DNA 的扩增结果最好(图 2:左)。核糖体 ITS 片段的 PCR 扩增结果与 *trnL-F* 片段的扩增结果比较一致。SDS 法的扩增结果较差,只有 SL 和 FR 的扩增条带较强,其它样

品则扩增条带弱或检测不到扩增产物。试剂盒法和 CTAB 法提取的总 DNA 所有样品均得到了 ITS 的扩增产物,但试剂盒法得到部分样品的扩增产物较弱,而 CTAB 法所得扩增产物较好,条带清晰明亮(图 2:右)。

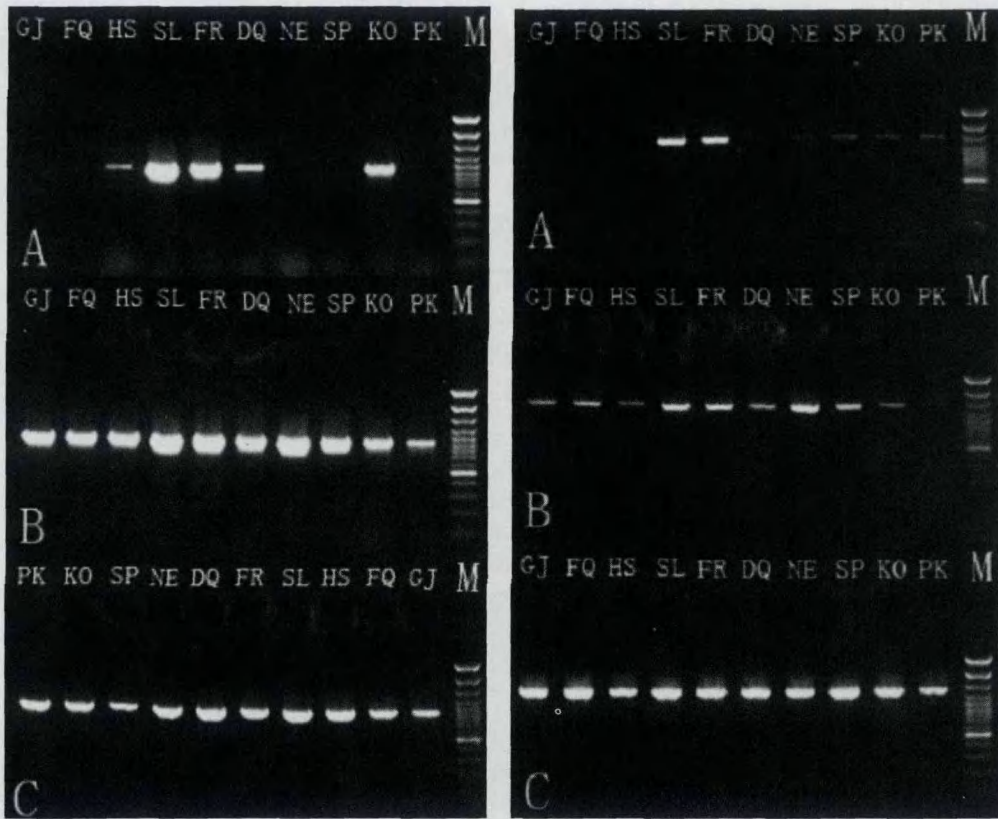


图 2 叶绿体 *trnL-F* 片段(左)和核糖体 ITS 片段(右)的 PCR 扩增结果
Fig. 2 PCR results of chloroplast *trnL-F*(Left) and nuclear ribosome ITS region(Right)

3 结论与讨论

纯的双链 DNA 的 A_{260}/A_{280} 值为 1.8, RNA 的 A_{260}/A_{280} 值为 2.0, 植物总 DNA 的 A_{260}/A_{280} 值在 1.7~1.9 之间通常被认为是纯度较高, 质量较好的 DNA。如果总 DNA 的 A_{260}/A_{280} 值高于 2.0 或低于 1.7 则被认为是含有一定的杂质(如 RNA、蛋白质、多糖、多酚和单宁类物质等), 影响了 DNA 分子的光吸收值而导致的。本文所用的三种植物总 DNA 提取方法中, SDS 方法所得总 DNA 的 A_{260}/A_{280} 值变异较大(1.109~1.919), 平均值为 1.418, 仅有三个样品(KO、SL 和 FR)的光吸收比值在 1.8~2.0 之间, 其余样品都远低于 1.8(表 2), 表明

SDS 方法提取的 DNA 含有较多的杂质, 纯度较低, 直接影响到下游的 PCR 反应。在对 SDS 法提取的 DNA 的 PCR 扩增检测中, 只有 A_{260}/A_{280} 值介于 1.8~2.0 之间的样品得到了较好的 PCR 扩增结果(图 2:A)。试剂盒法提取的总 DNA 纯度最高, 所有样品的 A_{260}/A_{280} 值均在 2.0 左右, 平均值为 2.022, 表明试剂盒法能有效去除 DNA 中的各种杂质, 有利于下游的 PCR 反应, 而其较高的 A_{260}/A_{280} 值可能由于含有较多的 RNA 所致。对用试剂盒法提取的总 DNA 进行 PCR 检测后表明, ITS 和 *trnL-F* 均得到较好的扩增产物(图 2:B)。CTAB 法提取的 DNA 纯度也较高, A_{260}/A_{280} 值在 1.639~1.868 之间, 平均值为 1.771, 表明 CTAB 法可以有效去除 DNA 中的大部分杂质, 如多糖和蛋白等, 对下游的

PCR 反应影响不大,可以得到较理想的扩增产物(图 2:C)。以上分析结果表明总 DNA 的纯度是衡量 DNA 质量的一项重要指标,是影响下游 PCR 扩增反应成败的关键因素之一(Xin 等,2003)。

DNA 得率是衡量 DNA 提取方法优劣的重要参数之一。本文所用的三种植物总 DNA 提取方法中,CTAB 法的得率最高,每 20 mg 植物材料获得的总 DNA 为 12.25~78.75 μg ,平均为 47.25 μg ,约为 SDS 法(23.19)和试剂盒法(24.15)得率的 2 倍(表 2)。虽然根据光吸收值得出的 SDS 法与试剂盒法的得率相近,但琼脂糖凝胶检测结果中,SDS 法只有 FR 和 SL 两个样品有明显的总 DNA 条带,其它样品则很弱或无 DNA 条带,与总 DNA 的得率不一致。而试剂盒法提取的总 DNA 条带的亮度差异较大,但条带的亮度基本上与 DNA 的得率成正比。用 CTAB 法提取的总 DNA 都有明显的条带,且条带的亮度与得率成正比(图 1)。本文总 DNA 的得率是根据 DNA 在 A_{260} 的光吸收值计算而来,如果总 DNA 中含有较多的杂质会影响 DNA 分子在 A_{260} 的光吸收值,导致依此计算出的 DNA 得率不准确,从琼脂糖凝胶检测的结果证实了这一点。也就是说如果总 DNA 的光吸收比值(A_{260}/A_{280})远低于 1.8,仅根据在 A_{260} 的光吸收值得出的总 DNA 得率并不可靠。总 DNA 纯度越高(A_{260}/A_{280} 值在 1.7~1.9 之间),根据 A_{260} 的光吸收值得出的总 DNA 得率越可信,反之不能真实反应 DNA 浓度(得率),还需用其它方法,如凝胶电泳等做进一步检测。

植物总 DNA 得率与植物种类或来源存在一定的关系,不同物种的 DNA 得率也有一定的差异,如须弥红豆杉比密叶红豆杉的得率要高(图 1,表 2)。但是影响总 DNA 得率的主要因素是植物叶片材料所保存时间(在硅胶干燥保存的条件下);保存的时间越长,DNA 降解的越严重,得率越低,保存的时间越短,总 DNA 的得率越高。如在三种提取方法中 DNA 得率都很高的样品 FR 和 SL 的保存时间最短,得率较低的样品 PK、KO 和 DQ 保存的时间则较长。结果表明,用硅胶干燥的植物叶片材料在一年内均能获得较好的总 DNA,如果超过两年,总 DNA 的得率会明显减少,用硅胶干燥的植物材料最好不要超过二年为宜。

试剂盒法提取 DNA 操作简单,快速,得到的总 DNA 纯度较高,可以直接用于下游的 PCR 反应,但成本较 SDS 法和 CTAB 法高很多(以 QIAGEN

Plant Kit 为例)。SDS 法与 CTAB 法的成本较低,但较为费时;SDS 法的得率和纯度都较低,所得总 DNA 不能满足下游的 PCR 反应,而 CTAB 法的得率和纯度均较高,能够直接用于下游的 PCR 反应。从成本的角度看,CTAB 法是一种较为经济的植物总 DNA 的提取方法,尤其适用于经费有限、DNA 提取量大的群体遗传学研究。

通过本文的研究得出以下结论:(1)CTAB 法和试剂盒法均能得到较高质量的总 DNA,从成本的角度考虑,CTAB 法是一较为理想的选择。(2)总 DNA 的纯度与 PCR 反应的扩增结果密切相关,高纯度的 DNA 是 PCR 反应成功与否的关键因素。(3)利用光吸收值计算总 DNA 的得率(或浓度)要小心,纯度高的总 DNA 得到的结果才可信,如果 DNA 纯度较低(光吸收值远低于 1.7),得出的结果不能真实反应 DNA 真实的浓度,还应结合凝胶检测或其它方法进行检测。(4)植物叶片保存的年限(用硅胶干燥的材料)直接影响植物总 DNA 的得率,保存一年内的材料(保存状态良好)均能获得较高得率的 DNA,保存的材料一般不要超过二年为佳,最好的方法是保存总 DNA。(5)植物材料采集后应快速干燥,使保存材料处于良好的保存状态,避免高温和挤压等因素的影响导致材料褐化。(6)植物总 DNA 的纯度与提取方法有关,而与 DNA 的得率和实验材料年限关系不大。

致谢 感谢实验室 Amin Shah 博士,张雪梅博士提供部分实验材料并在实验中给予帮助;杨俊波先生、李洪涛博士、卢金梅博士、冯邦同学等在实验及文章写作中给予指导和帮助。

参考文献:

- 国家林业局,农业部. 1999. 国家重点保护野生植物名录(第一批). http://www.agri.gov.cn/xzsp_web/bszn/t20030709_98831.htm
- Chen L(陈莉),Wei L(魏莉),Zhou T(周童),et al. 2007. Study on isolation methods of genomic DNA in several Chinese herbal medicines(几种中药 DNA 提取方法的比较研究)[J]. *Guihaia* (广西植物),27(1):137-139
- De la Cruz M,Ramirez F,Hernandez H. 1997. DNA isolation and amplification from *Cacti*[J]. *Plant Mol Biol Rep*,15:319-325
- Dellaporta SL,Wood J,Hicks JB. 1983. A plant DNA minipreparation; version II[J]. *Plant Mol Biol Rep*,1:19-21
- Doyle JJ,Doyle JL. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue[J]. *Phytochem Bull*,19:11-15
- Doyle JJ. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue[J]. *Focus*, (下转第 159 页 Continue on page 159)

的也应该是岩生翠柏。

岩生翠柏生长于石灰岩山顶、山脊或陡峭的悬崖边,与其伴生的有华南五针松(*Pinus kwangtungensis*)、短叶黄杉(*Pseudotsuga brevifolia*)、圆果化香(*Platycarya longipes*)、清香木(*Pistacia weinmannifolia*)、青冈(*Cyclobalanopsis glauca*)、岩樟(*Cinnamomum saxatile*)等,从岩生翠柏在越南和广西的现存分布点来看,该种植物以前可能在广西的西南部、西北部和北部的石灰岩地区广泛分布,后来由于人类活动对石灰岩植被的破坏,以及岩生翠柏因材质优良而遭到大肆砍伐,从而形成目前的残存局面。根据刘演等(2002)对翠柏(实为岩生翠柏)的野外资源调查数据和笔者近年来的野外调查数据,按照 IUCN(2001)的评估标准,岩生翠柏在广西被定为濒危等级(EN),需加强保护。岩生翠柏目前零星分布,数量较少,受到的威胁较大,只在环江县分布的居群较集中,个体数量较多(刘演等估算有 2 100 多株),而且居群在木论国家级自然保护区内,因此得到了较好的保护。另外在乐业县的分布点位于雅长兰科植物国家级自然保护区内,也得到了较好的保护。岩生翠柏的发现对翠柏属的系统学研究和中越石灰岩植物区系的研究,以及翠柏属植物的保护都有着重要的科学意义。

致谢 广西植物研究所刘演研究员提供岩生翠

柏野外调查数据,中央研究院生物多样性研究中心彭镜毅博士、古训铭硕士,靖西林业局陆仕念工程师,广西植物研究所盘波、叶晓霞、吴磊参加野外工作,朱运喜先生制作图版,在此谨致诚挚谢意。

参考文献:

- 陈焕镛. 1964. 海南植物志(第 1 卷)[M]. 北京:科学出版社: 212—213
- 傅立国. 1978. 中国植物志(第七卷)[M]. 北京:科学出版社: 38—40
- 贵州植物志编辑委员会. 1982. 贵州植物志(第 1 卷)[M]. 贵阳:贵州人民出版社:23
- 吴征镒. 1986. 云南植物志(第 4 卷)[M]. 北京:科学出版社: 79—80
- 李树刚,梁畴芬. 1991. 广西植物志(第 1 卷)[M]. 南宁:广西科学技术出版社:46
- 刘演,宁世江. 2002. 广西重点保护野生植物资源的现状与评价[J]. 广西科学,9(2):124—132
- 国家林业局. 2009. 中国重点保护野生植物资源调查[M]. 北京:中国林业出版社:46—47
- Huang TC. 1994. Flora of Taiwan(second edition)[M]. (1): 588—591
- Fu LG, Yu YF. 1999. Cupressaceae[M]//Wu CY, Raven PH (eds). Flora of China(4). Beijing: Science Press; St. Louis: Missouri Botanical Garden Press:64—65
- IUCN. 2001. IUCN Red List Categories and Criteria (Version 3.1)[M]. IUCN Publication Service Unit, Gland, Switzerland and Cambridge
- Averyanov Leonid V, Nguyen Tien Hiep, Phan Ke Loc, et al.. 2008. Genus *Calocedrus* (Cupressaceae) in the flora of Vietnam [J]. *Taiwania*, 53(1):11—22
- Edwards K, Johnstone C, Thompson C. 1991. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis[J]. *Nucleic Acids Res*, 19(6):1 349
- Gao LM, Möller M, Zhang XM, et al. 2007. High variation and strong phylogeographic pattern of cpDNA haplotypes in *Taxus wallichiana* complex (Taxaceae) in China and North Vietnam [J]. *Mol Ecol*, 16:4 684—4 698
- Guillemaut P, Maréchal-Drouard L. 1992. Isolation of plant DNA: A fast, inexpensive and reliable method[J]. *Plant Mol Biol Rep*, 10:60—65
- Koonjul PK, Brandt WF, Farrant JM, et al. 1999. Inclusion of polyvinylpyrrolidone in the polymerase chain reaction reverses the inhibitory effects of polyphenolic contamination of RNA[J]. *Nucleic Acids Res*, 27:915—916
- Matasyoh LG, Wachira FN, Kinyua MG, et al. 2008. Leaf storage conditions and genomic DNA isolation efficiency in *Ocimum gratissimum* from Kenya[J]. *Afr J Biotechnol*, 7(5):557—564
- Murray MG, Thompson WF. 1980. Rapid isolation of high molecular weight DNA[J]. *Nucl Acids Res*, 8(19):4 321—4 325
- Suman PS, Khanuja, Ajit K, et al. 1999. Rapid isolation of DNA from dry and fresh samples of plants producing large amounts of secondary metabolites and essential oils[J]. *Plant Mol Biol Rep*, 17:1—7
- Taberlet P, Gielly L, Pautou G, et al. 1991. Universal primers for the amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA [J]. *Plant Mol Biol*, 7:1 105—1 109
- White TJ, Bruns TD, Lee S, et al. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics [M]//Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ (eds). PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications, London: Academic Press:315—322
- Xie GW(谢国文), Zhang JX(张金杏), Zheng YL(郑燕玲), et al. DNA extraction and optimization of ISSR reaction system for rare and endangered plant *Monimopetalum chinense* (珍稀濒危植物永瓣藤 DNA 提取与 ISSR 条件优化)[J]. *Guihaia* (广西植物), 27(6):817—820
- Xin Z, Velten JP, Oliver MJ, et al. 2003. High-throughput DNA extraction method suitable for PCR [J]. *Biotechniques*, 34:820—825

(上接第 249 页 Continue from page 249)

12:13—15