

文章编号: 1674-7054(2015)02-0168-05

石斛属植物基因组 DNA 提取方法的对比

郑云柯 胡翔宇 宋希强 王 健

(海南大学 园艺园林学院/热带作物种质资源保护与开发利用教育部重点实验室, 海南 海口 570228)

摘 要: 笔者使用 6 种 DNA 提取方法提取 7 种含糖量较高的石斛属植物的 DNA, 比较不同方法提取 DNA 的效果。结果表明: 改良 PEX 法和改良 CTAB 法对含有丰富多糖和多酚类的石斛属植物的 DNA 提取效果较好。改良 PEX 法与其他 5 种方法对比, 可以更好地去除多糖类和多酚物质的干扰, 能够满足后续的分子生物学实验的要求。改良 CTAB 法和改良 SDS 法与 CTAB 法和 SDS 法相比, 可获得较高的 DNA 产率, 并且可以较好地去除多糖类杂质的干扰。

关键词: 石斛; 含糖量; DNA 提取方法; 多酚

中图分类号: Q 52

文献标志码: A

由于植物代谢产物(尤其是多糖及其他未知次生代谢产物)种类和含量的不同, 难以找到一种适合所有植物 DNA 提取的方法, 因此不同化学组分的植物需要不同的 DNA 提取方法^[1]。兰科石斛属植物组织富含多糖、多酚及其他代谢产物, 这些物质对植物 DNA 的提取分离是非常不利的^[2]。多酚是一种很强的氧化物质, 在空气中极易氧化, 并能够不可逆地同 DNA 结合, 生成褐色凝胶状物质; 多糖的许多理化性质与 DNA 很相似, 很难将它们分开, 因而在去除多糖的同时 DNA 也被裹挟走了, 造成 DNA 产量减少。在沉淀 DNA 时, 如含有多糖, 多糖会和 DNA 结合在一起产生凝胶状透明沉淀, 难溶于 TE 溶液中, 给实验操作带来不便。这些杂质在含量较高时, 还会抑制限制性内切酶和 DNA 聚合酶活性, 使得提取的 DNA 无法用于 AFLP、RAPD 分析、PCR 和基因克隆等分子生物学研究中^[3-4]。因此要设法除去这些杂质或者尽量减少其影响。提取植物基因组 DNA 的方法很多^[5-6], 目前石斛属植物基因组 DNA 的提取主要为在 CTAB 法和 SDS 法的基础上改良的改良 CTAB 法和改良 SDS 法, 操作中依据研究内容改良部分相应变化^[7-12], 但这些研究均未结合石斛属植物的多糖或其他代谢物质的含量进行分析。笔者以 6 种 DNA 提取方法对 7 种兰科石斛属植物叶片进行基因组 DNA 提取, 检测提取 DNA 的产率、纯度, 主要分析高盐浓度的提取液对除去石斛属植物多糖类杂质的影响和提高 β -巯基乙醇的含量对除去石斛属植物叶片内的多酚物质的影响; 比较 6 种提取方法对提取不同多糖含量的 7 种石斛属植物 DNA 质量的差别, 筛选出最优的石斛属植物叶片基因组 DNA 的提取方法, 为提取高质量的石斛属植物基因组 DNA 及后续的分子生物学实验奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料的采集及处理 石斛属植物叶片采自海南省五指山和海南大学园艺园林学院基地, 每植株采集 2~3 片叶, 放入已编号的封口袋中并立即拿回实验室进行新鲜叶片含糖量的检测和 DNA 的提取。

1.2 叶片含糖量的检测 采用蒽酮比色法检测叶片的含糖量^[12]。称取新鲜叶片 0.1 g 用于 DNA 的提取。

1.3 DNA 提取方法 CTAB 法和 SDS 法参考 Untergasser A^①和 Dellaporta SL^[14]的方法; 改良 CTAB 法和改良 SDS 法与 CTAB 和 SDS 法相比, 改良处分别为 NaCl 含量增加至 $2.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, β -巯基乙醇增加至

收稿日期: 2015-04-01

基金项目: 国家农业公益性行业科研专项(201303117)、国家自然科学基金(31160178)和海南省应用技术研发与示范推广专项(ZDXM2014129)

作者简介: 郑云柯(1990-), 男, 2012 级海南大学园艺园林学院硕士研究生, E-mail: 309196177@qq.com

通信作者: 宋希强(1972-), 男, 教授, 研究方向: 生态学, E-mail: songstrong@hainu.edu.cn

① Untergasser A. "DNA Miniprep using CTAB". Untergasser's Lab, 2008.

4% 增加使用 Tris – 平衡酚进行抽提的步骤; PEX 法参考雷海英的方法^[15]; 改良 PEX 法参考潘宏兵的方法^[12]; 改良 PEX 法与 PEX 法相比, 改良处为 NaCl 含量增加至 $2.5\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ β – 巯基乙醇增加至 4% , 加入 Tris – 平衡酚抽提和氯仿 – 异戊醇抽提的步骤。

1.4 DNA 纯度及产率的检测 采用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳, 120 V 电泳 30 min , 凝胶成像系统观察并拍照。将 DNA 适当稀释后, 用紫外分光光度计观测在紫外光 260 nm 和 280 nm 处的吸收值 A_{260} 和 A_{280} , 并以 A_{260}/A_{280} 的比值鉴定纯度。DNA 浓度(ng) = $A_{260} \times 50 \times \text{稀释倍数} \times \text{原液体积}/1000$; DNA 产率($\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$) = DNA 浓度(ng) / 叶片质量(g)。

1.5 DNA 质量检测 选取较好的方法提取石斛属植物基因组 DNA , 使用 ISSR 分子标记对提取的 DNA 进行扩增验证, 检测该 DNA 是否满足分子研究要求。

2 结果与分析

2.1 7 种石斛属植物的含糖量 7 种石斛属植物的含糖量测定结果见表 1。由表 1 可见, 7 种石斛属植物的含糖量差异显著, 其中, 铁皮石斛、华石斛、钩状石斛、昌江石斛、海南石斛的含糖量较高, 达到 20% 以上。

表 1 7 种石斛属植物及其含糖量
Tab. 1 7 species of *Dendrobium* and their sucrose contents

序号 No	物种 Species	含糖量/($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$) Sugar Content	标准差 Standard deviation	差异显著性 Significance of difference
1	铁皮石斛 <i>Dendrobium officinale</i>	29.16	0.4779	d
2	钩状石斛 <i>Dendrobium aduncum</i>	27.04	0.7915	c
3	鼓槌石斛 <i>Dendrobium chrysotoxum</i>	15.01	0.3439	a
4	华石斛 <i>Dendrobium Sinense</i>	29.03	0.4758	d
5	海南石斛 <i>Dendrobium hainanense</i>	20.45	0.9672	b
6	昌江石斛 <i>Dendrobium changjiangense</i>	26.72	0.8805	c
7	密花石斛 <i>Dendrobium densiflorum</i>	19.95	1.5318	b

2.2 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的提取质量 由图 1 可见, 改良 CTAB 法和改良 SDS 法提取的石斛属植物 DNA 条带较亮, 杂质较少; 而 CTAB 法和 SDS 法提取 DNA 条带较暗, 点样孔杂质较多; 改良 PEX 法点样孔几乎没有杂质, DNA 较纯; PEX 法与改良 PEX 法相比, DNA 条带模糊, 含有蛋白质或者糖类杂质以及 RNA 污染。

2.3 不同方法提取的石斛属植物 DNA 的 A_{260}/A_{280} 值 由图 2 可见, 纯的 DNA 的 A_{260}/A_{280} 比值在 1.8 ~ 2.0 范围, 小于 1.8 说明有酚类和蛋白质污染, 大于 2.0 说明有 RNA 的污染。6 种方法提取的 7 种石斛属植物 DNA 所含杂质差别较大, 同一植物不同方法提取的 DNA 杂质含量差异性显著($P < 0.05$): 采用改良 PEX、改良 CTAB 法和改良 SDS 法提取的 DNA 纯度较高, A_{260}/A_{280} 比值在 1.8 ~ 2.0 范围; 而采用 CTAB 法和 SDS 法提取的 DNA 的 $A_{260}/A_{280} < 1.8$, 有较高的酚类和蛋白质污染; 采取 PEX 法提取的 DNA 的 $A_{260}/A_{280} > 2.0$, 说明有较高的 RNA 污染; 使用改良 PEX 法和改良 CTAB 提取的不同植物的 DNA 杂质含量差异不明显; 其他 4 种方法与改良 PEX 法和改良 CTAB 法对比存在显著差异(图 2)。因此, 采取改良 PEX 法和改良 CTAB 法提取的 DNA 纯度较高, 无酚类和蛋白质以及 RNA 的污染。

2.4 不同方法提取石斛属植物的 DNA 产率 由图 3 可见, 采取改良 PEX 法、改良 CTAB 法和改良 SDS 法提取的植物 DNA , 除铁皮石斛和密花石斛存在差异外, 其他 5 种石斛差异不显著, DNA 产率较高, 说明 3 种方法较适合 7 种石斛属植物 DNA 的提取, 同一植物 CTAB 法、SDS 法和 PEX 法提取的 DNA 产率显著

地低于改良 PEX 法、改良 CTAB 法和改良 SDS 法;不同植物相同 DNA 提取方法相比,采取 CTAB 法、SDS 法和 PEX 法提取的铁皮石斛、华石斛、钩状石斛和昌江石斛的 DNA 产率明显低于其他采取同一方法的石斛属植物的 DNA 产率。

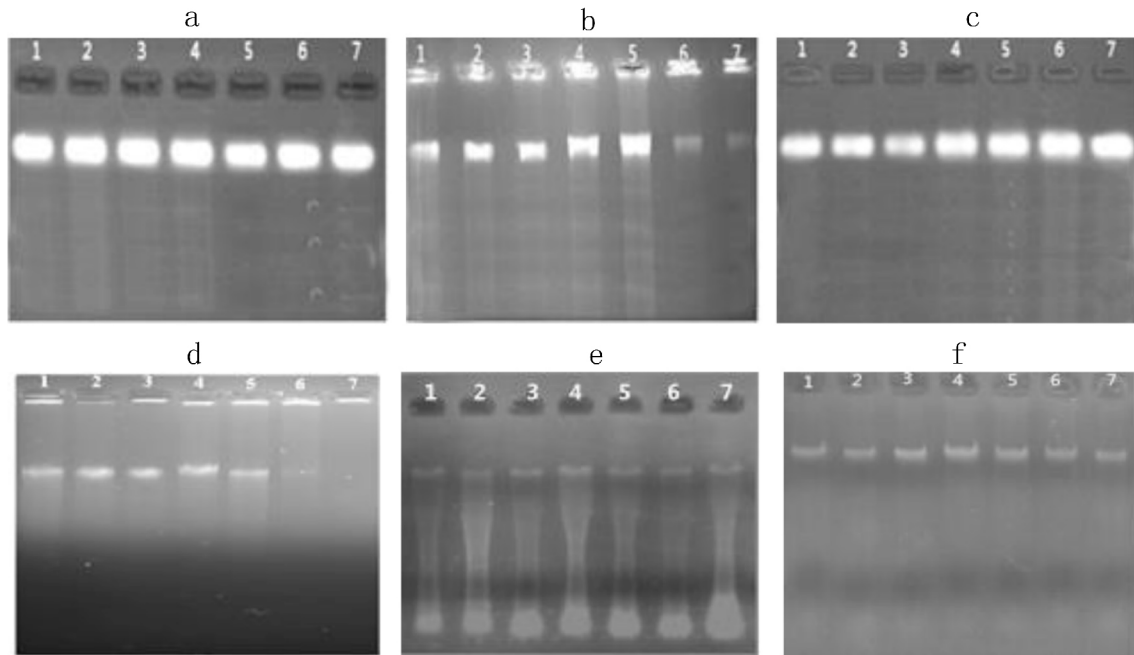


图1 6种方法提取的DNA凝胶电泳图

a. 改良CTAB法; b. CTAB法; c. 改良SDS法; d. SDS法; e. PEX法; f. 改良PEX法; 泳道1~7分别为铁皮石斛、钩状石斛、鼓槌石斛、华石斛、海南石斛、昌江石斛、密花石斛

Fig.1 Gel electrophoresis of DNA extracted with 6 methods

a: CTAB-improved method; b: CTAB method; c: SDS-improved method; d: SDS method; e: PEX method; f: PEX-improved method; lane 1: *Dendrobium officinale*; lane 2: *Dendrobium aduncum*; lane 3: *Dendrobium chrysotoxum*; lane 4: *Dendrobium Sinense*; lane 5: *Dendrobium hainanense*; lane 6: *Dendrobium changjiangense*; lane 7: *Dendrobium densiflorum*

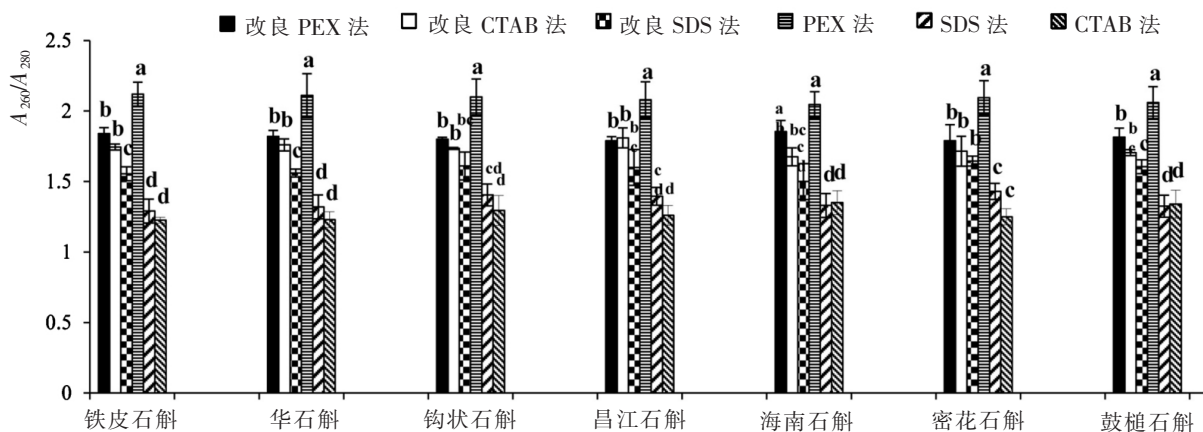


图2 6种方法提取石斛属植物的DNA纯度

Fig.2 The purities of DNA extracted from species of *Dendrobium* with 6 methods

2.5 DNA扩增验证 选用改良PEX法及改良CTAB法对五指山一峰及二峰各6个华石斛个体分别进行基因组DNA提取,并用ISSR引物UBC827(ACACACACACACACG)对其进行扩增验证,PCR产物用1.6%琼脂糖进行凝胶电泳,结果(图4)扩增条带清晰。所以,改良PEX法和改良CTAB法提取的DNA质量良好,可用于后续分子研究实验。

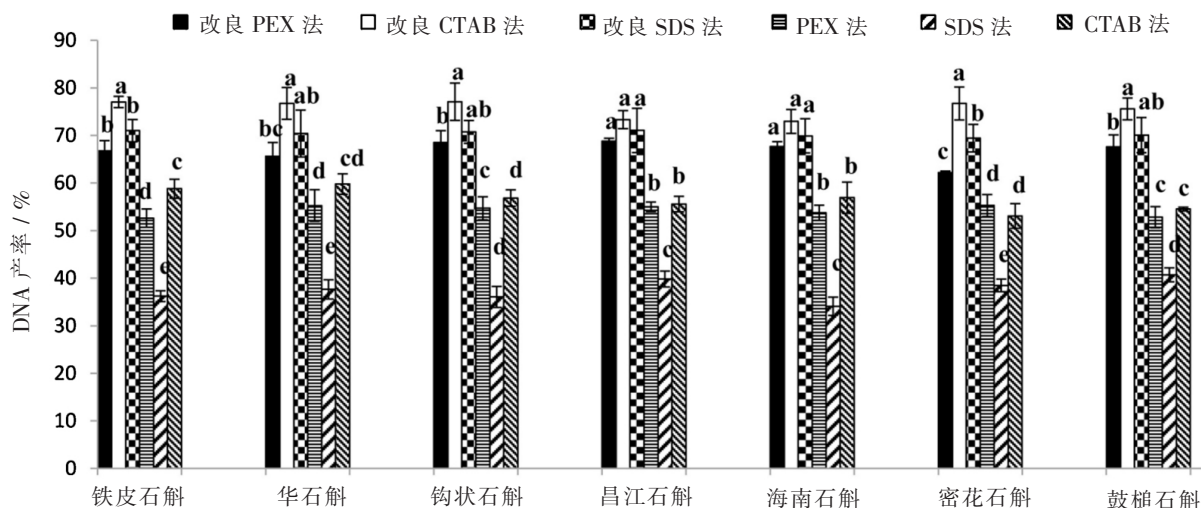


图3 6种方法提取的石斛属植物DNA产率

Fig. 3 The yields of DNA extracted from species of *Dendrobium* with 6 methods

3 讨论

DNA 在细胞中常与蛋白质结合存在,这种蛋白质-核酸复合物是细胞结构的组成之一。因此,在细胞破碎提取和分离核酸时,首要的问题是如何将核蛋白与其他蛋白质区分开,然后进一步把核酸和蛋白质分离。现阶段去除蛋白质的方法主要是氯仿抽提法,对DNA抽提2~3次,但遇到样品杂质较多时,笔者采取增加氯仿的抽提次数来减少杂质的污染。文献[10]的研究结果表明,增加氯仿抽提次数能有效去除核酸中的小分子杂质,但随着抽提次数的增加,也会造成DNA的损失。苯酚对蛋白质的变性效果强于氯仿,其溶解蛋白质能力也强,对核酸酶也具有一定抑制作用,但苯酚的价格比氯仿高^[16]。本研究中,改良CTAB法、改良SDS法和参考潘宏兵的改良PEX法^[12]增加了酚抽提的步骤,经过1次Tris-平衡酚抽提和1次氯仿异戊醇抽提,可最大限度去除蛋白质杂质的污染,得到纯度较高的DNA。

多糖的污染是影响植物DNA纯度最常见的问题。多糖能抑制限制酶、连接酶及DNA聚合酶等酶类的生物活性^[17]。现阶段常用的去除多糖杂质的方法为高盐浓度法。文献[4]的研究结果表明,高盐浓度法可较好地去除植物组织中的多糖杂质。本研究中改良CTAB和改良SDS法将NaCl浓度提高至 $2.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$,对植物均具有良好的去除多糖杂质的效果;而CTAB法、SDS法、PEX法中,大于20%的含糖量的铁皮石斛、华石斛、钩状石斛和昌江石斛出现DNA产率的减少现象。石斛属植物除含有较多的糖类物质之外,还含有较多的酚类物质^[10],目前广泛采取 β -巯基乙醇去除植物组织中的多酚类物质^[18-19]。本研究将改良PEX法、改良CTAB法和改良SDS法中的 β -巯基乙醇的浓度提高至4%,结果显示良好的去除多酚类杂质的效果。PEX法与其他5种提取方法对比,省去Tris-平衡酚抽提和氯仿异戊醇抽提过程,大大加快了DNA提取速度,但是无法去除植物细胞中的多酚、多糖、蛋白质等杂质污染,提取出来的DNA纯度和含量均较低,提取出的DNA无法应用于分子生物学研究,后期还需要进行纯化步骤。改良PEX法和改良CTAB法、均可提取到较高浓度的DNA,但改良PEX法比改良CTAB法和改良SDS法得到的DNA纯度更高。由此可见,改良PEX法和改良CTAB法适用于细胞内含有较多多酚、多糖的植物基因组DNA的提取。

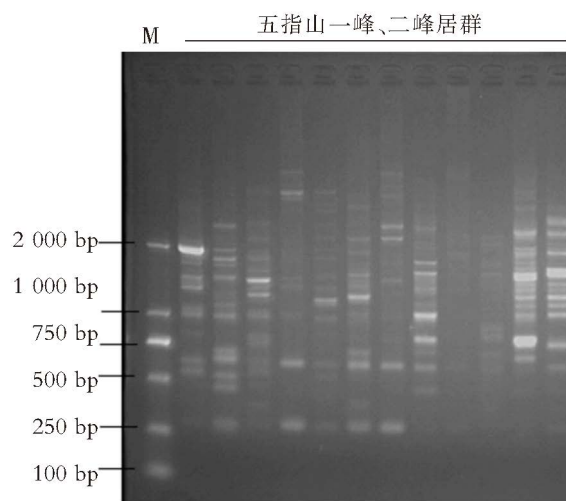


图4 引物UBC827的ISSR-PCR扩增结果

Fig. 4 ISSR profiles generated by primer UBC827

参考文献:

- [1] 陈莉, 魏莉, 周童, 等. 几种中药 DNA 提取方法的比较研究[J]. 广西植物, 2007, 27(1): 137-139.
- [2] 郑珊娇, 吕圭源, 陈素红, 等. 铁皮石斛与市场上常见的几种伪品含糖量的测定[J]. 中华中医药学刊, 2012, 30(1): 146-148.
- [3] FANG G, HAMMAR S, GRUMET R. A quick and inexpensive method for removing polysaccharides from plant genomic DNA [J]. Biofeedback, 1992, 13(1): 52-54.
- [4] PROBERKI S, BAILEY L G, BAUM R B. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components [J]. Plant Molecular Biology Reporter, 1997, 15(1): 8-15.
- [5] COUCH J A, FRITZ P J. Isolation of DNA from plants high in polyphenolics [J]. Plant Molecular Biology Reporter, 1990, 8(1): 8-12.
- [6] 邹喻苹, 汪小全, 雷丁, 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] 包英华, 白音, 谭庆辉, 等. 美花石斛基因组 DNA 提取方法的比较[J]. 热带亚热带植物学报, 2007, 15(2): 147-151.
- [8] 肖鲲, 葛晓军, 李小琼, 等. 改良 CTAB 法提取石斛总 DNA [J]. 贵阳医学院学报, 2007, 32(2): 213-214.
- [9] 彭锐, 宋洪元, 李泉森, 等. 石斛总 DNA 的提取及鉴定[J]. 中国中药杂志, 2003, 28(12): 1129-1131.
- [10] 李静, 尹俊梅, 任羽, 等. SDS 法提取石斛基因组 DNA 的研究[J]. 热带农业科学, 2009, 29(12): 23-26.
- [11] 任羽, 杨光穗, 尹俊梅. 一种简便的石斛 DNA 提取方法[J]. 海南师范学院学报, 2006, 19(4): 360-361.
- [12] 潘宏兵, 任羽, 杨光穗, 等. 石斛 F1 作图群体基因组 DNA 提取研究[J]. 西南农业学报, 2012, 25(6): 2267-2271.
- [13] 李晓旭, 李家政. 优化蒽酮比色法测定甜玉米中可溶性糖的含量[J]. 保鲜与加工, 2013, 13(4): 24-27.
- [14] DELLAPORTA S L, WOOD J, HICKS J B. A plant DNA miniprep: Version II [J]. Plant Molecular Biology Reporter, 1983, 1: 19-21.
- [15] 雷海英, 孙毅, 仪治本, 等. PEX 法提取植物组织 DNA [J]. 广东农业科学, 2010, (5): 178-180.
- [16] 陈永华, 相阳, 张冬林, 等. 4 种不同广玉兰基因组 DNA 提取方法的比较[J]. 中南林业科技大学学报, 2009, 28(3): 45-48.
- [17] 易庆平, 罗正荣, 张青林. 植物总基因组 DNA 提取纯化方法综述[J]. 安徽农业科学, 2007, 35(25): 7789-7791.
- [18] 谭晓风, 漆龙霖, 黄晓光, 等. 山茶属植物叶片的 DNA 抽提[J]. 中南林学院学报, 1999, 19(4): 75-79.
- [19] 陈析丰, 查笑君, 范文杰, 等. 山茶花叶片 DNA 提取及 RAPD 反应体系的研究[J]. 植物研究, 2007, 27(2): 218-223.

Optimized Extraction Method for Genomic DNA from *Dendrobium* Species (Orchidaceae)

ZHENG Yunke, HU Xiangyu, Song Xiqiang, WANG Jian

(College of Horticulture and Landscape Architecture Hainan University/ Ministry of Education Key Laboratory of Protection
and Developmental Utilization of Tropical Crop Germplasm Resources, Haikou 570228, China)

Abstract: Extracting high quality DNA is very important for molecular experiments. *Dendrobium* species under the family Orchidaceae contain more sucrose and polyphenol substances and, it is hence difficult to extract high quality DNA from *Dendrobium* species. Six methods were used to extract DNA from 7 *Dendrobium* species, and compared to develop an optimal extracting method for DNA. Both PEX-improved method and CTAB-improved method had positive effect on DNA extraction from *Dendrobium* spp. which contained more polysaccharides and polyphenols. Compared with other 5 methods, the PEX-improved method removed higher content of polysaccharides and phenolics from *Dendrobium* spp and met the need of molecular biology experiments. The CTAB-improved method and the SDS-improved method removed more content of polysaccharides, and produced higher yield DNA samples as compared with the CTAB method and the SDS method.

Key words: *Dendrobium*; sucrose content; DNA extraction method; polyphenols