

文章编号: 1674-7054(2019)01-0094-05

濒危兰科植物 DNA 的提取方法

潘英文, 张 凌, 王安石, 李佳潼, 谢添伟, 陈施明, 刘福秀, 林明光

(海南出入境检验检疫局 热带植物隔离检疫中心, 海口 570311)

摘 要: 濒危兰科植物组织富含多糖和多酚类物质, 提取高质量的 DNA 较困难。为优化濒危兰科植物基因组 DNA 提取方法, 采用改良 CTAB 法、改良 SDS 法和试剂盒法对多种濒危兰科植物基因组 DNA 进行提取, 对获得的 DNA 质量、浓度和纯度进行比较。结果表明, 用改良 CTAB 法和试剂盒法可有效去除多糖类和多酚类物质的干扰, DNA 提取效果较理想, 改良 SDS 法较差; CTAB 法获得的 DNA 浓度高于试剂盒法, 且后续 PCR 扩增效果也优于试剂盒法。

关键词: 濒危兰科; 基因组 DNA; 提取方法

中图分类号: S 682.31; Q 52

文献标志码: A

DOI: 10.15886/j.cnki.rdswwb.2019.01.016

兰科植物极具观赏价值, 近年来其分子生物学研究越来越多。DNA 的提取是基因克隆、PCR 扩增、分子杂交以及遗传多态性分析等分子生物学研究的基础。按照《濒危野生动植物种国际贸易公约》, 兰科植物大多为濒危植物, 濒危兰科植物约占公约保护植物总数的 90%, 是进出口物种资源查验工作的重要组成部分。由于处于非生育期的许多兰科植物种类间形态差别很小, 仅凭形态特征较难分类。目前, 兰科植物大多采用 DNA 条形码方法如 *atpF-atpH*, *rbcL*, *rpoB*, *rpoC1*, *psbA-trnH*, *matK* 和核糖体 ITS 等序列来加以鉴定^[1-3]。这些方法都需要获得高质量 DNA 才能进行。为了适应相对恶劣的环境, 濒危野生兰科植物细胞壁坚韧含有与抗逆有关的多种化合物, 如多糖、脂类、多酚等次生代谢物, 高质量的基因组 DNA 提取相对困难, 经典的 DNA 提取方法有 CTAB 法和 SDS 法^[8-10]。为探索简便和高效的兰科植物基因组 DNA 提取方法, 笔者对应用较广、成本较低的 CTAB 法和 SDS 法进行适当改良, 并与试剂盒法一起对濒危兰科植物基因组 DNA 进行提取, 比较不同提取方法的效果及优缺点, 旨在筛选出提取兰科植物基因组 DNA 的有效方法, 为开展兰科植物后续的分子生物学研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料 供试材料来自海南出入境检验检疫局热带植物隔离检疫中心种质资源圃保存的濒危兰科植物, 分别是金钗石斛 *Dendrobium nobile*、卷萼兜兰 *Paphiopedilum appletonianum*、春兰 *Cymbidium goeringii* var. *goeringii*、矮万代 *Vanda pumila*、云南火焰兰 *Renanthera imschootiana*、小兰屿蝴蝶兰 *Phalaenopsis equestris*, 选取植株叶片为材料, 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放入 -70 °C 冰箱内贮存。

1.2 DNA 提取方法

1.2.1 改良 CTAB 法 取新鲜叶片 100 mg, 置于研钵中, 加入液氮, 研磨成粉, 将粉末转至 2 mL 的离心

收稿日期: 2018-12-05

修回日期: 2019-01-12

基金项目: 国家质量监督检验检疫总局科技计划项目(2016IK095); 海南省自然科学基金项目(317293)

作者简介: 潘英文(1981-), 男, 高级农艺师。研究方向: 植物检疫与生物技术。E-mail: pyw910@163.com

通信作者: 林明光(1962-), 男, 研究员, 博士。研究方向: 植物检疫与热带花卉研究。E-mail: linmingguang@yahoo.com

管中,再加入 800 μL 的 CTAB 提取缓冲液(50 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl, 20 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA, 700 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl, $\varphi = 1\%$ β - 巯基乙醇, $\varphi = 2\%$ CTAB, pH8.0); 混匀后 65 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 30 ~ 40 min, 振荡混匀 2 ~ 3 次, 放置冷却至室温, 加入等体积的 $V_{\text{酚}} : V_{\text{氯仿}} : V_{\text{异戊醇}} = 25 : 24 : 1$ 振荡混匀, 4 $^{\circ}\text{C}$, 12 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min; 取上清液转入一新离心管, 加入 1/10 倍体积的 3 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaAc 和等体积的无水乙醇, 混匀, 冰上放置 10 ~ 15 min, 4 $^{\circ}\text{C}$, 12 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min; 弃上清, 沉淀用 $\varphi = 70\%$ 乙醇洗涤 2 次, 加入 800 μL TE 溶解后, 加入等体积的 $V_{\text{酚}} : V_{\text{氯仿}} : V_{\text{异戊醇}} = 25 : 24 : 1$ 振荡混匀, 4 $^{\circ}\text{C}$, 12 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min; 取上清液转入一新离心管, 加入等体积的 $V_{\text{氯仿}} : V_{\text{异戊醇}} = 24 : 1$ 振荡混匀, 4 $^{\circ}\text{C}$, 12 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min; 取上清液转入一新离心管, 加入 1/10 倍体积的 3 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaAc 和等体积的无水乙醇混匀, 冰上放置 10 ~ 15 min, 4 $^{\circ}\text{C}$, 12 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min; 弃上清, 沉淀用 70% 乙醇洗涤 2 次, 室温静置 2 ~ 3 min 晾干, 加入 100 μL TE 或 ddH₂O 溶解, 加入 10 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ RNase 液 2 μL 混匀, 37 $^{\circ}\text{C}$ 保温 30 min, 置于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存。

1.2.2 改良 SDS 法 取新鲜叶片 100 mg, 置于研钵中, 加入液氮, 研磨成粉, 将粉末转至 2 mL 的离心管中, 再加入 800 μL 的 SDS 提取缓冲液(100 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl, 50 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA, 500 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl, $\varphi = 1\%$ β - 巯基乙醇, $\varphi = 3\%$ SDS, pH8.0); 混匀后 65 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 10 min; 加 1/5 体积的 5 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ KAc 于冰上放置 30 min, 4 $^{\circ}\text{C}$, 13 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min; 取上清液入一新离心管, 加入等体积的 $V_{\text{酚}} : V_{\text{氯仿}} : V_{\text{异戊醇}} = 25 : 24 : 1$ 振荡混匀, 4 $^{\circ}\text{C}$, 12 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min; 取上清液转入一新离心管, 加入等体积的 $V_{\text{氯仿}} : V_{\text{异戊醇}} = 24 : 1$ 振荡混匀, 4 $^{\circ}\text{C}$, 12 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min; 取上清液转入一新离心管, 加入 0.6 倍体积的异丙醇混匀, 冰上放置 10 ~ 15 min, 4 $^{\circ}\text{C}$, 12 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min; 弃上清, 沉淀用 $\varphi = 70\%$ 乙醇洗涤 2 次, 室温静置 2 ~ 3 min 晾干, 加入 100 μL TE 或 ddH₂O 溶解, 加入 10 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ RNase 液 2 μL 混匀, 37 $^{\circ}\text{C}$ 保温 30 min, 置于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存。

1.2.3 试剂盒法 使用 TIANGEN 植物基因组 DNA 提取试剂盒, 按照试剂盒操作手册提取 DNA。

1.3 DNA 检测

1.3.1 DNA 浓度与纯度检测 使用 Thermo Nanodrop 2000 核酸分析仪测定 3 种方法提取的 DNA 样品 230, 260, 280 nm 处的光吸收值, 根据 OD_{260}/OD_{280} 和 OD_{260}/OD_{230} 的比值确定 DNA 纯度。

1.3.2 琼脂糖凝胶电泳检测 取 5 μL 样品 DNA 加上 Loading buffer 后, 使用 $w = 1\%$ 琼脂糖凝胶, 在 $0.5 \times \text{TBE}$ 缓冲液中, 3 $\text{V} \cdot \text{cm}^{-1}$ 恒压电泳 1 ~ 2 h (Power PAC3000 电泳仪, BIO-RAD)。根据电泳结果检测 DNA 质量。

1.3.3 PCR 扩增检测 根据第 3 届条形码国际学术大会上建议的兰科植物 DNA 条形码片段, 选择用通用引物 ITS 进行 PCR 扩增^[1-12], 以上述 3 种方法提取的 DNA 样品为模板进行 PCR 反应及电泳检测, 以检测提取的 DNA 中是否有抑制 PCR 反应的成分存在。PCR 反应体系: 10 μL 2 $\times$ PrimeStar Max premix (TaKaRa), 0.4 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 引物, 6 ~ 10 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 模板 DNA, 用 ddH₂O 补充至 20 μL 。反应程序: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 8 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 45 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 6 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 以 DL2000 marker (TaKaRa) 为参照, 凝胶成像系统下观察并拍照。

2 结果与分析

2.1 DNA 浓度与纯度检测 由表 1 可看出, 试剂盒法提取 DNA 质量最好, OD_{260}/OD_{280} 为 1.8 ~ 1.9, $OD_{260}/OD_{230} > 2$, 表示蛋白质、RNA、盐类、有机溶剂等杂质污染很少, DNA 纯度较高, 但 DNA 浓度明显低于其他 2 种方法。CTAB 法提取 DNA 质量较好, DNA 浓度较高, OD_{260}/OD_{280} 为 1.7 ~ 1.9, 说明蛋白质及 RNA 污染较少, 但 OD_{260}/OD_{230} 大多低于 2.0, 表示存在少量盐类或有机溶剂等其他杂质污染。SDS 法提取的 DNA 虽然浓度较高, 但 DNA 质量较差, OD_{260}/OD_{280} 均低于 1.8, OD_{260}/OD_{230} 均低于 2.0, 表示 DNA 纯度较低, 存在蛋白质、RNA、盐类、有机溶剂等杂质污染现象。

表 1 3 种方法提取基因组 DNA 质量及浓度检测

Tab. 1 The quality and concentration of DNA extracted by using 3 methods

物种 Species	OD_{260}/OD_{280}			OD_{260}/OD_{230}			DNA/($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)		
	CTAB 法	SDS 法	试剂盒法	CTAB 法	SDS 法	试剂盒法	CTAB 法	SDS 法	试剂盒法
金钗石斛 <i>D. nobile</i>	1.78	1.68	1.81	2.06	1.85	2.18	531.5	443.0	163.6
卷萼兜兰 <i>P. appletonianum</i>	1.76	1.57	1.88	1.93	1.87	2.10	487.8	477.4	153.9
春兰 <i>C. goeringii</i> var. <i>goeringii</i>	1.82	1.53	1.85	1.98	1.72	2.16	615.2	510.8	165.4
矮万代 <i>V. pumila</i>	1.75	1.63	1.87	1.96	1.70	2.15	577.0	393.6	159.8
云南火焰兰 <i>R. imschootiana</i>	1.73	1.56	1.90	1.99	1.85	2.09	566.7	405.6	168.6
小兰屿蝴蝶兰 <i>P. equestris</i>	1.81	1.61	1.89	1.92	1.90	2.12	590.5	485.5	155.7

2.2 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的提取质量 由图 1 可看出,CTAB 法提取的 DNA 电泳后样品孔干净,杂质含量较低,DNA 条带清晰完整,亮度较高,有轻微拖尾现象;SDS 法提取的 DNA 电泳后样品孔残留部分杂质,杂质较多,DNA 条带较模糊,亮度较低,且有较严重的拖尾现象,DNA 存在降解情况;试剂盒法提取的 DNA 样品孔干净无杂质,DNA 电泳条带清晰,无明显拖尾现象,但亮度较低。

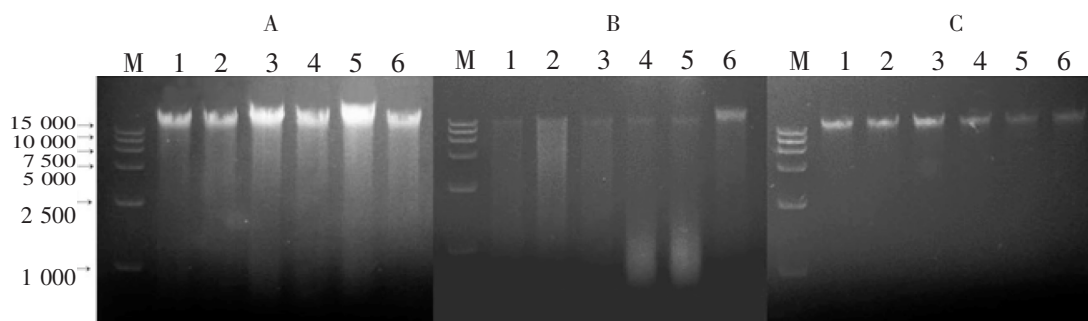


图 1 3 种方法提取兰科植物基因组 DNA 凝胶电泳检测图

A. 改良 CTAB 法; B. 改良 SDS 法; C. 试剂盒法; 1. 金钗石斛; 2. 卷萼兜兰; 3. 春兰; 4. 矮万代; 5. 云南火焰兰; 6. 小兰屿蝴蝶兰

Fig. 1 Gel electrophoresis of DNA extracted by using 3 methods

A. Improved CTAB method; B. Improved SDS method; C. Kit method; 1. *Dendrobium nobile*; 2. *Paphiopedilum appletonianum*; 3. *Cymbidium goeringii* var. *goeringii*; 4. *Vanda pumila*; 5. *Renanthera imschootiana*; 6. *Phalaenopsis equestris*

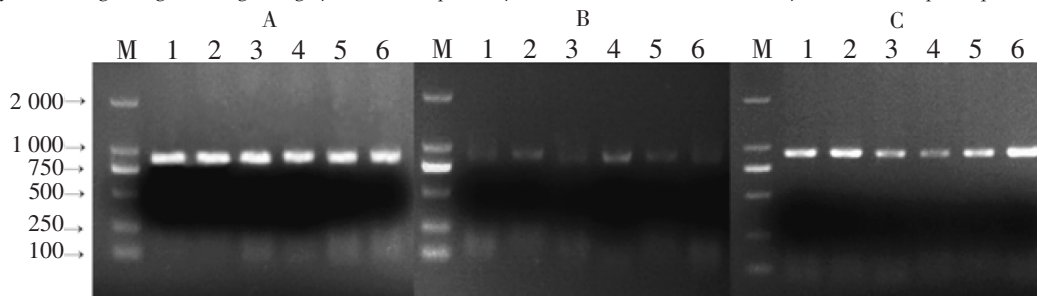


图 2 ITS 引物的 PCR 扩增结果

A. 改良 CTAB 法; B. 改良 SDS 法; C. 试剂盒法; 1. 金钗石斛; 2. 卷萼兜兰; 3. 春兰; 4. 矮万代; 5. 云南火焰兰; 6. 小兰屿蝴蝶兰

Fig. 2 PCR amplification with primer ITS

A. Improved CTAB method; B. Improved SDS method; C. Kit method; 1. *Dendrobium nobile*; 2. *Paphiopedilum appletonianum*; 3. *Cymbidium goeringii* var. *goeringii*; 4. *Vanda pumila*; 5. *Renanthera imschootiana*; 6. *Phalaenopsis equestris*

2.3 PCR 扩增检测 DNA 的提取质量 由图 2 可看出,采用 CTAB 法和试剂盒法提取 DNA 作为模板进行 PCR 扩增反应得到的条带清晰,亮度较高,稳定性好;SDS 法提取 DNA 作为模板进行 PCR 扩增反应得到的条带亮度模糊,亮度相对较低,稳定性大大降低;试剂盒法和 CTAB 法提取 DNA 作为模板进行 PCR 扩增效果均获得理想带型,能满足 DNA 条形码检测鉴定的实验要求。

3 讨论

濒危兰科植物大多数含有丰富的多糖多酚物质,DNA 提取过程中难于分离,尤其多糖的污染是影响植物 DNA 纯度的主要问题,多糖的理化性质与 DNA 相似,容易与 DNA 结合产生难溶于水的凝胶状透明沉淀影响 DNA 沉淀,多糖能抑制限制性核酸内切酶、连接酶及 DNA 聚合酶等酶类的生物活性,影响后续的分子生物学研究。本试验采用 SDS 法提取的 DNA 可用于一般的 PCR 反应,只能满足常规的分子生物学实验要求;CTAB 法和试剂盒法所提 DNA 质量较高,但试剂盒法成本较高,且每次提取 DNA 量较少,不适用大量提取 DNA,在原 CTAB 法基础上进行改良,加入高盐法去除杂质,可防止沉淀过程中酚化合物氧化降解以及电离化作用,以保证提取的 DNA 质量,同时通过 2 步沉淀法,减少蛋白质、多糖等其它杂质的影响,可提高 DNA 纯度。改良 CTAB 法提取 DNA 浓度高,质量较好,操作简单,相比试剂盒法成本低廉。目前,有关兰科植物 DNA 提取方法仅局限于春兰、卡特兰、石斛兰和蕙兰等特定的原生种或杂交种中^[6-10],主要针对兰科特定类群的特有属,大多数没有涉及到多糖或多酚类物质含量丰富的类群,改良 CTAB 法解决了兰科植物 DNA 提取方法适用性差的问题,可广泛应用于兰科植物分子生物学研究。

参考文献:

- [1] CHEN S L, YAO H, HAN J P, et al. Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species [J]. PLoS One, 2010(5): 1 - 8.
- [2] 任军方, 杨郡, 李海文, 等. 兰科植物 DNA 条形码的研究进展及展望 [J]. 现代园艺, 2015(5): 11 - 12.
- [3] 李金璐, 王硕, 于婧, 等. 一种改良的植物 DNA 提取方法 [J]. 植物学报, 2013, 48(1): 72 - 78.
- [4] 严廷良, 许惠秋, 张颖, 等. 改良 CTAB 法对提取玫瑰 DNA 质量的影响 [J]. 海南师范大学学报(自然科学版), 2014, 27(4): 412 - 415.
- [5] 任羽, 杨光穗, 尹俊梅, 等. 一种简便的石斛 DNA 提取方法 [J]. 海南师范学院学报(自然科学版), 2006, 19(4): 359 - 361.
- [6] 胡薇, 孙端, 潘晓华, 等. 建兰 DNA 的快速提取 [J]. 福建师范大学学报(自然科学版), 2014, 20(1): 118 - 120.
- [7] 李小玲, 华智锐. 商洛野生蕙兰基因组 DNA 提取方法的比较 [J]. 浙江农业科学, 2014(1): 73 - 76.
- [8] 郑云柯, 胡翔宇, 宋希强, 等. 石斛属植物基因组 DNA 提取方法的对比 [J]. 热带生物学报, 2015, 6(2): 168 - 172.
- [9] 司更花, 朱国鹏. 五唇兰基因组 DNA 提取方法的优化 [J]. 热带林业, 2012, 40(2): 37 - 39.
- [10] 刘红艳. 卡特兰的 DNA 提取方法研究 [D]. 北京: 中国林业科学研究院, 2014.
- [11] RENAUD L, MICHELLE VANDER BANK, DIEGO B, et al. DNA barcoding the floras of biodiversity hotspots [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 2008, 105(8): 2923 - 2928.
- [12] DOUZERY E J P, PRIDGEON A M, KORES P, et al. Molecular Phylogenetics of *Dioscoreaceae* (Orchidaceae): A Contribution from Nuclear Ribosomal ITS Sequences [J]. American Journal of Botany, 1999, 86(6): 887 - 899.

Extraction of Genome DNA from Endangered Orchid Plants

PAN Yingwen, ZHANG Ling, WANG Anshi, LI Jiatong, XIE Tianwei,

CHEN Shiming, LIU Fuxiu, LIN Mingguang

(Post-Entry Quarantine Station for Tropical Plants, Hainan Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Haikou, Hainan 570311, China)

Abstract: Endangered Orchid plants contain polysaccharides and polyphenols, and it is difficult to extract high-quality DNA from these plants. Three extraction methods, i. e. improved CTAB method, improved SDS method and Kit method, were used to extract genomic DNA of endangered Orchid plants (*Dendrobium nobile*, *Paphiopedilum appletonianum*, *Cymbidium goeringii* var. *goeringii*, *Vanda pumila*, *Renanthera imschootiana* and *Phalaenopsis equestris*), and the extracted DNA was compared in quality, concentration and purity to optimize DNA extraction methods for these orchid plants. The results showed that the improved CTAB method and Kit method removed effectively polysaccharides and polyphenols from the Orchidaceae plants and had a higher positive effect on DNA extraction, while the improved SDS method was poorest in DNA extraction. The DNA extracted by the improved CTAB method was higher in concentration than that by the Kit method, and its follow-up PCR amplification was better as well.

Keywords: Endangered Orchidaceae; genomic DNA; extraction methods

(责任编辑: 潘学峰)

(上接第 82 页)

Effective Evaluation of Open Space of Urban Street System

CHEN Long, LIN Shiping

(Institute of Tropical Agriculture and Forestry, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China)

Abstract: In order to quantitatively evaluate the actual utilization efficiency of urban street open space, the concept of open space utilization value and open space value was introduced. In this concept the index factor assignment score was used to evaluate the actual use value of open space (M), and a multivariate linear regression model is constructed based on the Hedonic model to calculate the open space value of the sample (α), so that the actual utilization efficiency of the open space is obtained, that is, $\eta = M/\alpha$. In order to judge whether the open space is inefficient, the optimal utilization efficiency of the open space has to be calculated. The government reference and questionnaire survey were used to determine the standard reference sample. The Jurenfang Community were determined as the standard reference sample, based on which the actual utilization efficiency standards of the community were calculated and compared with that of the other sample communities under study to judge the inefficiency of the open space. If the actual utilization efficiency of the open space in a sample is higher than that of the standard sample, the open space in the sample is fully utilized. Conversely, if the actual utilization efficiency of the open space in a sample is lower than that in the standard sample the actual utilization efficiency of the open space in the sample is in a course of inefficient use. The research results showed that the actual utilization efficiency of the open space in the sample Gaodeng Community was greater than that in the standard sample Jurenfang Community, indicating that the open space in the Gaodeng community was fully utilized. The actual utilization efficiency of the open space in Aihua Community and Wanfu Community was less than that in the standard sample, suggesting these two communities were had inefficient actual utilization efficiency in the open space.

Keywords: Urban street; evaluation based on Hedonic model; multiple linear regression model; actual utilization efficiency; open space

(责任编辑: 叶 静)