

鹤望兰基因组 DNA 的提取方法*

洪付祥 徐金森** 熊玲媛 蔡邦平¹ 王振忠¹ 陈睦传

(厦门大学细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室 厦门 361005)

(¹ 厦门市万石植物园 厦门 361003)

摘要 由于鹤望兰组织内含有大量多糖类及多酚类物质,严重干扰 DNA 的抽提,利用常规的 SDS 法、CTAB 法和高盐低 pH 值法都难以抽提出高质量的鹤望兰基因组 DNA。本文报道了在进行若干预处理之后,再用常规的 SDS、CTAB、SDS 裂解的高盐低 pH 值法和 CTAB 裂解的高盐低 pH 值法提取基因组 DNA 的改进方法。根据外观、琼脂糖凝胶电泳检测、 $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 比值的测定、限制性酶切反应、PCR 扩增的结果表明,用改进方法提取的基因组 DNA 无论在纯度上还是在完整性上都比常规方法要好。其中改进 SDS 裂解的高盐低 pH 值法是提取鹤望兰基因组 DNA 的最好方法。图 3 表 2 参 18

关键词 鹤望兰;DNA 提取;改进方法;限制性内切酶酶切

CLC Q943.2 : Q949.718.320.3

MODIFIED METHODS FOR DNA EXTRACTION FROM *STRELITZIA REGINAE* BANKS*

HONG Fuxiang, XU Jinsen**, XIONG Lingyuan, CAI Bangping¹, WANG Zhenzhong¹ & CHEN Muchuan

(Key Laboratory for Cell Biology and Tumor Cell Engineering, Xiamen University, Xiamen, Fujian 361005, China)

(¹ Xiamen Wanshi Botanical Garden, Xiamen, Fujian 361003, China)

Abstract *Strelitzia reginae* Banks is rich in polysaccharides, polyphenols, and other secondary metabolites. Therefore, it is difficult to obtain high quality and quantity of genomic DNA from its tissues by conventional methods such as SDS method, CTAB method, and low pH medium with high salts method (LPHS). Modified procedures for DNA extraction from *S. reginae* are reported based on the above-mentioned conventional methods, including the pretreatment of cell separation reagent to collect the nuclei and the use of β -mercaptoethanol, polyvinylpyrrolidone (PVP) to inhibit the oxidization, and activated charcoal to clear the secondary metabolites, then followed by the original above-mentioned methods to extract the total genomic DNA. The results showed that the modified methods were better than the original ones in terms of purity and totality of the genomic DNA. Among them, the LPHS by SDS cleavage is the best in quality, cost and simplicity of extraction. Fig 3, Tab 2, Ref 18

Keywords *Strelitzia reginae*; DNA extraction; modified method; endonuclease

CLC Q943.2 : Q949.718.320.3

鹤望兰(*Strelitzia reginae* Banks),又名天堂鸟花、极乐鸟花,是旅人蕉科鹤望兰属多年生草本植物^[1]。原产南部非洲,现在世界上许多亚热带和暖温带地区均有栽培,在国内外很受欢迎,是一种极有经济价值

和观赏价值的花卉,素有鲜切花之王的美誉^[2]。自 70 年代初期以来,美国、荷兰、以色列、澳大利亚、南非、瑞典、中国等国就广泛开展了对鹤望兰的研究^[2~8],但多集中于鹤望兰的栽培管理、育种繁殖及病虫害防治等方面。鹤望兰基因组 DNA 提取是在分子水平上对其进行系统分析与研究的基础性工作。由于鹤望兰是热带的单子叶多年生草本植物,组织体内含有许多

收稿日期:2001-10-15 接受日期:2001-12-07

* 厦门市园林局科技项目(K9902) Supported by the Sci-tech Project of Gardens Bureau in Xiamen, Fujian, China

** 通讯作者 Corresponding author (E-mail: jsxu@jingxian.xmu.edu.cn)

多酚、多糖类物质^[9], 严重干扰 DNA 的抽提. 经验证明, 利用常规的 SDS 法^[10]、CTAB 法^[11] 和高盐低 pH 值法^[12] 都难以抽提出高质量的鹤望兰基因组 DNA. 因此, 本研究在常规的 SDS 法、CTAB 法和高盐低 pH 值法的基础上进行了技术改进, 并就不同的改进方法之间进行了比较.

1 材料与方法

1.1 实验材料

取自厦门市万石植物园的鹤望兰嫩叶的基部延伸区组织.

1.2 主要药品与试剂

除 SDS、CTAB、*EcoR* I、RNaseA、Primer S10、dNTP、醋酸钾、*Taq* 聚合酶、DNA 分子量标准物等购自上海生工生物工程技术有限公司之外, 在改进方法中所用的主要试剂如预处理液 I [50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0; 15% (m/v) 蔗糖; 2% (m/v) β -巯基乙醇; 50 mmol/L EDTA, pH 8.0; 0.5 mol/L NaCl; 2% (m/v) PVP (聚乙烯吡咯烷酮)] 和预处理液 II [10 mmol/L Tris-HCl, pH 7.6; 10% (m/v) 蔗糖; 1.5% (m/v) β -巯基乙醇] 等均在本室内自行配制. 另外, CTAB 法、SDS 法以及 SDS 裂解的高盐低 pH 法等所用的试剂可参见文献[10]及[11].

1.3 实验方法

1.3.1 鹤望兰基因组 DNA 提取方法的改进 称 0.5 g 的鹤望兰幼嫩组织, 剪碎后放入经 -20 °C 的冰箱中预冷的研钵中, 加液氮研磨成细粉; 向粉碎的组织中加入 3 mL 的预处理液 I 后继续磨成糊状, 转入到 5 mL 的离心管中. 15 000 r/min 离心 10 min 后去上清液留沉淀, 加入 2 mL 的预处理液 II, 混匀, 重复此步骤 2~3 次, 直到液体不粘为止, 收集细胞核和细胞器, 加入 2 mg 的活性炭粉末以吸附色素等杂质, 待用.

1.3.2 SDS 裂解的高盐低 pH 值法的改进 加入 2 mL 的 SDS 裂解液(65 °C 预热), 充分混匀后, 置 65 °C 水浴 30~60 min, 不时混匀, 冷却至室温, 10 000 r/min 离心 10 min 后, 于上清液中加入相当于上清液 2/3 体积的醋酸钾溶液(2.5 mol/L, pH 4.8), 混匀, 置 0 °C 放置 30 min, 10 000 r/min 离心 10 min, 上清液中加入相当于上清液 0.6 体积预冷(-20 °C)的异丙醇沉淀核酸, 充分混匀, 于 4 °C 下, 7 500 r/min 离心 5 min, 用 75% 乙醇洗涤沉淀物, 干燥, 用尽可能少的 TE 缓冲液重悬.

1.3.3 CTAB 裂解的高盐低 pH 值法的改进 加

入 2 mL 的 CTAB 裂解液(65 °C 预热), 充分混匀后, 65 °C 水浴 30~60 min, 不时混匀, 冷却至室温, 10 000 r/min 离心 10 min 后, 于上清液中加入相当于上清液 2/3 体积的醋酸钾溶液(2.5 mol/L, pH 4.8), 混匀, 置 0 °C 放置 30 min, 10 000 r/min 离心 10 min, 上清液中加入相当于上清液 0.6 体积预冷(-20 °C)的异丙醇沉淀核酸, 充分混匀, 于 4 °C 下, 7 500 r/min 离心 5 min, 用 75% 乙醇洗涤沉淀物, 干燥, 用尽可能少的 TE 缓冲液重悬.

另外, 还将预处理过的材料用常规的 CTAB 法^[11] 及 SDS^[10] 法继续提取 DNA. 以上 4 种方法提取出 DNA 样品后, 各加入 5 μ L RNaseA (10 mg/mL), 37 °C 保温 2 h, 氯仿:异戊醇(24:1)抽提一次, 再用乙醇沉淀, 将所得的 DNA 最终溶于 200 μ L 的 TE 缓冲液中.

1.3.4 DNA 产量及质量鉴定 取 DNA 样品稀释成 25 倍后在紫外分光光度计(Beckman UN-240)上测定 $D_{260\text{ nm}}$ 和 $D_{280\text{ nm}}$, 并计算其比值. 另取 3 μ L 的 DNA 在 0.8% 的含有 EB(溴化乙锭)琼脂糖凝胶上电泳, 以 λ DNA/*Hind* III 为标记. 胶块在紫外线透射仪(WFH-120)上观察后, 经多色凝胶成像系统(Bio-Rad Fluor-S)扫描存档、比较. 为进行限制性内切酶分析, 在 10 μ L 反应体积中, 分别加进 DNA 样品 5 μ g, 限制性内切酶 *EcoR* I 5 U, 37 °C, 处理 2 h 后, 取 5 μ L 的样品在 0.8% 的含有 EB 琼脂糖凝胶上电泳, 以 λ DNA/*Hind* III 为标记. 如前所述进行紫外线下的观察及扫描成像比较.

1.3.5 PCR 扩增的 RAPD 分析 将提取的样品 DNA 稀释成 20 ng/ μ L 作为模板, 用 10 个碱基的随机引物 S10(序列号: 5'AGGGAACGAG 3')进行 PCR 扩增. 采用 20 μ L PCR 反应体系, 内含: 2 μ L Buffer, 2 μ L MgCl₂ (25 mmol/L), 0.5 μ L dNTP (10 mmol/L each), 1 U *Taq* 酶, 1 μ L primer, 2 μ L 模板, 加水至 20 μ L. 反应程序为: 94 °C, 变性 3 min; 94 °C, 1 min, 37 °C, 1 min, 72 °C, 1 min, 45 个循环; 72 °C, 延伸 5 min. 在含有 EB 的 1.5% 琼脂糖凝胶分离扩增产物, 以 λ DNA/*EcoR* I + *Hind* III 为标记. 如前所述进行紫外线下的观察及扫描成像比较.

2 结果和分析

2.1 样品的纯度、产量和完整性

4 种方法提取的 DNA 外观上均为纯白色沉淀, 无褐变现象, 说明有效地抑制了多酚氧化酶的氧化. 如表 1 所示, 4 种改进方法提取的鹤望兰 DNA 溶液 $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 均在 1.7~1.9 左右, 它们的紫外吸收曲

线为典型的核酸吸收特征. 基本没有蛋白质的污染, 即这几种方法在除蛋白质方面效果较好. 就产量而言,改进的 CTAB 裂解的高盐低 pH 值法最高,改进 SDS 法次之,改进 CTAB 法最低. 就 DNA 的完整性而言,从 DNA 样品琼脂糖凝胶电泳检测结果来看(图 1),所提取的 DNA 均在 23 kb 以上,改进 SDS 法和改

进 CTAB 裂解的高盐低 pH 值法提取的 DNA 电泳带都有弥散状态,说明 DNA 降解较为严重,改进 CTAB 法提取的 DNA 有轻微的降解现象,而改进 SDS 裂解的高盐低 pH 值法提取的 DNA 基本无降解现象,DNA 的完整性最好.

表 1 改进的 DNA 提取方法所得到的鹤望兰 DNA 质量及产量
Tab 1 Quality and yield of the genomic DNA from *S. reginae* with modified methods

样品编号 Sample No.	DNA 提取方法 Methods of DNA extraction	$D_{260\text{ nm}}$	$D_{280\text{ nm}}$	$D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$	DNA 产量 Yield [$\text{m}/\mu\text{g}(500\text{ mg})^{-1}$]
1	改进 CTAB 法 Modified CTAB method	0.2131	0.1123	1.897	53.27
2	改进 SDS 法 Modified SDS method	0.4990	0.2597	1.910	124.15
3	改进 SDS 裂解的高盐低 pH 值法 LPHS by SDS cleavage	0.3207	0.1713	1.870	80.18
4	改进 CTAB 裂解的高盐低 pH 值法 LPHS by CTAB cleavage	0.5836	0.3373	1.730	145.90

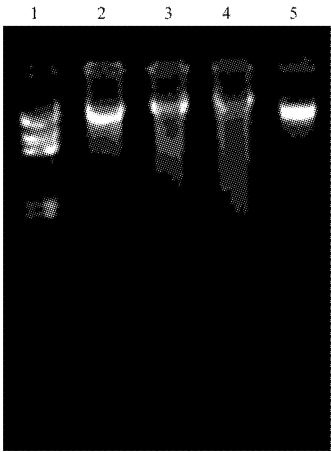


图 1 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 样品
Fig 1 0.8% agarose gel electrophoresis of DNA samples
1: λ DNA/*Hind* III (23130,9416,6557,2322,2027bp);
2:改进 CTAB 法 Modified CTAB method;
3:改进 CTAB 裂解的高盐低 pH 值法 LPHS by CTAB cleavage;
4:改进 SDS 法 Modified SDS method;
5:改进 SDS 裂解的高盐低 pH 值法 LPHS by SDS cleavage

2.2 去除多糖及其它次生代谢产物的效果比较

由于其粘连特性,DNA 中多糖的含量可通过观察样品电泳效果得知. 点样孔较亮,DNA 电泳速度较慢的样品中所含多糖较多,反之则较少^[13]. 从 4 个 DNA 样品琼脂糖凝胶电泳检测结果(图 1)可知,四种提取方法对于去除鹤望兰组织中的多糖具有不同的效果:改进 SDS 裂解的高盐低 pH 值法去多糖效果最佳,改进 CTAB 法稍为次之,改进 CTAB 裂解的高盐低 pH 值法又次之,改进 SDS 法在去除多糖方面效果最差.

由于多糖对限制性内切酶活性具有抑制作用,因

此用限制性内切酶 *Eco*R I 对 4 种方法所得样品分别进行处理,其结果同样也可反映 4 种方法对于去除鹤望兰组织中的多糖的不同结果. DNA 的酶解程度可通过观察未被降解的、电泳后处于凝胶顶端的大分子量 DAN 的多少来加以判断. 其结果见图 2,改进 SDS 裂解的高盐低 pH 值法所得的 DNA 被降解得最彻底,改进 CTAB 法和改进 CTAB 裂解的高盐低 pH 值法依次次之,改进的 SDS 法最差(酶解程度可由凝胶末端未被降解的大分子 DNA 的量确定),这一结果与图 1 琼脂糖凝胶电泳结果可相互印证.

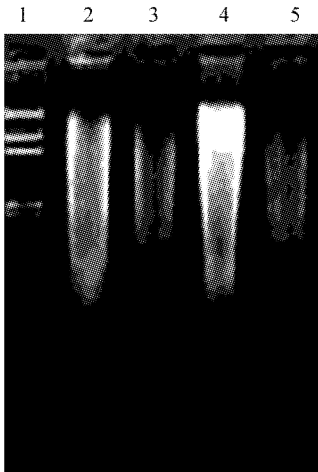


图 2 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测限制性内切酶降解 DNA 样品
Fig 2 0.8% agarose gel electrophoresis of DNA samples after restriction digests
1: λ DNA/*Hind* III (23130,9416,6557,2322,2027bp);
2:改进 CTAB 裂解的高盐低 pH 值法 LPHS by CTAB cleavage;
3:改进 CTAB 法 Modified CTAB method;
4:改进 SDS 法 Modified SDS method;
5:改进 SDS 裂解的高盐低 pH 值法 LPHS by SDS cleavage

表 2 四种改进方法所得 DNA 样品的各项指标及优缺点比较*
Tab 2 Comparison of DNA samples obtained by four modified methods*

DNA 提取方法 Methods	DNA 产量 Yield	DNA 质量 Quality	去多糖能力 Removal of polysaccharides	操作性 Simpleness	备注 Remark
改进 CTAB 法 Modified CTAB method	IV	II	II	IV	去多糖、多酚等次生代谢物质效果较好, DNA 的质量也较好, 但程序繁杂, 产量低。 Better quality but lower output of DNA. Better in the removal of polysaccharides. Trivial in extraction procedures.
改进 SDS 法 Modified SDS method	II	IV	IV	III	产量较高, 但去多糖、多酚等次生代谢物质效果最差, DNA 的质量也最差, 不适合用于含有大量多糖的植物基因组 DNA 的提取。 Higher output but worst quality of DNA. The worst in the removal of polysaccharides.
改进 SDS 裂解的高盐低 pH 值法 LPHS by SDS cleavage	III	I	I	I	DNA 完整性和质量最高, 去多糖、多酚的效果最好, 且试剂便宜, 操作简单. 是提取鹤望兰基因组 DNA 的最好办法。 The best quality of DNA, the best in the removal of polysaccharides. Lower cost and simple procedures.
改进 CTAB 裂解的高盐低 pH 值法 LPHS by CTAB cleavage	I	III	III	I	产量最高, 操作简单, 但质量一般, 也能满足一般分子生物学上面的要求。 The highest output but ordinary quality of DNA. Simple procedures.

* I、II、III、IV 为比较等级, I 为最佳, II 次之, III 又次之, IV 为最差 I, II, III and IV stand for gradations, I stands for the best and IV the worst

2.3 RAPD 反应结果比较

从图 3 可知, 1 号反应效果较 2、3、4 号反应明显较差; 而且在重复实验时发现 1 号 DNA 作为模板进行 PCR 反应的稳定性较差. 这说明用改进 SDS 法提取鹤望兰 DNA 中含有高浓度的多糖和其它杂质对 *Taq* 聚合酶的活性有一定的抑制作用, 而且对 PCR 反应体系的稳定性也有一定程度的影响. 其它 3 种改进方法提取的 DNA 样品均能满足 RAPD 反应的要求, 且重复性和稳定性较好.

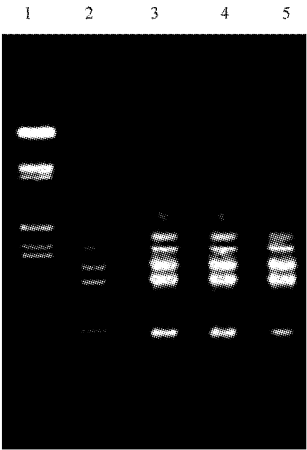


图 3 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测以样品 DNA 为模板进行 RAPD 反应的产物

Fig 3 1.5% agarose gel electrophoresis of RAPD products with DNA samples as templates

1: λ DNA/*Eco*R I + *Hind* III (21226, 5148, 3530, 2027, 1584, 1375bp);
2: 改进 SDS 法 Modified SDS method;
3: 改进 SDS 裂解的高盐低 pH 值法 LPHS by SDS cleavage;
4: 改进 CTAB 法 Modified CTAB method;
5: 改进 CTAB 裂解的高盐低 pH 值法 LPHS by CTAB cleavage

3 讨论

获取高质量的 DNA 是分子生物学研究的基础. 提取 DNA 过程中, 多糖、蛋白质、RNA 及多酚等其它物质含量越少, 获得 DNA 片段越大, 试验结果越可靠, 重复性越好. 有些植物组织细胞内含有大量的多酚、多糖及其它次生代谢产物, 如果处理不当就会和蛋白质和核酸发生不可逆的结合, 并严重抑制内切酶和 DNA 聚合酶的作用, 进而影响后续的各步操作分析^[14~15]. 其中多糖成分是影响植物 DNA 纯度的最常见的问题, 这类碳水化合物可以抑制多种生物学酶类如聚合酶、连接酶和限制性内切酶等的活性, 而且对 DNA 的浓缩也有影响. 分子生物学家称这类含有大量影响高质量 DNA 分离的次生代谢物质的植物为顽拗植物 (recalcitrant plant)^[16], 例如棉花、马铃薯、核桃、马尾松、龙眼、荔枝等某些本木植物^[17]. 鹤望兰是热带多年生单子叶植物, 体内含有大量的多糖、多酚类物质, 也属于顽拗植物的一种.

适合于不同种顽拗植物的 DNA 提取方法是不相同的. 本研究应用常规的 CTAB 法、SDS 法、高盐低 pH 法都不能从鹤望兰组织中提取出高质量的 DNA, 后又应用了常规的改进方法, 如在裂解过程中使用还原剂 β -巯基乙醇、PVP 及活性炭来抑制氧化和增强吸附能力, 但这些改进方法的效果还是不好. 主要原因就是受到大量多糖、多酚等次生代谢产物的干扰. 根据这些次生代谢产物主要分布于细胞质和液泡中这一特点, 设计了在 DNA 提取之前破碎细胞以除去细

胞质中的杂质,收集细胞核和细胞器等预处理,再用 CTAB 法、SDS 法、CTAB 裂解的高盐低 pH 值法、SDS 裂解的高盐低 pH 值法进行提取,结果都能提取出 DNA,并且都比常规的方法提取的 DNA 效果要好.改进方法不仅除去了细胞质中的大量多糖、多酚类物质,而且也除去细胞中绝大部分的 RNA.但这 4 种改进方法提取 DNA 效果之间还是有较大差别的(表 2).改进 SDS 裂解的高盐低 pH 值法除产量稍低外,其它各项指标都是最佳的,是提取鹤望兰基因组的最好方法.高盐低 pH 值法^[12]是 Pierre 和 Haurence 于 1992 发展的一种比较简单方便的 DNA 提取方法,已成功地应用于很多植物基因组 DNA 提取,如银杉、矮牧丹、南川升麻、杉木、甜菊等^[18].CTAB 法也是一种比较有效的植物基因组 DNA 提取方法,已用于很多种植物基因组 DNA 的提取.本研究用改进 CTAB 法也能提取出鹤望兰组织的高质量 DNA,但各项指标都没有 SDS 裂解的高盐低 pH 值法好.本实验还试用改进 CTAB 裂解的高盐低 pH 值法提取鹤望兰的基因组 DNA,能得到较大量的 DNA,但质量没有改进 CTAB 法和改进 SDS 裂解的高盐低 pH 值法好.

利用本改进方法提取鹤望兰基因组 DNA 时,应注意加液氮研磨鹤望兰组织时一定要充分研磨,研磨程度和 DNA 的产量有一定的相关性.为尽量减少损失,可先用细枪头移去下层液体,再稍离心吸取上清液.适当增加 PVP 和 β -巯基乙醇浓度,可以防止氧化褐变,获得较好的 DNA 提取效果.

References

- 1 陈良正,杨琼芬,钱绍仙.名贵观赏花卉—鹤望兰.云南农业科技,1998, **6**: 38~44
- 2 王振忠,王瑛纯,张真珍,谭忠奇.鹤望兰人工授粉研究初报.见:中国植物学会植物园分会编辑委员会编.中国植物园(第3集).北京:中国农业科技出版社,1996. 111~115
- 3 Meira Ziv, Halevy AH. Control of oxidative browning and *in vitro* propagation of *Strelitzia reginea*. *HortScience*, 1983, **18** (4): 434~436
- 4 van de Pol PA, van Hell TF. Vegetative propagation of *Strelitzia reginea*. *Acta Horticult*, 1998, **226**(II): 509~517
- 5 Rowley JR, Skvarla JJ, Chissio WF. Exine oncoform zone and intine structure in *Ravenala* and *Phenakospermum* and early wall development in *Strelitzia* and *Phenakospermum* (*Strelitziaceae*) based on aborted microspores. *Rev Palaeobot & Palynol*, 1997, **98** (3~4): 293~301
- 6 Vonk Noordegraaf, Vander Krogt. Produktie en bloeivan *Strelitzia*. *Vakbl Bloemisterij*, 1976, **31**(49): 18~19
- 7 Dyer RA. Vegetative multiplication of *Strelitzia reginea* and its allies. *Bothalia*, 1972, **10**: 575~578
- 8 毛龙生. 鹤望兰及其栽培技术. 花卉, 1996, **16** (4): 407~411
- 9 Holscher D, Schneider B. Phenalenones from *Strelitzia reginea*. *Nat Prod*, 2000, **63** (7): 1027~1028
- 10 傅荣昭,孙勇如,贾士荣主编.植物遗传转化手册.北京:中国科学技术出版社,1994.132~138
- 11 奥斯伯 F,金斯顿 RE,塞德曼 JG,史密斯 JA,斯特拉尔 K 著;颜子颖,王海林译.精编分子生物学实验指南.北京:科学出版社,1999. 37~38
- 12 Pierre G, Haurence MD. Isolation of plant DNA: a fast, inexpensive, and reliable method. *Plant Mol Biol Rep*, 1992, **10**: 60~65
- 13 Li D (李丹), Ling DH (凌定厚). Comparison of methods of DNA extraction from *Pinus massoniana*. *Chin Bull Bot* (植物学通报), 2000, **17**(2): 168~173
- 14 Shioda M, Maraka M, Muofushi K. Selective inhibition of DNA polymerase by a polysaccharides purified from slime of *phsarum polcephalum*. *Biophys Res Commun*, 1987, **146**: 61~66
- 15 Dabo SM, Mitchel ED, Melcher U. A method for the isolation of nuclear DNA from cotton (*Gossypium*) leaves. *Analyt Biochem*, 1993, **210**: 34~38
- 16 Vroh BI, Harvengt L, Chandler A, Mergeai G, Jardin PD. Improved RAPD amplification of recalcitrant plant DNA by the use of activated charcoal during DNA extraction. *Plant Breed*, 1996, **115**: 205~206
- 17 Ding XD (丁晓东), LU LX (吕柳新). Study on genomic DNA extraction from recalcitrant Litch. *Chin J Appl Environ Biol* (应用与环境生物学报), 2000, **6**(2): 142~145
- 18 Zou YP (邹喻萍), Wang XQ (汪小全), Lei YD (雷一丁), Pei YL (裴颜龙), Zhang ZX (张志宪). Isolation and characterization of total DNA from several endangered species and their allies. *Acta Bot Sin* (植物学报), 1994, **36**(7): 528~533