

鲜叶保存方法对杜鹃红山茶基因组 DNA 提取的影响*

徐 斌 张方秋 潘 文 朱报著 刘玉玲

(广东省林业科学研究院 广州 510520)

摘要 以富含次生代谢物的杜鹃红山茶嫩叶为材料,研究了杜鹃红山茶鲜叶保存方法及其基因组 DNA 提取方法。结果表明,改进的 CTAB 和 SDS 区室法都适合杜鹃红山茶基因组 DNA 的提取,能提取到完整性较好、纯度较高的基因组 DNA。采用 -20°C 、液氮、硅胶脱水干燥 3 种方法保存样品,均可获得高质量 DNA,说明硅胶脱水干燥法保存样品的方法可行,为远距离采样提取杜鹃红山茶 DNA 提供了一种较好的鲜叶保存方法。

关键词 杜鹃红山茶 DNA 提取 硅胶脱水干燥

中图分类号: S718.43 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-4427(2008)02-0005-05

Effect of Different Preservation Methods of Fresh Leaves on Genomic DNA Extracted from *Camellia azalea*

Xu Bin Zhang Fangqiu Pan Wen Zhu Baozhu Liu Yuling

(Guangdong Forest Research Institute, Guangzhou, 510520)

Abstract The methods of preserving fresh leaves and genomic DNA extraction were studied in *Camellia azalea*, which are rich in secondary metabolites. Results showed a high-purity and a good-integrity DNA can be obtained from the preserved fresh leaves of *Camellia azalea*, using the methods of modified CTAB and SDS subarea. The DNA extracting quality from the leaves preserved with silica gel by the methods of modified CTAB and SDS subarea is high, which is the same as from the leaves preserved at the -20°C and liquid nitrogen, so these preserving methods are suitable for the fresh leaves of *Camellia azalea*, including for it from distant place.

Key words *Camellia azalea*, DNA extraction, dehydrated desiccation with silica gel

杜鹃红山茶(*Camellia azalea*)为山茶科山茶属的常绿灌木或小乔木,是近几年发现的新种,在我省阳春与电白交界的河尾山林场有零散分布^[1]。花红色,单瓣或重瓣,花期较长,4~12月均有花开放,夏季和秋季为盛花期,是茶花育种的好亲本,也是一种名贵的木本花卉。原生地的杜鹃红山茶分布区域极小,在利益的驱使下,人们在其原生地乱挖乱采,使杜鹃红山茶资源正走向枯竭,属珍稀濒危植物^[2]。目前对该树种的研究较少,主要集中在育种、引种和栽培方面,而在分子水平上的研究较少^[3-6]。为加强保护和可持续利用杜鹃红山茶资源,有必要从分子水平来探讨和认识其居群的遗传结构。

在植物分子生物学的研究过程中,高质量的基因组 DNA 的获得是一切有关 DNA 操作的基础,而实验材料的质量好坏是获得高质量 DNA 的前提和保障,它要求在提取 DNA 之前,样品材料不受机械损伤、不被氧化褐变、DNA 不被内源核酸酶所降解。目前一般采用 -20°C 、液氮法进行样品的保存,但受限条件较多。由于杜鹃红山茶分布区域极小,面临着如何节约资源和远距离采样保存的问题。为了更好的认识、保护和利用杜鹃红山茶,本研究采用不同的 DNA 提取方法,探讨不同方法保存样品对杜鹃红山茶 DNA 提取质量的影响,旨在寻找一种可用于高质量 DNA 提取的样品保存方法,从而为远距离采样提供理论与实践指导。

* 基金项目:“十一五”国家科技支撑计划专题(2006BAD01A1802)。

1 材料与方法

1.1 鲜叶的保存

杜鹃红山茶幼叶采于广东省林科院苗圃,分成3份,于 -20°C 、液氮及硅胶脱水干燥保存,保存时间均为3个月,以同等嫩度的鲜叶作对照。

1.2 DNA 提取方法

1.2.1 CTAB 区室法 基因组 DNA 的提取参考陈亮^[7],谭晓风^[8],黄建安^[9]等方法,并略加修改。取鲜叶、 -20°C 、液氮保存材料各 0.5 g 和硅胶脱水干叶 0.12 g,置于冰浴研钵中加 2 mL 提取液(0.4 mol/L 葡萄糖,5% 可溶性 PVP,2% β -巯基乙醇),研磨成糊状,转入离心管中,10 000 rpm 离心 10 min;沉淀用 2 mL 裂解液(2% CTAB,0.1 mol/L Tris-HCl pH 8.0, 20 mmol/L EDTA, 2.5 mol/L NaCl, 2% β -巯基乙醇)裂解,65 $^{\circ}\text{C}$ 保温 1 h, 10 000 rpm 离心 7 分钟;取上清,加入等体积的氯仿:异戊醇(24:1),轻轻混匀,10 000 rpm 离心 15 min;取上清,再用等体积的氯仿:异戊醇抽提一次;取上清,加入终浓度为 10 mg/L RNase A,37 $^{\circ}\text{C}$ 1 h 后,加入等体积氯仿:异戊醇,混匀,10 000 rpm 离心 15 min;取上清,加入 1/10 倍体积 3 mol/L NaAC(pH 5.2)及 2 倍体积冰冻的无水乙醇,静置片刻,用玻棒钩出 DNA;70% 乙醇洗涤两次后溶于 TE 中, -20°C 保存。

1.2.2 SDS 区室法 与 CTAB 区室法基本一致,并将提取液改为 SDS 提取液。

1.3 DNA 质量检测

1.3.1 紫外吸收与琼脂糖凝胶电泳检测 提取的 DNA 样品分别进行 0.8% 琼脂糖凝胶电泳、紫外分光光度计(Eppendorf)检测其浓度和纯度。各处理均是将 2 次重复提取的 DNA 混合后,进行紫外吸收测定。

1.3.2 限制性核酸内切酶酶切检测 将提取的 DNA 用限制性内切酶 *EcoRI* 酶切过夜(酶切反应总体积为 30 μL ,包括 10 \times buffer 3 μL , DNA 2 μg , *EcoRI* 3 U,加水至 30 μL)后,用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测酶切效果。

1.3.3 PCR 扩增检测 以杜鹃红山茶 DNA 为模板,用已筛选的 S45(序列为 CTGAGACGGA)和 S66(序列为 CCGAATTCCC)号随机引物进行 PCR 扩增,在 MJ Research PTC-200 型 PCR 仪上进行 PCR 扩增。反应体系 25 μL ,其中含有 10 \times PCR buffer 2.5 μL ,10 mmol/L dNTPs 2.5 μL , 5 U \cdot μL^{-1} Taq DNA polymerase 0.25 μL , 50 ng \cdot μL^{-1} Template DNA 1 μL , 10 $\mu\text{mol/L}$ Primer 1 μL , ddH₂O 17.75 μL 。PCR 扩增程序为 94 $^{\circ}\text{C}$ 3 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 35 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 2 min, 40 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min;最后 40 $^{\circ}\text{C}$ 保存。扩增产物在 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

2 结果与分析

2.1 不同方法保存样品提取基因组 DNA 的质量检测

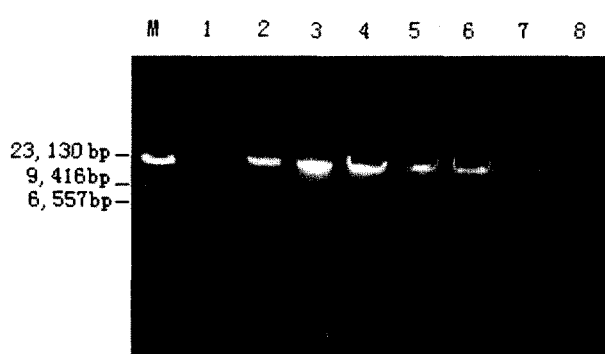
用 CTAB 区室法和 SDS 区室法提取不同方法保存的鲜叶 DNA,结果表明,用硅胶脱水和用 -20°C 液氮低温保存的样品所提取的 DNA 沉淀,外观色泽上无任何区别,均为白色或无色,呈半透明状。从紫外吸收值来看,样品 DNA 的 $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ 值均在 1.78~1.85 之间(表 1),这说明,所提取的 DNA 样品纯度较高,在提取过程中蛋白质、酚类、多糖及 RNA 类杂质去除较完全。

表 1 不同方法保存样品提取 DNA 的紫外吸收值

鲜叶保存方法	CTAB 法			SDS 法		
	OD_{260}	OD_{280}	$\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$	OD_{260}	OD_{280}	$\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$
鲜叶(对照)	0.047	0.026	1.809	0.033	0.018	1.833
硅胶脱水干燥	0.026	0.014	1.857	0.025	0.014	1.786
-20°C 低温保存	0.038	0.021	1.795	0.034	0.019	1.789
液氮低温保存	0.040	0.022	1.818	0.024	0.013	1.846

从电泳的结果可以看出(图 1),采用改进的 CTAB 法提取不同方法保存样品的基因组 DNA,电泳谱带清晰,有一条明亮的 DNA 带,基本没有拖带现象,点样孔附近也没有发亮现象,硅胶脱水干燥和其他方法处理

样品与对照样之间几乎无差异,甚至硅胶脱水处理样品孔附近的滞留物更少。与图 1 相比较而言,用 SDS 法提取的不同方法保存的样品基因组 DNA(图 2),电泳结果完全一致。由此可见,电泳检测与分光光度计得出的结果一致,说明采用不同样品保存方法对 DNA 的提取质量无明显影响,两种 DNA 提取方法可适应任何方法保存样品的 DNA 提取,都能得到较纯的 DNA 样品。



注:1~2:鲜叶(对照);3~4:硅胶脱水干燥样;5~6:-20℃保存样;7~8:液氮保存样;M:DNA Marker

图 1 改进 CTAB 法提取不同方法
保存样品基因组 DNA 的电泳图谱

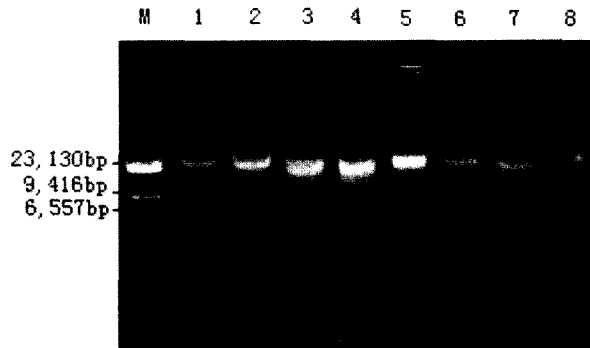
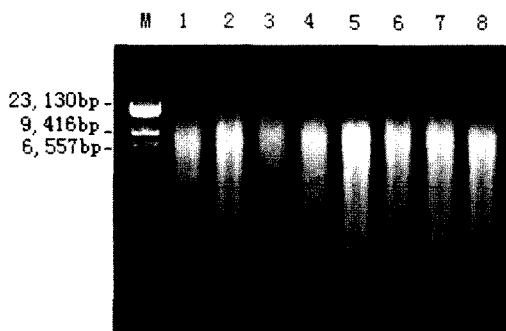


图 2 改进 SDS 法提取不同方法
保存样品基因组 DNA 的电泳图谱

2.2 不同方法保存样品提取基因组 DNA 的酶切效果

纯化的 DNA 经限制性内切酶酶切后的电泳结果表明(图 3),用这几种方法保存的样品及对照鲜叶中提取的 DNA 均可被限制性核酸内切酶完全消化,呈片状弥散分布,无清晰可见的大分子 DNA 条带,且用 CTAB 法和 SDS 法提取的 DNA 都能获得较好的限制性酶切图谱,这说明硅胶脱水干燥法及其他几种方法保存样品均不影响所得 DNA 的酶切效果,均可获得含蛋白质、多糖类等杂质少的高纯度 DNA。

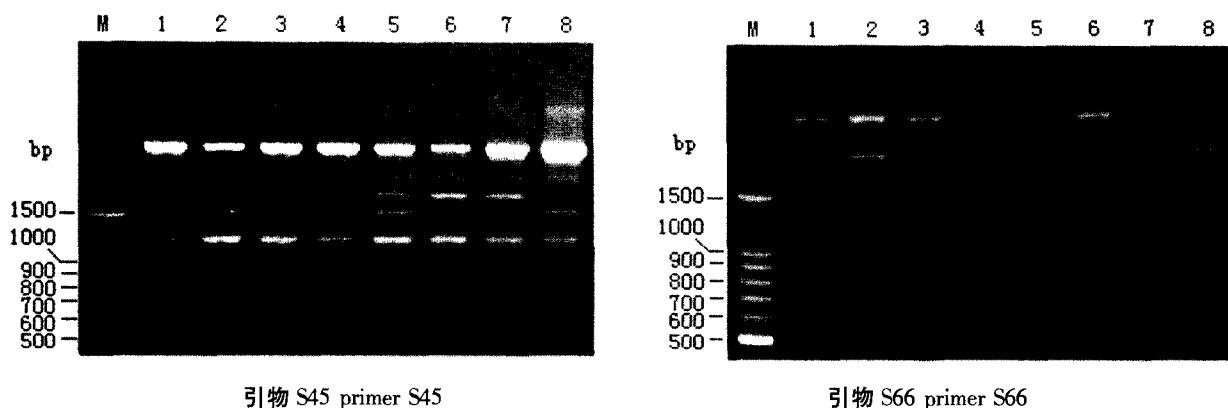


注:1,5:鲜叶(对照);
2,6:硅胶脱水干燥样;
3,7:-20℃保存样;
4,8:液氮保存样;
M:DNA Marker;
1~4:改进的 CTAB 法;
5~8:改进的 SDS 法

图 3 不同方法保存样品所得基因组 DNA 的酶切图谱

2.3 不同方法保存样品提取基因组 DNA 的 PCR 扩增结果

分别用 S66 和 S45 引物进行 PCR 扩增反应,结果见图 4。从图中可以看出,以不同方法保存的样品及鲜叶中提取的 DNA 为模板进行扩增,均获得了清晰的扩增图谱,条带清晰丰富,不同方法保存样品所提取的 DNA 采用同一引物扩增,所得谱带无差异,而且通过不同方法提取的样品 DNA 扩增时也未发现有明显的差别。这说明所提取的不同保存方法保存的样品 DNA 具有较高的纯度,均能用做 PCR 的模板,扩增条带明亮清晰稳定。



注:1,5: 鲜叶(对照); 2,6: 硅胶脱水干燥样; 3,7: -20°C 保存样; 4,8: 液氮保存样; M: DNA Marker;
1~4: 改进的 CTAB 法; 5~8: 改进的 SDS 法

图 4 不同方法保存样品所得基因组 DNA 的 PCR 扩增图谱

3 讨论

3.1 获取高纯度的杜鹃红山茶基因组 DNA 的提取方法

山茶属植物体内含有较多的酚类、多糖、萜类等次生物质,这些物质在不同植物体内的含量及比例不同,在 DNA 的提取过程中与 DNA 结合,形成胶状物难以溶解或产生褐变,严重影响了 DNA 的质量^[10]。因此,有效地去除多酚、多糖等物质是山茶属植物基因组 DNA 提取纯化的技术关键。目前,关于山茶属植物基因组 DNA 的提取报道也较多^[11-12],为了获得高质量的 DNA,通常采用区室法,利用细胞区隔化使多酚及其他杂质与 DNA 相互隔离的特性,防止多酚类及其氧化物造成的污染。在本次实验中,我们运用了 CTAB 区室法和 SDS 区室法来提取杜鹃红山茶基因组 DNA,且为了更好地排除次生物质对杜鹃红山茶基因组 DNA 提取的影响,在本实验中,我们采用了以下几种方法加以克服:第一,冰浴迅速研磨,防止细胞内的活性物质对基因组 DNA 的降解。第二,在抽提前加入抗氧化剂 5% PVP 和 2% β -巯基乙醇,防止酚类物质氧化褐变的产生。第三,为了进一步排除多糖色素等杂质的影响,在本实验中利用了高浓度的 NaCl 和乙醇沉淀处理,增加氯仿-异戊醇抽提的次数,且在乙醇沉淀时,应尽量缩短沉淀时间, DNA 出现后,将其立即挑出。第四,在用氯仿-异戊醇抽提两次后,直接加 RNAase 去除 RNA。从实验结果来看用这两种方法所提的杜鹃红山茶基因组 DNA 的 $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ 值都在 1.800 左右,基因组 DNA 纯度较高,且从所提基因组 DNA 能被核酸内切酶完全酶切的效果及能用作 PCR 模板也可以看出,CTAB 和 SDS 区室法都适合杜鹃红山茶基因组 DNA 的提取,都能获得高纯度的 DNA,所含蛋白质、多糖等杂质少,能进一步用于分子生物学的研究。此外,在本次实验中,我们也尝试了用次生代谢物质较多的杜鹃红山茶较成熟老叶,发现运用本实验方法,与幼叶一样,都能成功提取基因组 DNA。

3.2 获取高纯度的杜鹃红山茶基因组 DNA 的鲜叶保存方法

鲜叶的保存是我们平常实验过程经常会碰到的问题,特别是对远距离采样尤为重要。关于远距离或野外采集的用于 DNA 提取的实验材料怎样保存,在国内外都有相关的报道^[13-14]。通常认为从新鲜材料或用液氮贮藏材料提取的 DNA 的效果较好,至于用硅胶快速干燥叶片来保存植物材料的方法,此方法对有些植物的效果不好,易造成 DNA 的降解,所提的 DNA 含杂质较多,影响后续分子生物学的研究。因此,将此方法应用在富含酚类和多糖等的杜鹃红山茶更值得进一步研究。本研究通过对几种样品保存方法进行对比实验发现,以硅胶脱水干燥保存的样品为材料提取 DNA,其质量与从对照 -20°C 、液氮低温保存的材料中提取的

无任何差异,无论从 DNA 的紫外吸收值 OD_{260}/OD_{280} 值、DNA 的电泳结果、还是 *EcoRI* 酶对 DNA 的酶切效果及 RAPD 扩增结果都表明,硅胶脱水干燥法与其他低温保存的样品一样,提取的 DNA 的质量较好,纯度高,能很好的应用于杜鹃红山茶的分子生物学的研究,这对远距离保存样品具有重要的实践意义。因此本研究认为,硅胶脱水干燥法是一种简便实用的好方法,提高该方法操作质量的关键是杜鹃红山茶鲜叶离体后应迅速用硅胶作干燥处理,硅胶的量要充足,在处理过程中应避免对材料造成破损等。同时结果也发现,无论用 CTAB 区室法和 SDS 区室法都能从硅胶脱水干燥样品中提取出完整性较好、纯度较高的基因组 DNA。

参考文献

- [1] 郑文经,邱祖械,肖志东. 阳春市野生珍稀濒危植物和国家重点保护野生植物[J]. 广东林业科技,2003,19(3):38-40.
- [2] 游慕贤. 茶花界又一国家一级保护珍稀植物——杜鹃红山茶“诞生”[J]. 花木盆景:花卉园艺,2005(9):14.
- [3] 黎运枢,崔统华,郑文经,等. 杜鹃红山茶嫁接繁殖试验[J]. 广东林业科技,2004,20(3):37-39.
- [4] 游慕贤. 杜鹃红山茶授粉过程[J]. 花木盆景:花卉园艺,2006(8):16-17.
- [5] 罗晓莹,庄雪影,杨跃生. 杜鹃红山茶遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 热带亚热带植物学报,2007,15(2):93-100.
- [6] 罗晓莹,唐光大,许涵,等. 山茶科 3 种中国特有濒危植物的遗传多样性研究[J]. 生物多样性,2005,13(2):112-121.
- [7] 陈亮,陈大明,高其康,等. 茶树基因组 DNA 提纯与鉴定[J]. 茶叶科学,1997,17(2):177-181.
- [8] 谭晓风,漆龙霖,黄晓光,等. 山茶属植物叶片 DNA 抽提[J]. 中南林学院学报,1999,19(4):75-77.
- [9] 黄建安,黄意欢,罗军武,等. 茶树基因组 DNA 的高效提取方法[J]. 湖南农业大学学报,2003,29(5):402-406.
- [10] 黄建安,黄意欢,罗军武,等. 鲜叶保存方法对茶树基因组 DNA 提取效果的影响[J]. 生命科学研究,2003,7(4):360-364.
- [11] 高峻,蔡新,许明辉. 云南茶树 DNA 提取和 RAPD 分子标记和探讨[J]. 云南农业大学学报,2000,15(2):126-128.
- [12] 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.
- [13] Chase M W, Hills H H. Silica gel: An ideal material for field preservation of leaf samples for DNA studies[J]. Taxon,1991,40:215-220.
- [14] 王经源,黄儒珠. 用于 DNA 提取的刺桫桫叶片组织保存方法研究[J]. 福建师范大学学报,2002,18(1):82-85.