

文章编号:1001-5132 (2007) 02-0163-05

红山茶高质量基因组 DNA 的提取

倪 穗^{1,2,3}, 田 敏³, 李纪元³

(1.南京林业大学 森林资源与环境学院,江苏 南京 210037; 2.宁波大学 生命科学与生物工程学院,浙江 宁波 315211;
3.中国林科院 亚热带林业研究所,浙江 富阳 311400)

摘要:红山茶植物细胞含有大量的多糖、脂质、色素和酚类物质,严重影响基因组 DNA 的提取。本研究在多次实验的基础上对 CTAB 法进行了改良,结果表明:采用细胞核被解裂之前加入不溶性聚乙烯吡咯烷酮(PVP),用冰冻异丙醇沉淀基因组 DNA 等关键技术,可以从山茶属红山茶组 56 个物种的植物叶片中快速提取高质量的 DNA,满足 ITS 序列测定的需要;用嫩叶提取可获得纯度较高的 DNA;样品在 -20 ℃ 低温下保存对 DNA 的提取质量无明显影响。

关键词:基因组 DNA 提取; ITS 序列测定; 红山茶

中图分类号: Q946

文献标识码: A

红山茶(Sect. *Camellia*)是山茶属(*Camellia*)中种类最多的一组。我国是红山茶组植物的分布中心^[1]。该组植物具有重要的观赏价值和经济价值,形态上表现出较大的变异,自然杂交和人工栽培的影响更增添了变异的多样性和复杂性^[2]。利用最新的分子标记技术对红山茶组物种的系统学进行研究,可为该组物种的科学分类提供进一步的佐证。

对植物DNA直接测序进行比较是进行物种分类和鉴定最可靠最直接的手段。目前,核糖体DNA内转录间隔区(ITS)序列作为重要的分子性状已被广泛用于植物种间的分子进化与系统学研究。而要对红山茶进行ITS的序列测定,首要步骤是获得数量足够、质量符合要求的DNA样品,因此,基因组DNA的提取纯化是整个工作的基础^[3-6]。由于红山茶植物的细胞含有大量的多糖、脂质、色素和酚类物质,给DNA的提取和纯化带来许多困难^[7]。

本研究在多次实验的基础上对CTAB法进行了改良,获得了快速高效的提取方法。为下一步PCR扩增和DNA序列测定提供了材料,为进一步进行红山茶分子育种研究工作的开展奠定基础。

1 材料

山茶属红山茶组 56 种植物叶片(表 1)均采自金华国际山茶物种园。野外采集新鲜、生长状态良好的嫩叶或当年生老叶,置于放有冰袋的盒子里带回。于 -20 ℃ 的低温冰箱中保存,待用。

2 方法

2.1 基因组 DNA 的提取

在前人对各种植物材料进行DNA提取^[8-13]的

收稿日期: 2006-12-28.

宁波大学学报(理工版)网址: <http://3xb.nbu.edu.cn>

基金项目: 国家自然科学基金(30471420); 宁波市科技攻关项目(2005C100043; 2006C10010)。

作者简介: 倪 穗(1965-), 女, 浙江宁波人, 在读博士研究生/副教授, 主要研究方向: 植物学及园林花卉研究. E-mail: nisui@nbu.edu.cn

表1 实验试材的种名

编号	种名	编号	种名
1	金沙江红山茶 <i>C.jinshajiangic</i>	29	丝毛红山茶 <i>C.albo-sericea</i>
2	峨眉红山茶 <i>C.omeiensis</i>	30	白灵山红山茶 <i>C.bailinshanica</i>
3	多齿红山茶 <i>C.polyodonta</i>	31	寡脉红山茶 <i>C.oligophlebia</i>
4	绵管红山茶 <i>C.lanosituba</i>	32	单体红山茶 <i>C.uraku</i>
5	长蕊红山茶 <i>C.longigyina</i>	33	五瓣红山茶 <i>C.pentapetala</i>
6	石果红山茶 <i>C.lapidea</i>	34	尖萼红山茶 <i>C.edithae</i>
7	栓皮红山茶 <i>C.phelloderma</i>	35	寡瓣红山茶 <i>C.paucipetala</i>
8	毛蕊红山茶 <i>C.mairei</i>	36	薄壳红山茶 <i>C.tenuivalvis</i>
9	长毛红山茶 <i>C.villoda</i>	37	滇北红山茶 <i>C.boreali-yunnanica</i>
10	毛籽红山茶 <i>C.tridhosnerma</i>	38	芙蓉红山茶 <i>C.hilisciflora</i>
11	南山茶 <i>C.semiserrata</i>	39	秀丽红山茶 <i>C.concina</i>
12	滇山茶 <i>C.reticulata</i>	40	短管红山茶 <i>C.glabsipelata</i>
13	白花南山茶 <i>C.semiserrata var.albiflora</i>	41	赫章红山茶 <i>C.heyhangensis</i>
14	短柄红山茶 <i>C.brevipetiolata</i>	42	美丽红山茶 <i>C.delicata</i>
15	栓壳红山茶 <i>C.phellocapse</i>	43	湖南红山茶 <i>C.hunanica</i>
16	扁果红山茶 <i>C.compressa</i>	44	秃苞红山茶 <i>C.glabriperulata</i>
17	大花红山茶 <i>C.magniflora</i>	45	长尾红山茶 <i>C.longicaudata</i>
18	龙胜红山茶 <i>C.lungshenensis</i>	46	大果红山茶 <i>C.magnocarpa</i>
19	短轴红山茶 <i>C.brevicolumna</i>	47	离蕊红山茶 <i>C.liberisanima</i>
20	怒江红山茶 <i>C.saluenensis</i>	48	闪光红山茶 <i>C.lucidissima</i>
21	西南红山茶 <i>C.pitardii</i>	49	浙江红山茶 <i>C.chekiangoleosa</i>
22	西南白山茶 <i>C.pitardii var. alba</i>	50	莽山红山茶 <i>C.mongshanica</i>
23	窄叶西南红山茶 <i>C.pitardii var.yunnanica</i>	51	山茶 <i>C.japonica</i>
24	息烽红山茶 <i>C.xifongensis</i>	52	雪山茶 <i>C.icana</i>
25	隐脉红山茶 <i>C.cryptonewa</i>	53	杜鹃红山茶 <i>C.changii</i>
26	卵果红山茶 <i>C.oviformis</i>	54	连山红山茶 <i>C.lienshanensis</i>
27	短蕊红山茶 <i>C.brevigyina</i>	55	厚叶红山茶 <i>C.crassissima</i>
28	东安红山茶 <i>C.tunaganica</i>	56	假多齿红山茶 <i>C.apolyodont</i>

经验基础上,针对有效去除多糖、脂质、色素和酚类等物质,采用以下步骤对红山茶组植物的总DNA进行提取:

(1) 取适量冰冻嫩叶,放入预冷的研钵中,加入适量 PVP,于液氮中研磨成细粉。

(2) 迅速将研磨好的细粉 0.8 g 转入 5 mL 离心管中,加入经 65 °C 预热的加有 2%(V/V) 琉基乙醇 2 × CTAB 提取缓冲液(2%CTAB, 100 mmol·L⁻¹ Tris-HCl, 20 mmol·L⁻¹ EDTA pH=8.0, 1.4 mol·L⁻¹ NaCl) 2 mL,轻轻混匀,在 65 °C 水浴中保温 45 min;其

间不时颠倒混匀,取出于室温放置 10 ~ 15 min,冷至室温。

(3) 加 2 mL 氯仿:异戊醇(24:1),放置摇床上慢摇 20 min。

(4) 用剪去端部的枪头(黄色)小心将上清液转移至另一支新 5 mL 离心管中,加入等体积的氯仿:异戊醇(24:1),放置摇床上慢摇 20 min,10 000 rpm 离心 10 min。

(5) 用剪去端部的枪头(黄色)小心将上清液转移至另一支新 5 mL 离心管中,加入等体积经 -20

预冷的异丙醇,盖紧盖子,在 -20°C 下放置2 h,以沉淀基因组DNA,至有白色絮状沉淀出现,并用一玻璃棒将DNA沉淀挑出。

(6) 将粗提的DNA溶解在400 μL TE中,加无DNA酶活性的RNase酶液至浓度为 $10\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,37 $^{\circ}\text{C}$ 保温1 h。

(7) 酶解后加等体积的氯仿:异戊醇(24:1)摇匀,10 000 rpm离心5 min,取上清。

(8) 重复(5)。

(9) 将获得的DNA用70%乙醇冲洗2次,每次10 000 rpm离心5 min,弃上清液。

(10) 用无水乙醇冲洗2次,每次10 000 rpm离心5 min。倒置吸水纸上,直至无乙醇味。

(11) 加适量TE缓冲液,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜或直接置于 -20°C 。

(12) 取1.0~2.0 μL 样品于1.0%琼脂糖胶上电泳,检查样品DNA的质量。如果所用材料过老,抽提液应换成酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)。

2.2 基因组DNA的检测

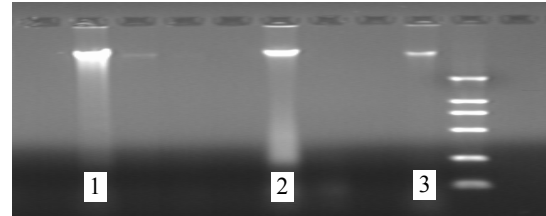
采用0.8%琼脂糖凝胶(含 $0.5\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 溴化乙锭)电泳检测DNA的完整性,岛津UV2401分光光度计检测DNA浓度。将OD值在1.6~2.0之间的合格DNA稀释至 $50\ \text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$,用于PCR扩增。

3 结果与分析

3.1 用改良的CTAB法提取高质量DNA

改良的CTAB法主要的变化:(1)在细胞核被解裂之前加入不溶性聚乙烯吡咯烷酮(PVP),这对抑制多酚氧化酶和细胞色素氧化酶的活性有很好的效果。(2)增加了1次氯仿异戊醇抽提,以去除细胞中的多糖类物质。(3)用冰冻异丙醇沉淀基因组DNA,从而使获得的基因组DNA能有效扩增。用此法可从红山茶组56个物种的植物叶片中提取高质量的DNA。一般100 mg鲜组织可得到5 μg 左右的总DNA,经琼脂糖凝胶电泳分析,其DNA大部分

保持了较大的片段,DNA的 $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ 的比值在1.5~1.8之间(图1),完全满足ITS序列测定的需要。

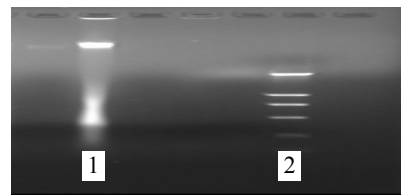


1.多齿红山茶 2.大花红山茶 3.怒江红山茶

图1 3种红山茶物种的总DNA提取的电泳图

3.2 不同生长期叶片样品提取基因组DNA的比较

用红山茶同一植株的当年生嫩叶(4月中旬采集)和老叶(12月份采集)样品分别提取基因组DNA。所提取的DNA,当年生嫩叶为白色或无色,紫外吸收值的结果显示所提取DNA的 $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ 值均在1.5~1.8之间,电泳结果显示其琼脂糖凝胶电泳图谱十分清晰,有1条明亮的DNA带,几乎无降解现象。而用当年生老叶提取的DNA为黄色或褐色,所提取的DNA的 $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ 值在1.2~1.5之间,DNA有不同程度的降解,其琼脂糖凝胶电泳图谱不清晰或仅有1条模糊的DNA带(图2)。实验表明:用嫩叶材料提取可获得纯度较高的DNA,而用老叶提取的DNA纯度较低,且部分降解。



1.山茶老叶 2.山茶嫩叶

图2 山茶不同生长期叶片样品基因组DNA的电泳检测图

3.3 不同保存时间的嫩叶样品基因组DNA的比较

用新鲜、 -20°C 保存3个月、7个月、12个月的山茶和浙江红山茶同一植株的嫩叶分别提取基因组DNA。所提取的DNA均为白色或无色,紫外吸收值的结果显示:由新鲜嫩叶所提的DNA的 $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ 值在1.83左右,由低温保存过的嫩叶所提的DNA的 $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ 值均在1.5~1.8之间,电泳检测结果其琼脂糖凝胶电泳图谱十分清晰,有一条明亮的DNA带,无降解现象。实验表明,用嫩

叶材料提取均获得了纯度较高的DNA,样品在-20℃低温下短期保存对DNA的提取质量无明显影响(图3)。图3中左泳道为山茶,右泳道为浙江红山茶。1为新鲜嫩叶;2~4为-20℃保存3个月、7个月和12个月的嫩叶。

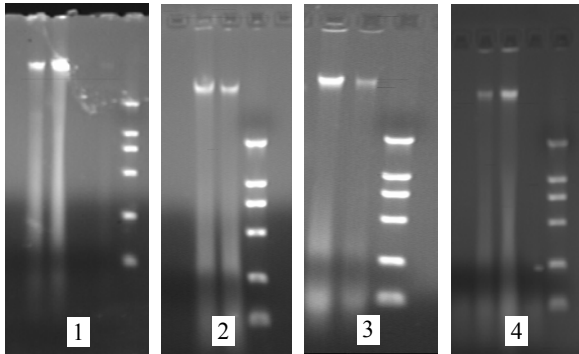
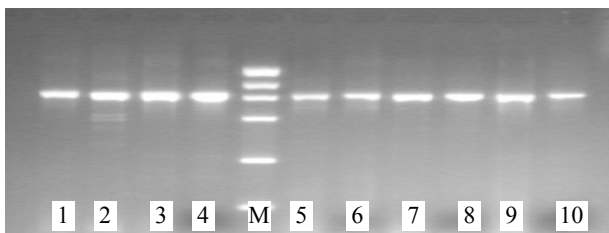


图3 不同品种,不同保存时间嫩叶样品DNA电泳图

3.4 PCR 扩增结果

以改良后的CTAB法对红山茶组10个物种嫩叶提取的模板DNA进行PCR扩增。

扩增在PTC-100型DNA扩增仪上进行。引物为自行设计,后由上海生物工程公司合成(20 bp)。Taq酶(每支5 U),dNTP(每支25 Mm)购自上海皓嘉科技发展有限公司,其余试剂均购自上海生工。PCR扩增条件:mg⁺⁺浓度为2.0 mmol·L⁻¹,dNTP浓度为0.2 mmol·L⁻¹,引物浓度为0.5 mmol·L⁻¹,Taq酶的用量为1.2 U,DNA模板用量为60~80 ng。反应体系为25 μl,反应程序:第一阶段为94℃,预变性,5 min;1个循环;第二阶段为94℃,变性45 s;53℃,退火,50 s;2℃,延伸,1.5 min;40个循环;第三阶段为72℃,延伸,8 min;1个



1.浙江红山茶 2.短管红山茶 3.石果红山茶 4.长毛红山茶
5.大花红山茶 6.龙胜红山茶 7.西南红山茶 8.息烽红山茶
9.隐脉红山茶 10.闪光红山茶

图4 部分植物PCR产物的琼脂糖凝胶电泳图

循环终止反应,4℃保存。

产物经1.0%的琼脂糖凝胶电泳检测,在750 bp处有一明亮的DNA带(图4)。表明改良后的CTAB法所提取的红山茶DNA可以完全满足红山茶组植物的ITS反应要求。

4 讨论与总结

要对红山茶进行ITS的序列测定,基因组DNA的提取纯化是整个工作的基础^[14]。在红山茶基因组DNA的提取实验过程中有大量的粘性物质出现,这表明红山茶植物细胞含有大量的多糖、脂质、色素和酚类物质,这些物质容易与核酸形成复合物,从而影响DNA的溶解或与DNA发生了不可逆的相互作用,影响基因组DNA的质量,严重者导致扩增失败。所以如何有效地去除多糖、脂质、色素和酚类等物质是红山茶基因组DNA提取纯化的技术关键。

利用改良的CTAB法,从山茶属红山茶组58个物种的植物叶片中提取高质量的DNA。一般100 mg鲜组织可得5 μg左右的总DNA,经琼脂糖凝胶电泳分析,其DNA大部分保持较大的片段,DNA OD₂₆₀/OD₂₈₀的比值在1.5~1.8之间。与谭晓风等人^[15]对山茶属植物叶片DNA提取实验结果相比在DNA纯度上相近;在DNA的产率上要比谭晓风等平均每克叶片获得25 μg DNA高1倍,因此,这种改良的CTAB提取的红山茶组DNA的量更大,质量也更好,更适用于红山茶组植物叶片DNA抽提;抽提的DNA完全满足ITS序列测定及分析需要。

山茶属红山茶组植物的DNA提取的材料以新鲜的嫩叶样品最好,其次是低温保存的嫩叶样品,用老叶提取的DNA纯度较低,DNA有不同程度的降解,其质量不如从嫩叶中提取的DNA。嫩叶材料样品在-20℃低温下短期保存,对DNA的提取质量无明显影响,提取均获得了纯度较高的DNA,能很好地应用于红山茶的分子生物学研究。

参考文献:

- [1] 张宏达,任善湘. 中国植物志[M]. 北京: 科学出版社, 1998.
- [2] 闵天禄,张文驹. 山茶属植物的进化与分布[J]. 云南植物研究, 1996, 18(1):1-13.
- [3] 王景雪,孙毅,高武军. 一种简便实用的植物总 DNA 提取方法[J]. 山西大学学报: 自然科学版, 2000, 23(3): 271-272.
- [4] 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.
- [5] 朱旗,任春梅,洪亚辉,等. 茶树叶片 DNA 提取纯与检测[J]. 湖南农业大学学报, 1994, 20(2):114-117.
- [6] 陈亮,陈大明,高其康,等. 茶树基因组 DNA 的提取与鉴定[J]. 茶叶科学, 1997, 17(2):177-181.
- [7] 李钧敏,柯世省,金则新. 濒危植物七子花 DNA 的提取及分析[J]. 广西植物, 2002, 22(6):499-502.
- [8] 杨婉身,王西瑶,荀林,等. 大豆等植物材料 DNA 提取方法的改进及其干扰机制的探讨[J]. 西北农业大学学报, 1996, 14(2):153-157.
- [9] 王得元,彭世清,刘志昕,等. 辣椒基因组 DNA 提取与 RAPD 分析[J]. 江西农业大学学报, 1998, 20(2):180-182.
- [10] 李思光,罗玉萍,陈万秋,等. 猕猴桃基因组 DNA 的提取及其 RAPD 扩增研究[J]. 南昌大学学报: 理科版, 2001, 25(3):264-267.
- [11] 袁庆华,桂枝,张文淑. 苜蓿基因组 DNA 提取和 RAPD 反应条件优选[J]. 草地学报, 2001, 9(2):99-105.
- [12] Adams R P, Demeke T. Systematic relationships in Juniperus based on random amplified polymorphic DNAs(RAPDs) [J]. Taxon, 1993, 42(3):553-571.
- [13] Yu K, Pauls K P. Optimization of DNA extraction and PCR procedures for random amplified polymorphic DNA(RAPD) analysis in plant[M]. New York: CRC Press, 1994.
- [14] 顾红雅,瞿礼嘉. 植物分子生物学—实验手册[M]. 北京: 高等教育出版社, 2001.
- [15] 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.

A DNA Extraction Method for Sect. *Camellia* Gene GroupNI Sui^{1,2,3}, TIAN Min³, LI Ji-yuan³

(1.College of Forest Resources and Environment, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China; 2.Faculty of Life Science and Biotechnology, Ningbo University, Ningbo 315211, China; 3.Research Institute of Subtropical Forestry, CAF, Fuyang 311400, China)

Abstract: The cells of Sect. *Camellia* plants have rich amylose, lipid, pigment and hydroxybenzene. These substances seriously produce adverse effect in extraction of DNA from Sect.*Camellia*. CTAB method is improved in this research work through a series of experiments. The results suggest that using some key techniques, such as adding PVP before karyon was splintered and using frost Isopropano to precipitate genome DNA, can speed up extraction of DNA from leaves of 56 species of Sect. *Camellia* in Genus *Camellia*. The DNA could be suitable for ITS sequence analysis. Genomic DNA of higher purity level can be extracted from the tender leaves. Short-term conservation of the samples under -20 may not obviously affect quality of DNA extraction.

Key words: DNA extraction; ITS sequence analysis; Sect. *Camellia*

CLC number: Q946

Document code: A

(责任编辑 史小丽)