

杉木 DNA 的简便提取方法*

尤 勇 洪菊生

关键词 杉木针叶 DNA 巯基乙醇 次生物质

杉木(*Cunninghamia lanceolata* (Lamb) Hook.) 是我国的特有树种, 其分子生物学研究目前在国内外开展的较少, 其近缘种的研究也较少。为了开展杉木分子生物学的研究, 首先应解决杉木 DNA 的提取。本实验对提取 DNA 方法进行了研究, 探索到了一种快速提取 DNA 的方法, 该方法可从不同生长期的杉木针叶中提取 DNA, 也可从水杉(*Metasequoia glyptostroboides* Hu et Cheng)、柳杉(*Cryptomeria fortunei* Hooibrenk)、秃杉(*Taiwania flousiana* Gaussen)、侧柏(*Platycladus orientalis* (L.) Franco) 针叶中提取 DNA。

1 材料和方法

1.1 材料

实验用的杉木、柳杉、秃杉、侧柏和水杉的材料均采自江苏句容林场, 用液氮罐保存。

主要仪器: 20Pr-52D 型日立高速冷冻离心机、恒温水浴锅(北京医疗器械厂)、平板电泳仪(北京六一仪器厂)等。药品与试剂: (Tris-Cl、EDTA、SDS、PVP-360 等) 均购自华美生物工程有限公司。

1.2 提取方法

(1) 取 1~2 g 针叶, 在液氮中迅速研磨后转入 50 mL 离心管; (2) 迅速加入 12 mL 预热(65 °C) 的 DNA 提取液(100 mmol/L Tri-Cl, 50 mmol/L EDTA, 500 mmol/L NaCl, 2% SDS (W/V), 1% PVP-360, 2% 巯基乙醇(使用前加入)) 中, 于 65 °C 保温 20~30 min; (3) 加入 4 mL 的 5 mol/L KAC, 然后迅速放置在冰上 5~10 min; (4) 加入 16 mL 的氯仿-异戊醇(24:1), 颠倒混匀后于 800~1000 r/min 离心 10 min 分相; (5) 上清液中加入 2/3 体积预冷的异丙醇, 室温放置 30 min 后, 用玻棒将漂浮的絮状物捞出, 然后放入另一离心管中; (6) 用 75% 乙醇洗涤 2 次絮状物, 风干后, 溶于 200 mL TE 缓冲液; (7) 用等体积的氯仿-异戊醇(24:1) 抽提 1 次; (8) 上清液加入 1/10 体积 3 mol/L NaAc, 再加入 2 倍体积无水乙醇, 冰箱放置 20 min 后, 1000 r/min 离心沉淀 DNA; (9) 沉淀 DNA 用 75% 乙醇洗涤 2 次, 风干后, 溶于适量 TE 溶液中备用。

1.3 DNA 质量的检测

将得到的杉木 DNA 样品适当稀释后, 在 0.8% 的琼脂糖凝胶上电泳检测其质量, 同时加 Lamda 总 DNA 做对照。

1997—09—05 收稿。

尤勇助理研究员, 洪菊生(中国林业科学研究院林业研究所 北京 100091)。

* 本研究属国家“八五”攻关课题“杉木多世代遗传改良和建筑材优良无性系选育”专题的部分内容。

2 结果与分析

预备实验中,先参照大豆 DNA 的提取方法^[1],没有成功。然后又采用了李希臣的方法^[2]得到的杉木 DNA 呈红褐色, DNA 溶液非常粘滞,不容易抽提和纯化,经查明是粗提 DNA 中掺杂了大量的色素、次生物质和多糖。国外已有相类似的报道^[3]。这样粗提得到的 DNA 不能进行 PCR 反应和经限制性酶消化;而且这些杂质既不能通过酚和氯仿抽提除去,又不能通过沉淀 DNA 将其去掉。

针对这种情况,参照 B. Heinie^[4]的 DNA 提取方法进行实验,经过一系列改进建立了适合提取杉木 DNA 的方法,提取过程的要点是:(1)材料研磨的粗细、研磨时间的长短都影响最后 DNA 的提取,在研磨细的前提下研磨的时间越短越好(2)在提取液中加入 2% 巯基乙醇和 PVP-360 有助于去除杉木针叶中的大量色素及次生物质。每管提取液在预热后马上加入研磨好的材料和 200 μ L 巯基乙醇,新鲜材料温浴后的提取液呈淡绿色为正常,温浴的时间为 20 ~ 30 min;(3)由于针叶中含有较多的酚类物质,在提取液中加入 1% 的 PVP-360,用于抑制酚类物质的褐化,然后通过离心将 PVP 与多酚物质结合形成的复合物除去。(4)在用乙醇沉淀杉木 DNA 时另加了不同浓度的 NaAc 溶液,用 3 mol/L NaAc 溶液同乙醇一起沉淀杉木 DNA 粗提样品能够有效的除掉多糖。经过以上的改进,摸索到了适合提取杉木 DNA 的方法。

DNA 样品用 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳检测,结果表明这种方法提取的 DNA 很少受到剪切和降解(图 1);杉木 DNA 分子量较大,一般在 50 kb 以上;限制酶切消化检测表明所得 DNA 易被内切酶消化(图 2),因此用这种改进

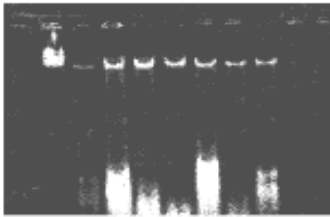


图1 杉木总 DNA

1. ADNA 分子量标记;
2~8. 不同含量的杉木总 DNA

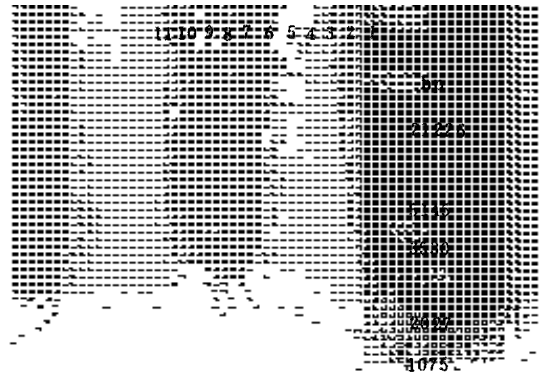


图2 Hind 酶切的杉木总 DNA

1. ADNA 分子量标记(Hind + EcoRI);
2~11. Hind 酶切后的杉木总 DNA

方法得到的 DNA 适合于 PCR 及 RFLP 指纹图谱分析。用此方法也提取了高质量的柳杉、水杉、秃杉及侧柏的 DNA。

3 讨论

在杉木针叶 DNA 的提取过程中遇到了许多困难。如从树上采下针叶到运进实验室,中间的许多环节都会影响 DNA 的提取质量。同时针叶比较坚硬,研磨时比较费力且不易磨碎。针叶又含有大量的色素、多糖及其它次生物质,且在提取过程中很难去除。以 B. Heinie 的 DNA

方法为基础作了重要的改进,使之适合于杉木针叶 DNA 的提取,又避免了国外常用的 CTAB 方法造成的材料损失。所得杉木 DNA 分子量在 50 kb 以上, DNA 没有剪切和降解的现象,不仅适合于 RAPD 分析,也适合于 RFLP 作图及其它 DNA 标记技术。

该 DNA 提取方法的主要特点是: (1) 在提取液中加较高浓度的巯基乙醇有助于去除针叶中的色素及其它次生物质; (2) 采用高盐的方法结合乙醇沉淀除去样品的多糖; (3) 用 PVP-360 部分去除针叶中的多酚物质和色素; (4) 可以从不同生长期的杉木针叶中提取 DNA。

从杉木针叶中提取 DNA 可以直接在杉木种源基因库中取样,这可避免从各产地采样提取 DNA 所带来的许多困难。因此,所改进的方法可以推广到许多采样困难的针叶树种上去。

参 考 文 献

- 1 Tai T H, Tanksley S D. A rapid and inexpensive method for total DNA from dehydrated plant tissue. *Plant Mol. Bio. Rep.*, 1991, 8(2): 297 ~ 303.
- 2 李希臣, 雷勃钧. 高效的植物 DNA 提取方法. *生物技术*, 1991, 4(3): 39 ~ 41.
- 3 Vignir S, Kesara A. DNA fingerprinting of *Populus trichocarpa* clones using RAPD markers. *New Forests*, 1995, 10(3): 197 ~ 206.
- 4 Heinie B, Westcott R. Application of random amplified polymorphic DNA to detect genetic variation in Norway spruce. *New Forests*, 1996, 11(2): 173 ~ 184.

A Simple Procedure for Extraction and Purification DNA in Chinese fir

You Yong Hong Jusheng

Abstract A simple, quick and reliable procedure was developed for the extraction and purification of DNA from the leaves of Chinese fir. Specifically designed to overcome the trouble caused by the very high concentration of pigments, polysaccharides and other contaminants in the leaves. In this procedure, the application of extraction buffer with high concentration of mercaptoethanol (2%) was proved to be successful in removing pigments, ethanol precipitation of resuspended nucleic acids from 3 mol/L NaAC and revealed to be powerful in removing polysaccharides, and PVP-360 was used to remove polyphenols. The resulted DNA with this method was of high molecular weight (more than 50 kb) and was completely digestible with restriction endonucleases and amplifiable in PCR, they are well suited to RAPD, RFLP analysis and other molecular marker systems. This procedure can also be used to extract DNA from other gymnosperms, for example: *Taiwania fiouiana*, *Metasequoia glyptostroboides*, *Cryptomeria fortunei* etc.

Key words Chinese fir needle DNA mercaptoethanol secondary metabolite