

天师栗叶片 DNA 提取方法的建立

吴潇潇¹ 赵千里² 王美娟² 杨思婷² 廖妮燕¹ 江艺蕾¹ 杜克兵¹

(1. 华中农业大学园艺林学学院 武汉 430070; 2. 神农架林区林业科学研究院 神农架 442499)

摘要: 提取高质量的基因组 DNA 是开展分子生物学研究的重要前提之一。天师栗由于叶片含有较多的多糖、多酚类物质,常常导致 DNA 的提取质量不高,严重影响后续的分子生物学操作。本研究以树龄分别为 600、50、4 a 的天师栗植株的成熟叶片为材料,建立了适合于天师栗叶片 DNA 的提取方法(M1),并将其与 3 种常见植物 DNA 提取方法(M2~M4)进行了比较。结果表明:M1 提取 DNA 的浓度范围介于 207.19~488.98 ng · μL^{-1} ,平均值为 308.42 ng · μL^{-1} ;纯度 A_{260}/A_{280} 比值介于 1.90~1.98,平均值为 1.93; A_{260}/A_{230} 比值介于 1.72~1.95,平均值为 1.86;DNA 电泳条带清晰,亮度适中,点样孔干净无污染;ISSR-PCR 能扩增出条带清晰、稳定性好、多态性高的 PCR 产物。M1 提取出的 DNA 在浓度、纯度、DNA 条带、ISSR-PCR 扩增产物方面均明显优于其它 3 种方法(M2~M4),适合用于天师栗叶片 DNA 的提取。

关键词: 天师栗;DNA 提取;DNA 质量

中图分类号:S792.99

文献标识码:A

文章编号:1004-3020(2024)02-0013-06

Establishment of DNA Extraction Method From Leaves of *Aesculus chinensis* var. *wilsonii*

Wu Xiaoxiao¹ Zhao Qianli² Wang Meijuan² Yang Siting² Liao Niyan¹ Jiang Yilei¹ Du Keping¹

(1. College of Horticulture and Forestry Sciences, Huazhong Agricultural University Wuhan 430070;

2. Forestry Research Institute of Shennongjia Shennongjia 442499)

Abstract: Extracting high-quality genomic DNA is one of the essential prerequisites for conducting molecular biology research. Due to the high content of polysaccharides and polyphenols in the leaves of *A. chinensis* var. *wilsonii*, the quality of DNA extraction is often low, which seriously affects subsequent molecular biology operations. This study used mature leaves of 600, 50, and 4-year-old *A. chinensis* var. *wilsonii* plants as materials to establish a suitable method for extracting DNA from *A. chinensis* var. *wilsonii* (M1) and compared it with three standard plant DNA extraction methods (M2—M4). The results showed that the concentration range for M1 extraction of DNA ranged from 207.19 to 488.98 ng · μL^{-1} , the average value was 308.42 ng · μL^{-1} ; the purity A_{260}/A_{280} ratio ranged from 1.90 to 1.98, with an average value of 1.93. The A_{260}/A_{230} ratio ranged from 1.72 to 1.95, with an average value of 1.86; DNA electrophoresis bands were clear, with moderate brightness, and the sample holes were clean and pollution-free; ISSR-PCR can amplify PCR products with clear bands, good stability and high polymorphism. The DNA extracted by M1 is significantly superior to the other three methods (M2—M4) in terms of concentration, purity, DNA bands, and ISSR-PCR amplification products, making it suitable for the extraction of DNA from leaves of *A. chinensis* var. *wilsonii*.

Key words: *Aesculus chinensis* var. *wilsonii*; DNA extraction; DNA quality

天师栗(*Aesculus chinensis* var. *wilsonii*)为七 叶树科(Hippocastanaceae)七叶树属的高大落叶

* 收稿日期:2023-11-17;修回日期:2024-02-28

基金项目:神农架梭罗树优良种质资源筛选与丰产栽培技术研究“神农架林区林业科技计划项目”(SAF202108)。

作者简介:吴潇潇(1997—),女,硕士研究生在读,研究方向为林木遗传育种。

杜克兵为通讯作者。

乔木,是世界著名行道树之一,主要分布于亚洲、欧洲、美洲。天师栗的种子称为娑罗子,内含七叶皂苷,具有一定的药用价值,有理气、疏肝、抗炎、改善血液循环及抑制淋巴水肿等作用^[1-3]。目前,天师栗的研究主要集中于栽培技术^[4]和种子化学成分的研究及应用等方面^[5-7],关于分子生物学的研究还不多。提取高质量的基因组 DNA 是开展其分子生物学研究的重要前提之一。由于天师栗叶片含有较多的多糖、多酚类物质^[8-9],在提取 DNA 时往往难以去除干净,导致 DNA 的提取质量不高,严重影响了后续分子生物学操作^[10]。通过课题组前期的试验经验积累,本研究建立并优化了天师栗叶片 DNA 的提取方法,并与 3 种常用 DNA 提取方法进行了比较,以期为天师栗叶片 DNA 提取及其分子生物学研究提供参考。

1 材料和方法

1.1 试验材料

天师栗叶片样品于 2023 年 7 月采集于湖北神农架林区(31°73'N~31°44'N,110°63'E~110°45'E),采样母株的年龄分别为 600、50、4 a,分别编号为 S1、S2、S3。采样时,采集树冠中上部的健康、成熟叶片,保存于装有硅胶的 10 mL 离心管中干燥,然后带回实验室用液氮冷冻后保存于-80℃冰箱中备用。

1.2 试验方法

1.2.1 DNA 提取

采用 4 种方法分别提取天师栗叶片 DNA,其中,M1 为本研究建立的天师栗叶片 DNA 提取方法,M2、M3、M4 分别为杨树、天师栗、七叶树(*Aesculus chinensis*)叶片 DNA 的提取方法。详细提取步骤如下:

M1:2%SDS 多重纯化法

(1)取 0.2~0.5 g 样品,液氮快速研磨至粉末,转入 2 mL 离心管中,加入 800 μ L 葡萄糖提取缓冲液(含 0.4 mol·L⁻¹葡萄糖、5% PVP-40、3% β -巯基乙醇),混匀。4℃,10 000 rpm 离心 10 min,弃上清液。

(2)沉淀中加入 800 μ L 预热的 2% SDS 裂解

液(使用前加 3% β -巯基乙醇),混匀,置 65℃水浴中加热 30 min,不时摇匀。

(3)加入 1/3 体积的 5 mol·L⁻¹醋酸钾(KAC,pH=4.8),充分混匀,冰浴放置 30 min,4℃下 12 000 rpm 离心 20 min。

(4)取上清液约 810 μ L,加入 1/10 体积的 8% CTAB/NaCl 溶液(含 1.05 mol·L⁻¹ NaCl、8% CTAB),再加入等体积氯仿/异戊醇(体积比 24:1),混匀,静置 10 min,4℃,8000 rpm 离心 10 min。

(5)取上清液约 750 μ L,加入等体积氯仿/异戊醇(体积比 24:1),混匀,静置 10 min,4℃下 10 000 rpm 离心 10 min。

(6)取上清液约 720 μ L,加入 2/3 倍体积-20℃预冷的异丙醇,-20℃沉淀 30~60 min。4℃下 10 000 rpm 离心 10 min,弃上清液。

(7)沉淀用 80%乙醇洗涤 2~3 次,吹干 10~15 min。

(8)沉淀用 300 μ L TE(pH8.0)溶解,加入 4 μ L 10 mg·mL⁻¹ Rnase A,于室温中静置 30 min~3 h。

(9)加入等体积 CTAB 纯化缓冲液(含 200 mmol·L⁻¹ Tris·Cl,pH 值=7.5;2 mol·L⁻¹ NaCl;50 mmol·L⁻¹ EDTA;2% CTAB),混匀后置于 65℃水浴 15 min。

(10)冷却至室温,用等体积氯仿/异戊醇(体积比 24:1)抽提,充分混匀,静置 30~60 min,4℃下 10 000 rpm 离心 10 min。

(11)取上清液 500 μ L,加入 60 μ L 5 mol·L⁻¹ NaCl 和 2 倍体积无水乙醇,4℃下沉淀 DNA 约 1 h。4℃下 10 000 rpm 离心 10 min,弃上清液。

(12)沉淀用 80%乙醇洗涤 2~3 次,弃乙醇,再用无水乙醇脱水 10 min,弃乙醇。

(13)倒置离心管,干燥 DNA,加 30 μ L TE buffer 溶解 DNA,-20℃保存,备用。

M2:2%CTAB 法,参照史晓霞(2022)^[11]的方法提取天师栗叶片 DNA。

M3:改良版 CTAB 法,参照刘志格(2021)^[12]的方法提取天师栗叶片 DNA。

M4:0.5% SDS 法,参照王绍文和时明芝(2008)^[13]的方法提取天师栗叶片 DNA。

表 1 四种 DNA 提取方法的主要差异

步骤	DNA 提取方法			
	M1	M2	M3	M4
预处理	葡萄糖提取缓冲液	—	核分提取缓冲液	—
裂解液	2% SDS+3% β-巯基乙醇	2%CTAB	2% CTAB+0. 2% β-巯基乙醇	0. 5% SDS+0. 25%β-巯基乙醇
	醋酸钾溶液	氯仿/异戊醇纯化 2 次	氯仿/异戊醇纯化 2 次	PVP
	氯仿/异戊醇纯化 3 次	—	—	醋酸铵溶液
纯化方式	CTAB/NaCl 溶液	—	—	苯酚/氯仿/异戊醇纯化 1 次
	Rnase A	—	—	Rnase A
	CTAB 纯化缓冲液	—	—	氯仿/异戊醇纯化 2 次
沉淀方式	异丙醇沉淀 1 次、NaCl+无水乙醇沉淀 1 次	异丙醇沉淀 1 次	异丙醇沉淀 1 次	异丙醇沉淀 2 次

注:“—”表示没有该步骤。

1. 2. 2 DNA 质量检测

为检测 4 种方法提取 DNA 的质量,分别采用微量核酸蛋白检测仪(Nanodrop ND—2000,美国)和琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的浓度和纯度。微量核酸蛋白检测仪主要测定 DNA 溶液在 230、260、280 nm 下的吸光度(A_{230} 、 A_{260} 、 A_{280}),获得 DNA 浓度,并采用 A_{260}/A_{280} 和 A_{260}/A_{230} 的比值评价 DNA 的纯度。

随后,将提取的 DNA 进行琼脂糖凝胶电泳,进一步观察 DNA 的浓度和纯度。采用 1%琼脂糖凝胶(含 0. 01%核酸染料)进行电泳,电泳条件设置为 160 v,20 min;以 2000×DNA Marker 作为标记物,5×loading buffer(翌圣生物科技股份有限公司)染色;电泳产物采用凝胶成像分析系统拍照(JY04S-3E,北京君意东方电泳设备有限公司)。

1. 2. 3 PCR 扩增和凝胶电泳分析

采用 ISSR 标记方法进一步验证所提取 DNA 应用于分子生物学研究的可行性。从哥伦比亚大学(University of British Columbia)公布的 100 条 ISSR 引物中,选取 3 条能够从天师栗 DNA 中扩增产物的引物,进行 ISSR-PCR 验证(表 2)。

采用 20 μL 体系中进行 PCR 扩增,包括 DNA 模板(母液 50 ng · μL⁻¹)2 μL、ISSR 引物(母液 10 μmol · L⁻¹)2μL、PCR 反应混合(Master Mix)10 μL 和 6 μL ddH₂O。ISSR 的 PCR 反应程序:94 ℃预变性 5 min;94 ℃变性 1 min,53~56 ℃退火 1 min,72 ℃延伸 1 min,35 个循环;72 ℃延伸 10 min;最后 8 ℃保存。PCR 产物采用琼脂糖凝胶电泳进行检测,方法与 DNA 质量检测方法一致。

表 2 ISSR 引物序列

引物编号	引物序列(5′-3′)
UBC808	AGAGAGAGAGAGAGAGC
UBC842	GAGAGAGAGAGAGAGAYG
UBC889	DBDACACACACACACAC

1. 3 数据分析

表格中的数据为平均值±标准误($n=3$)。所有试验数据采用 SAS 8. 1 统计软件进行方差分析(ANOVA)和多重比较(Duncan’s)。

2 结果与分析

2. 1 DNA 的浓度与纯度

DNA 浓度测定结果表明(表 3),4 种方法提取 DNA 的浓度和纯度存在显著差异($P<0. 05$)。M1 的 DNA 浓度范围介于 207. 19~488. 98 ng · μL⁻¹,平均值为 308. 42 ng · μL⁻¹;M2 的 DNA 浓度介于 297. 25~619. 81 ng · μL⁻¹,平均值为 426. 60 ng · μL⁻¹;M3 的 DNA 浓度介于 184. 81~423. 72 ng · μL⁻¹,平均值为 305. 05 ng · μL⁻¹;M4 的 DNA 浓度介于 21. 33~49. 18 ng · μL⁻¹,平均值为 36. 88 ng · μL⁻¹。可见,4 种方法提取的 DNA 浓度排序为:M2>M1>M3>M4,其中 M1、M2、M3 之间差异不显著。

DNA 的 A_{260}/A_{280} 比值结果表明,M1 的比值介于 1. 90~1. 98,平均值为 1. 93;M2 的比值介于 1. 30~2. 03,平均值为 1. 78;M3 的比值介于 2. 02

~2.18,平均值为 2.10;M4 的比值的介于 1.08~1.34,平均值为 1.18。可见,M1 的不同样品之间最稳定,比值最好,纯度最高;M2 个体差异大,M3 的 DNA 比值略高;M4 的比值最差,DNA 可能存在较严重的蛋白质以及酚类物质污染。

DNA 的 A_{260}/A_{230} 比值结果表明,M1 的比值

介于 1.72~1.95,平均值为 1.86;M2 的比值介于 1.15~1.81,平均值为 1.48;M3 的比值介于 1.03~1.70,平均值为 1.29;M4 的比值的介于 0.32~0.51,平均值为 0.39。可见,M1 提取 DNA 的比值和稳定性最好,纯度最高;M4 的比值最差,DNA 可能存在较严重的多糖、盐类物质的污染。

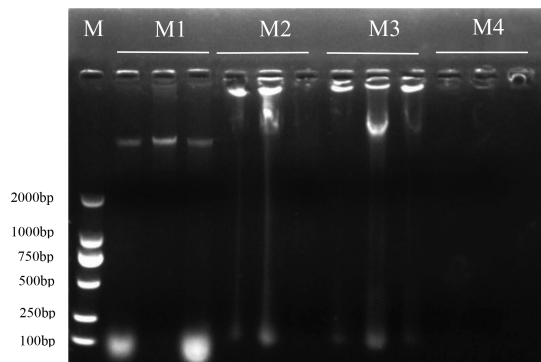
表 3 四种方法提取 DNA 的浓度与纯度

DNA 质量	DNA 提取方法				
	样品编号	M1	M2	M3	M4
DNA 浓度 ($\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$)	S1	229.08	362.73	184.81	21.33
	S2	488.98	619.81	423.72	40.12
	S3	207.19	297.25	306.61	49.18
	平均值	308.42±90.50a	426.60±98.44a	305.05±68.97a	36.88±8.20b
DNA 纯度 (A_{260}/A_{280})	S1	1.98	2.03	2.09	1.13
	S2	1.90	2.02	2.02	1.34
	S3	1.91	1.30	2.18	1.08
	平均值	1.93±0.03a	1.78±0.24a	2.10±0.05a	1.18±0.08b
DNA 纯度 (A_{260}/A_{230})	S1	1.72	1.48	1.03	0.34
	S2	1.91	1.81	1.70	0.51
	S3	1.95	1.15	1.15	0.32
	平均值	1.86±0.07a	1.48±0.19ab	1.29±0.21b	0.39±0.06c

注:同一行中不同字母表示差异显著($P<0.05$)。

2.2 DNA 凝胶电泳

凝胶成像结果显示(图 1),M1 的 DNA 条带清晰,亮度适中,点样孔干净无污染,说明 DNA 浓度较高且纯度好;M2 和 M3 的条带弥散,点样孔较亮,有明显的蛋白质污染物残留,说明 DNA 纯度不高;M4 的条带不明显,说明 DNA 浓度很低,质量较差。这一结果与 DNA 浓度、纯度的测定结果一致。

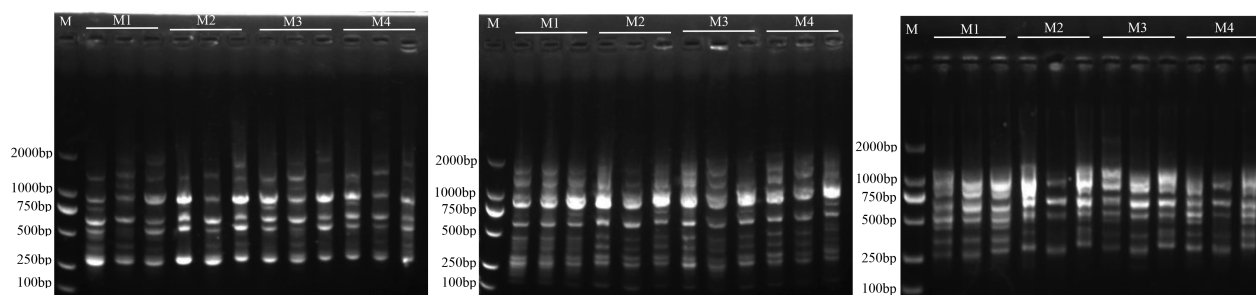


注:M 表示 marker,条带从上到下依次为:2 000、1 000、750、500、250、100 bp。

图 1 DNA 琼脂糖凝胶电泳

2.3 PCR 扩增及凝胶电泳

ISSR-PCR 结果显示(图 2),采用 UBC808 引物进行 PCR 扩增,M1 方法在样品 S1、S2、S3 中扩增出的条带数介于 7~8,共 23 条;M2 扩增出的条带数介于 5~8,共 19 条;M3 扩增出的条带数介于 6~7,共 19 条;M4 扩增出的条带数介于 6~7,共 19 条。采用 UBC842 引物进行 PCR 扩增,M1 方法在样品 S1、S2、S3 中扩增出的条带数介于 10~12,共 32 条;M2 扩增出的条带数介于 8~9,共 26 条;M3 扩增出的条带数均 9 条,共 27 条;M4 扩增出的条带数介于 7~9,共 25 条。采用 UBC889 引物进行 PCR 扩增,M1 方法在样品 S1、S2、S3 中扩增出的条带数介于 6~7,共 20 条;M2 扩增出的条带数介于 5~6,共 15 条;M3 扩增出的条带数介于 6~7,共 19 条;M4 扩增出的条带数介于 5~7,共 18 条。可见,M1 的 DNA 均能扩增出稳定性好、多态性高的 PCR 产物,且电泳条带清晰,其余 3 种方法的 PCR 产物条带数少,且相对模糊,说明 M1 方法获得的 DNA 更适合用于分子生物学研究。



注:从左往右分别为引物 UBC808、UBC842、UBC889 的 PCR 扩增产物凝胶电泳图。M 表示 marker,条带从上到下依次为:2 000、1 000、750、500、250、100 bp。

图2 PCR 扩增的凝胶电泳

3 结论与讨论

3.1 讨论

CTAB 法(M2)是提取植物基因组 DNA 的传统方法^[14]。基于 CTAB 法提取植物 DNA 大多能够获得成功,但应用于天师栗叶片 DNA 提取的结果并不理想。由于天师栗叶片内存在较多的多糖、多酚等次生代谢物质,导致常规 CTAB 法获得的 DNA 纯度不高,电泳条带弥散,点样孔处较亮,有明显的蛋白质、多糖等大分子污染物残留^[15]。改良 CTAB 法(M3)增加了聚乙烯吡咯啉酮(PVP-40)与 β -巯基乙醇的使用,这两种药剂在抑制酚类物质褐化中具有一定作用^[16],但在天师栗中的实际效果仍不理想, DNA 的质量与 M2 差异并不明显。0.5% SDS 法(M4)采用 SDS 作为裂解细胞壁的药剂,并添加了 PVP-40,但 DNA 的质量仍不理想,表现为浓度低、质量差,说明 DNA 可能存在较严重的多糖、盐类物质的污染^[17]。

2% SDS 多重纯化法(M1)首先采用 $0.4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 葡萄糖缓冲液对叶片样品进行预处理,除去了部分杂质。然后使用 2% SDS 作为裂解液,释放出核酸,再通过提高盐浓度(KAC 溶液)和冰浴处理,使蛋白质、多糖等杂质更易于去除^[18]。同时,在利用氯仿-异戊醇去除蛋白等杂质的基础上,通过增加 8% CTAB/NaCl 和 CTAB 纯化缓冲液的处理,可达到多次去除杂质,纯化 DNA 的目的。加入 TE buffer 溶解 DNA 沉淀的同时加入 Rase A 和 CTAB 纯化缓冲液,可再次达到去除 RNA、酚类等物质的目的。最后,再次用氯仿-异戊醇抽提,并采用高浓度 NaCl 和无水乙醇沉淀 DNA,可达到再次去除蛋白质、多糖、多酚等次生代谢产物,

纯化 DNA 的目的^[19,20,21]。因此,采用 M1 方法提取的 DNA 纯度好,在不同样品之间表现稳定;IS-SR-PCR 产物条带清晰、多态性高,进一步表明 M1 方法提取的 DNA 质量高,适合开展分子生物学研究。

3.2 结论

DNA 浓度与纯度的检验结果表明,M1(2% SDS 多重纯化法)提取的 DNA 浓度高、纯度好、稳定性好,ISSR-PCR 产物条带清晰、多态性高,适合开展分子生物学研究。

参 考 文 献

- [1]牛泱平. β -七叶皂苷抗白血病作用研究及分子机理探讨[D]. 杭州:浙江大学,2008.
- [2]石召华,叶利春,关小羽,等. 娑罗子药材 HPLC 指纹图谱的建立及其在药材鉴定中的应用[J]. 中国实验方剂学杂志,2018,24(14):52-56.
- [3]文楚毛. 冬凌草和娑罗子的化学成分及其生物活性研究[D]. 武汉:中南民族大学,2020.
- [4]王连学,马挺,梁丹,等. 天师栗种子采集与贮藏方法[J]. 河北林业科技,2016(4):97-99.
- [5]曹慧娜,刘喜坤,阮静雅,等. 天师栗种子中黄酮类成分的分离与结构鉴定[J]. 沈阳药科大学学报,2023,40(2):144-150,157.
- [6]杜文杰,石召华,叶利春,等. 娑罗子本草考证[J]. 中成药,2018(2):425-428.
- [7]吕恒顺. β -七叶皂甙钠的生产与建议[J]. 医药导报,1997(6):310.
- [8]李保会,张芹,史宝胜,等. 不同叶龄七叶树叶片面积,叶色及主要物质含量变化研究[J]. 河北农业大学学报,2007,30(5):32-35.

(下转第 56 页)