

吴 翼, 刘 蕊, 郭爱汕, 等. 硅胶干燥对棕榈科植物 DNA 提取效果的影响[J]. 江苏农业科学, 2019, 47(18): 83–86.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.18.017

硅胶干燥对棕榈科植物 DNA 提取效果的影响

吴 翼¹, 刘 蕊¹, 郭爱汕², 李 静¹, 杨耀东¹

(1. 海南省热带油料作物生物学重点实验室/中国热带农业科学院椰子研究所, 海南文昌 571339; 2. 海南热带海洋学院, 海南三亚 572022)

摘要:应用硅胶干燥法对棕榈科 3 个不同属作物椰子、油棕和槟榔的叶片经干燥处理后置于不同温度条件下保存 3 个月, 以新鲜叶片为对照, 采用简易十六烷基三甲基溴化铵 (CTAB) 法提取基因组 DNA, 分析硅胶干燥处理后对 DNA 提取效果的影响。研究表明, 硅胶干燥法处理的叶片提取的基因组 DNA 质量较好, 与对照无明显差异, 完全可以应用于后续的分子生物学研究。硅胶干燥法处理的叶片在常温条件下保存即可达到后续试验的要求, 这为今后棕榈科植物试验材料的中短期保存提供了新的途径。

关键词:棕榈科植物; 硅胶干燥; DNA 提取; 椰子; 油棕; 槟榔

中图分类号: S590.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2019)18-00863-03

棕榈科植物是单子叶植物中一个非常有特色的植物类群, 全世界共有 200 多属 3 000 余种, 主要分布于热带和亚热带地区。原产于美洲、澳洲的棕榈科植物种类最多, 约有 100 属 1 400 种, 少数原产于非洲和欧洲^[1], 原产于我国的有 18 属 117 种, 主产地为云南、广东、海南、广西、台湾、福建、四川、湖南、江西、贵州, 西藏的一些温暖地区也有分布^[2]。

提取完整的基因组 DNA 是分子生物学研究的起点。野外采集叶片材料时往往很难及时带回实验室进行低温保存而使材料发生褐变, 严重影响 DNA 的提取效果。硅胶脱水干燥法保存植物样品操作方便, 不受时间限制, 已在多种作物中应用^[3-9], 均取得较好的效果, 而在棕榈科植物上的应用未见报道。本研究对棕榈科植物椰子、油棕和槟榔的叶片分别采用硅胶脱水干燥后置于 25 ℃、-20 ℃ 和 -80 ℃ 保存 3 个月, 以新鲜叶片为对照, 采用简易十六烷基三甲基溴化铵 (CTAB) 法对 3 种不同处理的样品进行基因组 DNA 提取效果的比较分析, 探讨硅胶干燥叶片对棕榈科植物 DNA 提取的影响, 以期今后棕榈科植物材料的长期保存提供新的方法。

1 材料与方法

1.1 试验材料

以椰子、油棕和槟榔 3 种棕榈科植物为试验材料, 均采自中国热带农业科学院椰子研究所种质圃。取完全展开的新鲜叶片, 用变色硅胶干燥后置于 25 ℃ (常温)、-20 ℃ 和 -80 ℃ 保存 3 个月, 同时以新鲜叶片为对照 (CK)。

1.2 试验方法

1.2.1 DNA 的提取方法

采用 CTAB 法, 参考吴翼等的方

法^[10], 具体步骤: (1) 取约 2 g 幼叶新鲜材料或约 1 g 干燥材料在研钵中加液氮迅速研磨成粉末, 转入 15 mL 离心管中, 加约 5 mL 提取液, 摇匀, 置于冰上, 将所有材料研磨完后, 进行下一步操作。 (2) 离心 (5 min, 8 000 r/min, 4 ℃), 弃去上清 (小心管内粉末)。再次加入约 5 mL 提取缓冲液, 摇匀, 离心 (5 min, 8 000 r/min, 4 ℃), 小心弃去上清。 (3) 在管中加入 5 mL 65 ℃ 预热的裂解液, 摇匀。65 ℃ 水浴 90 ~ 120 min, 每 30 min 摇 1 次。 (4) 裂解后冷却 2 min, 加等体积三氯甲烷 + 异戊醇 (体积比 24 : 1) 抽提液, 摇匀 (摇 50 次左右, 再涡旋约 2 min) 至乳浊液。15 min, 8 000 r/min, 25 ℃ 离心。 (5) 吸取上清, 转入新的 15 mL 离心管, 加入 0.6 倍体积的冰冻异丙醇和 0.1 倍体积的 3 mol/L 乙酸钠 (pH 值 5.2), 缓慢摇匀至沉淀析出。 (6) 将离心管离心 (3 min, 8 000 r/min, 25 ℃)。再将沉淀转入 2 mL 离心管, 用 70% 乙醇 1 mL 洗涤 2 次。加 70% 乙醇 1 mL 浸泡过夜。 (7) 去盐离子及可溶于乙醇的杂质: 次日, 用 70% 乙醇 1 mL 洗 1 次, 自然风干或者离心干燥后加 0.7 mL 的灭菌水溶解。 (8) 加等体积酚 + 三氯甲烷 + 异戊醇 (体积比 25 : 24 : 1) 抽提液, 冷却 2 min, 摇匀 (约 50 次后再涡旋 30 s), 离心 (15 min, 8 000 r/min, 25 ℃)。 (9) 取上清加等体积三氯甲烷 + 异戊醇 (体积比 24 : 1) 抽提液, 冷却后, 摇匀 (约 50 次后再涡旋 30 s), 离心 15 min, 8 000 r/min, 25 ℃。 (10) 吸取上清, 加入 2 倍体积的冰冻乙醇和 0.1 倍体积的 3 mol/L 乙酸钠 (pH 值 5.2), 缓慢摇匀至沉淀析出。-20 ℃ 下放置 1 h 以上。 (11) 离心 (3 min, 8 000 r/min, 25 ℃), 用 0.1 mL 枪头吸干, 再用 70% 乙醇洗 2 次 (去盐离子)。尽可能吸干净乙醇, 自然风干或者离心干燥至 DNA 略有潮湿, 用 TE (根据 DNA 多少确定用量) 溶解, -20 ℃ 保存备用。

1.2.2 DNA 检测方法 (1) 紫外分光光度计检测。取 2 μL DNA 样品加 ddH₂O 稀释 50 倍至 100 μL, 用紫外分光光度计测定 $D_{230\text{ nm}}$ 、 $D_{260\text{ nm}}$ 、 $D_{280\text{ nm}}$ 以及 $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 值和 $D_{260\text{ nm}}/D_{230\text{ nm}}$ 值, 判断 DNA 的纯度; 再根据公式计算 DNA 样品浓度, 具体公式: DNA 样品浓度 = $D_{260\text{ nm}}$ × 稀释倍数 × 50/1 000。 (2) 2% 琼脂糖凝胶电泳检测。取出一定量的 DNA, 稀释成

收稿日期: 2018-08-31

基金项目: 中国热带农业科学院基本科研业务费专项资金 (编号: 1630152017019、1630152017007)。

作者简介: 吴 翼 (1980—), 男, 海南文昌人, 硕士, 助理研究员, 主要从事热带作物遗传育种研究。E-mail: wuyi-scuta@163.com。

通信作者: 杨耀东, 博士, 副研究员, 主要从事热带作物遗传育种研究。E-mail: yyang8@qq.com。

100 ng/ μ L,取 8 μ L 在 2% 琼脂糖凝胶上电泳,在凝胶成像系统下观察、拍照,根据 λ - DNA 判断基因组 DNA 的分子质量和大小。(3)简单重复序列(SSR) - PCR 扩增检测。分别以所提取的 DNA 为模板进行 SSR - PCR 扩增。所用 SSR 引物 Co107 的序列分别为 5' - CAGTAGTGCCCAAGAATAGA - 3' 和 5' - TGCCTCACACACACACAG - 3',由 Bioneer 公司合成; 25 mmol/L MgCl₂, 4 \times 10 mmol/L dNTPs, 5 U/ μ L *Taq* DNA 聚合酶、10 \times *Taq* Buffer 均购自生工生物工程(上海)股份有限公司。PCR 扩增在 TaKaRa - TP 600 扩增仪上进行,其扩增体系与扩增程序如下:总体积为 20 μ L,其中 10 \times PCR Buffer 2.0 μ L, dNTPs (各 2.5 mmol/L) 0.5 μ L, SSR 引物(10 pmol/ μ L) 各 1.0 μ L, *Taq* DNA 聚合酶 1 U, MgCl₂ (25 mmol/L) 1.5 μ L, 模板 DNA (20 ng/ μ L) 2 μ L。扩增程序

如下:94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min;94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,55 $^{\circ}$ C 退火 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s,25 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min,4 $^{\circ}$ C 保存。

2 结果与分析

2.1 紫外分光光度法检测结果

CTAB 法提取的 DNA 沉淀呈透明胶状,没有酚类氧化或其他色素造成的污染。由表 1、表 2、表 3 可见,DNA 溶液的 $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 值大部分为 1.70 ~ 1.90, $D_{260\text{ nm}}/D_{230\text{ nm}}$ 值在 2.0 左右,进一步说明提取的 DNA 较纯, RNA 较少,多糖、蛋白质、酚类等杂质污染也较少。与对照组(CK)相比,硅胶干燥处理的叶片所提取的 DNA 的 $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 值和 $D_{260\text{ nm}}/D_{230\text{ nm}}$ 值较接近,无明显差异。

表 1 椰子的紫外分光光度法检测结果

处理	重复	原液浓度 (μ g/ μ L)	$D_{260\text{ nm}}$	$D_{280\text{ nm}}$	$D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 值	$D_{260\text{ nm}}/D_{230\text{ nm}}$ 值	$D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 平均值	$D_{260\text{ nm}}/D_{230\text{ nm}}$ 平均值
CK	1	0.60	0.242	0.126	1.92	1.66	1.94	1.96
	2	0.23	0.091	0.047	1.95	1.80		
	3	0.81	0.323	0.165	1.96	2.42		
干燥后 25 $^{\circ}$ C 保存	1	1.45	0.581	0.306	1.90	2.12	1.92	2.21
	2	2.29	0.916	0.473	1.94	2.29		
	3	1.51	0.602	0.313	1.92	2.22		
干燥后 -20 $^{\circ}$ C 保存	1	0.79	0.316	0.176	1.80	2.37	1.90	2.02
	2	0.14	0.055	0.028	2.01	1.80		
	3	0.28	0.110	0.058	1.90	1.89		
干燥后 -80 $^{\circ}$ C 保存	1	0.75	0.300	0.164	1.84	1.18	1.85	1.59
	2	0.23	0.090	0.048	1.88	1.77		
	3	0.39	0.155	0.085	1.82	1.83		

表 2 油棕的紫外分光光度法检测结果

处理	重复	原液浓度 (μ g/ μ L)	$D_{260\text{ nm}}$	$D_{280\text{ nm}}$	$D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 值	$D_{260\text{ nm}}/D_{230\text{ nm}}$ 值	$D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 平均值	$D_{260\text{ nm}}/D_{230\text{ nm}}$ 平均值
CK	1	0.16	0.062	0.031	2.01	1.65	1.93	1.83
	2	0.41	0.164	0.090	1.83	1.78		
	3	1.14	0.455	0.235	1.94	2.05		
干燥后 25 $^{\circ}$ C 保存	1	1.03	0.411	0.230	1.78	2.08	1.88	2.27
	2	0.35	0.139	0.073	1.90	2.51		
	3	1.06	0.422	0.216	1.95	2.22		
干燥后 -20 $^{\circ}$ C 保存	1	1.79	0.717	0.375	1.91	2.22	1.87	1.91
	2	1.27	0.508	0.277	1.84	1.60		
	3	0.50	0.198	0.105	1.87	1.91		
干燥后 -80 $^{\circ}$ C 保存	1	0.44	0.177	0.090	1.96	2.10	1.90	2.10
	2	0.95	0.381	0.199	1.91	2.06		
	3	1.67	0.666	0.363	1.84	2.14		

2.2 琼脂糖凝胶电泳检测结果

根据琼脂糖凝胶电泳结果(图 1、图 2、图 3)可以看出,3 种棕榈科植物材料提取的 DNA 条带整齐、清晰、无明显弥散现象,表明 DNA 完整性较好,降解较少。点样孔亮度微弱,表明提取到的 DNA 纯度高,蛋白质、酚类及多糖类等杂质去除得较彻底。由图 1 和图 2 可知,椰子、油棕各个处理所提取的 DNA 纯度都较好,条带整齐、清晰,与 λ DNA 接近。硅胶干燥处理的叶片所提取的 DNA(泳道 4 ~ 12)与对照组(泳道 1 ~ 3)无明显差异;图 3 显示,槟榔各个处理的 DNA 条带均暗于 λ DNA,硅胶干燥处理的叶片所提取的 DNA(泳道 4 ~ 12)均

略有降解现象,相比如对照组(泳道 1 ~ 3)DNA 质量差。

2.3 基因组 DNA 的 PCR 扩增结果

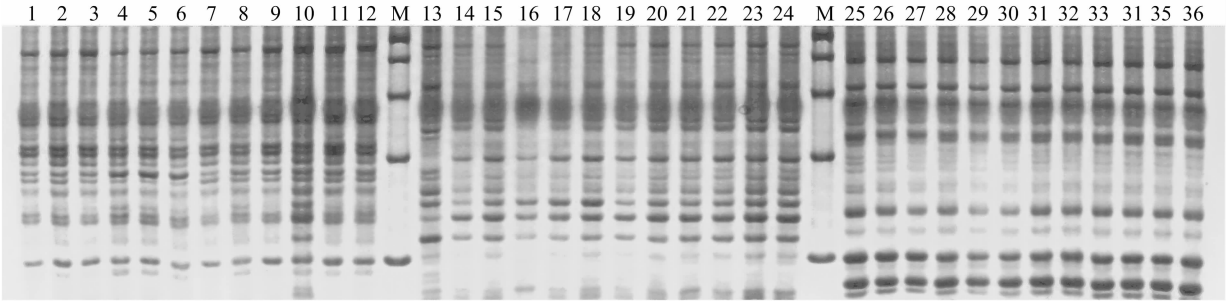
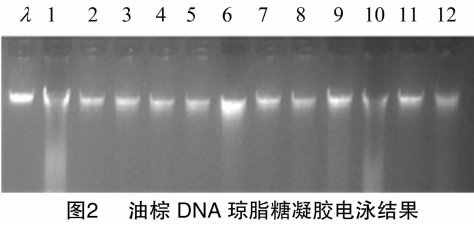
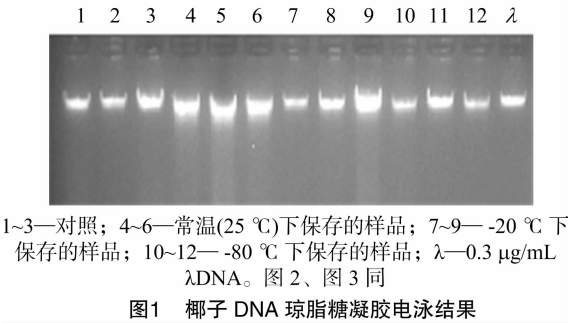
用 SSR 引物 Co107 对所提取的 DNA 进行 PCR 扩增,扩增产物经 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测。由图 4 可知,3 种棕榈科植物的不同处理所提取的 DNA 均获得了清晰的扩增条带。从硅胶干燥处理样品中提取的 DNA 与从鲜叶中提取的 DNA 采用同一引物扩增,所得谱带基本无差异。

3 讨论

CTAB 是一种强去污剂,能溶解细胞膜,还能有效地去除

表 3 槟榔的紫外分光光度法检测结果

处理	重复	原液浓度 ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	$D_{260\text{ nm}}$	$D_{280\text{ nm}}$	$D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 值	$D_{260\text{ nm}}/D_{230\text{ nm}}$ 值	$D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 平均值	$D_{260\text{ nm}}/D_{230\text{ nm}}$ 平均值
CK	1	0.81	0.322	0.147	2.19	1.66	1.92	1.74
	2	0.48	0.192	0.104	1.85	1.99		
	3	1.94	0.775	0.448	1.73	1.56		
干燥后 25 ℃ 保存	1	3.10	1.238	0.679	1.82	1.91	1.81	1.96
	2	2.55	1.018	0.621	1.64	1.74		
	3	4.67	1.868	0.952	1.96	2.23		
干燥后 -20 ℃ 保存	1	4.64	1.857	1.044	1.78	1.98	2.01	2.23
	2	0.92	0.368	0.173	2.13	2.17		
	3	2.06	0.823	0.389	2.12	2.53		
干燥后 -80 ℃ 保存	1	2.60	1.054	0.526	2.00	2.22	2.00	2.19
	2	3.25	1.300	0.646	2.01	2.24		
	3	1.94	0.778	0.394	1.98	2.11		



椰子(1 ~ 12)、油棕(13 ~ 24)和槟榔(25 ~ 36), 样品顺序均为对照(3 个重复)、25 ℃(3 个重复)、-20 ℃(3 个重复)、-80 ℃(3 个重复)、M(DNA marker 1)。marker 大小由下往上依次是100、200、300、400、500 bp

图4 PCR 扩增结果

紫外分光光度计检测结果表明,从硅胶干燥处理的叶片样品中提取的 DNA,纯度较高,其 $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 值为 1.70 ~ 1.90, $D_{260\text{ nm}}/D_{230\text{ nm}}$ 值约为 2.0, 与从新鲜叶片样品中提取的 DNA 无明显差异,这与李学营等的研究结果^[4,7,11] 相似,表明叶片干燥处理后置于不同温度(25 ℃, -20 ℃, -80 ℃)短期保存(3 个月),其 DNA 质量也无明显差异。琼脂糖凝胶电泳结果进一步表明,硅胶干燥处理的叶片仍能提取出高质量的 DNA,除槟榔的 DNA 略有降解外,椰子和油棕干燥处理的叶片提取的 DNA 与对照组无明显差异,表明叶片干燥处理后短

糖类杂质。目前此法已经被广泛地应用于植物基因组 DNA 的提取。本研究结果进一步表明,CTAB 法不仅适合椰子、油棕和槟榔等棕榈科植物新鲜叶片的 DNA 提取,同时也适合棕榈科植物硅胶干燥叶片的 DNA 提取。

本研究在 DNA 提取的过程中发现,新鲜叶片在研磨时较干燥叶片更容易些;新鲜叶片在研磨完成时须快速转入离心管中,并添加含有聚乙烯吡咯烷酮(PVP)和 β -巯基乙醇的提取液,否则容易引起褐化,而干燥叶片研磨后也不易褐化,这与何天明等的研究结果^[6] 相同;新鲜叶片置冰箱冷冻后取出,有冻伤现象,出现水渍状,而干燥叶片无此现象。

期保存(3 个月)于不同温度(25 ℃, -20 ℃, -80 ℃)条件下,其 DNA 质量也无明显差异。通过 SSR-PCR 扩增检测,发现所有提取的 DNA 均能扩增出清晰一致的条带,进一步表明从硅胶干燥处理叶片中提取的 DNA 质量较好,能满足分子生物学试验的要求,这对远距离取样研究棕榈科植物居群遗传多样性是很有用的。

4 结论

从硅胶干燥处理的棕榈科植物叶片样品中提取的 DNA

赵志新, 王星星. 植物三萜皂苷代谢中达玛烷合成酶和 β -香树脂合成酶的生物信息学分析[J]. 江苏农业科学, 2019, 47(18): 86-92.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.18.018

植物三萜皂苷代谢中达玛烷合成酶和 β -香树脂合成酶的生物信息学分析

赵志新¹, 王星星²

(1. 商洛学院生物医药与食品工程学院, 陕西商洛 726000; 2. 西藏阿里地区中等职业技术学校, 西藏阿里 859000)

摘要: 搜集 4 种植物的 10 条达玛烷合成酶及 22 种植物的 30 条 β -香树脂合成酶, 利用生物信息学工具对这 2 种三萜皂苷代谢关键酶的理化性质、蛋白特性及进化亲缘关系等进行分析。理化性质分析显示, 这 2 种酶的氨基酸序列在氨基酸数目、组成、分子量、理论 pI 和脂肪指数等方面均表现出较强的一致性; 同时, 这 2 种酶的糖基化位点具有高度的保守性, 并且大豆(2)、绿玉树、木榄这 3 条 β -香树脂合成酶序列有极大的可能性有糖基化位点; 信号肽预测分析表明, 这 2 种酶没有明确的信号肽; α -螺旋和无规则卷曲是多肽链中主要存在的二级结构元件; 系统进化树显示序列间差异较小, 并且聚类结果与序列的科属特性相一致。不同植物的达玛烷合成酶和 β -香树脂合成酶蛋白特性差别不大, 进化距离也比较近, 说明这 2 种酶具有较高的保守性和稳定性。这有助于理解达玛烷合成酶和 β -香树脂合成酶的保守结构域及进化变异, 为研究这 2 种酶的酶学特征及三萜皂苷代谢提供帮助。

关键词: 达玛烷合成酶; β -香树脂合成酶; 生物信息学分析; 三萜皂苷; 理化性质; 蛋白特性; 进化亲缘关系; 糖基化位点; 保守结构域; 酶学特征

中图分类号: S188 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2019)18-0086-07

三萜皂苷类化合物在自然界中分布广泛, 菌类、蕨类、单子叶植物、双子叶植物、动物及众多海洋生物均可产生, 尤以双子叶植物含量最佳。目前在大参、三七等药用植物中的研究比较成熟, 同时在桔梗中三萜皂苷的含量也比较高^[1]。三萜皂苷是一类重要的植物次生代谢产物, 具有抗癌、抗病毒、降低胆固醇等药理作用^[2], 但三萜皂苷结构和生物合成途径

复杂, 在植物产量低, 提取成本高, 因此, 对三萜皂苷生物合成途径研究并通过合成生物学等方法生产三萜皂苷已成为研究热点, 合成生物学在三萜类药效成分或其前体的大规模生产应用方面具有广阔前景^[3-6]。

达玛烷合成酶(dammarenyldiol synthase, 简称 DS)和 β -香树脂合成酶(β -amyrin synthase, 简称 β -AS)同属氧化鲨烯环化酶(oxidosqualene cyclase, 简称 OSC)家族, 催化 2,3-氧化鲨烯环化合成达玛烷二醇和 β -香树脂素, 它们分别是合成达玛烷型和齐墩果烷型三萜皂苷的关键酶^[1]。近年来, 随着植物次生代谢途径(甾醇类化合物、丹参酮和紫杉醇等生物合成途径)及其关键酶基因研究的深入, 越来越多的关键酶

收稿日期: 2019-01-15

基金项目: 国家级大学生创新创业训练计划(编号: 201811396018X)。

通信作者: 赵志新(1982—), 男, 河南滑县人, 博士, 讲师, 从事药用植物转录组代谢及基因组进化研究。E-mail: zxzhaol@slxy.edu.cn。

质量较好, 能满足分子生物学试验的要求; 叶片干燥处理后短期保存(3 个月)于不同温度(25 ℃, -20 ℃, -80 ℃)条件下, 其 DNA 质量无明显差异; 硅胶快速干燥叶片法能解决在棕榈科植物种质资源调查与收集时, 不能及时将新鲜材料带回实验室而引起的褐化问题, 同时干燥后的叶片长期保存不易变质, 在 DNA 提取过程中也不易产生褐化。因此, 硅胶干燥法是一种简便实用的理想方法。

参考文献:

- [1] 黎扬辉. 几种值得推广的新棕榈植物[J]. 广东园林, 1998(2): 36-37.
- [2] 王春路. 利用 ITS 序列和 matk 序列探讨中国部分原生棕榈科植物的亲缘关系[D]. 厦门: 厦门大学, 2007.
- [3] 王婷, 周凤琴, 李佳, 等. 忍冬干叶基因组 DNA 提取方法的研究[J]. 中华中医药学刊, 2008, 26(3): 496-498.
- [4] 李学营, 彭建营, 彭士琪. 部分枣属植物硅胶干燥叶片 DNA 提取方法的比较[J]. 河北农业大学学报, 2006, 29(1): 38-40.
- [5] 曾莉娟, 郑成木. 硅胶干燥早稻叶片制备 DNA 样品及其 RAPD 反应体系的建立[J]. 热带农业科学, 2002, 22(5): 9-12.
- [6] 何天明, 陈学森, 吴燕. 从蔷薇科果树硅胶干燥叶片中制备 DNA[J]. 石河子大学学报(自然科学版), 2004, 22(4): 316-319.
- [7] 曾斌, 罗淑萍, 李疆, 等. 硅胶干燥野扁桃叶片制备 DNA 样品及其 SSR 反应体系的建立[J]. 经济林研究, 2009, 27(1): 1-6.
- [8] 吕杰, 马媛, 金湘, 等. 硅胶干燥胡杨叶片 DNA 提取与 RAPD 反应体系的建立[J]. 北方园艺, 2011(14): 131-134.
- [9] 苏前, 吕杰, 任曼丽, 等. 硅胶干燥罗布麻叶片 DNA 提取及 RAPD 反应体系建立[J]. 新疆农业科学, 2013, 50(3): 524-529.
- [10] 吴翼, 武耀廷, 马子龙. 椰子基因组 DNA 的提取及 SSR 反应体系的优化[J]. 中国农学通报, 2008, 24(3): 417-422.
- [11] 张国防, 陈存及, 邢建宏. 樟树干叶 DNA 提取方法的研究[J]. 江西农业大学学报, 2006, 28(1): 111-114.