

景天属植物叶绿体 DNA 与核 DNA 分步提取方法研究

郝海叶, 张洋, 那冬晨* (山西师范大学生命科学学院, 山西临汾 041004)

摘要 [目的]研究景天属植物叶绿体 DNA 与核 DNA 分步提取方法。[方法]以景天属植物佛甲草、八宝景天、华北景天、费菜和垂盆草为研究材料,进行叶绿体 DNA 和核 DNA 的分步提取,通过琼脂糖凝胶电泳和 PCR 扩增进行检测。[结果]改进后的方法提取的核 DNA 和叶绿体 DNA 的质量好,纯度高。以叶绿体 DNA 和核 DNA 为模板进行 PCR 扩增均得到理想的条带,扩增率为 100%,重复性好。[结论]该研究为叶绿体 DNA 和核 DNA 的提取提供了新的思路。

关键词 景天属植物;叶绿体 DNA;核 DNA;分步提取

中图分类号 S188 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2013)25-10230-02

Step-by-step Extraction Method of Chloroplasts DNA and Nuclear DNA of *Sedum* Plants

HAO Hai-ye et al (College of Life Sciences, Shanxi Normal University, Linfen, Shanxi 041004)

Abstract [Objective] To study step-by-step extraction method of chloroplasts DNA and nuclear DNA of *Sedum* plants. [Method] With *Sedum lineare* Thunb., *Sedum spectabile* Boreau, *Sedum tatarinowii* Maxim, *Sedum aizoon* L. and *Sedum sarmentosum* Bunge as study material, step-by-step extraction of chloroplasts DNA and nuclear DNA were conducted. DNA was tested by agarose gelelectrophoresis and polymerase chain reaction. [Result] The results showed that better quality and higher purity chloroplasts DNA and nuclear DNA were obtained by improved method. The results of polymerase chain reaction from chloroplasts DNA and nuclear DNA templates were desirable, amplification rate of 100% and highly repeatable. [Conclusion] The study provides a new thought for extraction of chloroplasts DNA and nuclear DNA.

Key words *Sedum* plants; Chloroplast DNA; Nuclear DNA; Step-by-step extraction

景天属(*Sedum*)植物多为一年生或多年生草本肉质植物,在我国共有 124 种,1 亚种,14 变种以及 1 变型。其茎叶多汁液,耐旱性极强;花朵美丽,花色丰富;植株矮小,株高 20~50 cm;主要野生于岩石地带,山坡石缝,林下石质坡地及山谷石崖等处。景天属植物喜光照,适生温度为 15~18℃;部分种耐阴,对土质要求不严;喜湿润,但忌涝,性耐寒,宜于砂壤土生长。其营养丰富,富含蛋白质、糖类、脂肪、维生素、常量元素、微量元素和氨基酸等成分,大多可作为药膳野菜食用。近年来,国内外对景天属植物的研究多集中在繁殖方法、引种驯化、化学成份、生理生态特性和园林景观应用等方面。王艳玲等报道了几个景天品种在大庆地区的引种和应用^[1]。那冬晨等研究了华北景天叶片有机渗透调节物质对水分胁迫的响应^[2],并探索了水分胁迫对华北景天叶片结构和叶绿素含量的影响^[3]。在分子生物学研究中,DNA 的提取至关重要,但还处在初级阶段^[4-5]。笔者以 CTAB 法为基础,对景天属植物叶绿体 DNA 和核 DNA 进行分步提取,并进行了相关改进,旨在为景天属植物分子水平的研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料 佛甲草(*Sedum lineare* Thunb. T)和八宝景天(*Sedum spectabile* Boreau)采于山西省临汾市尧都区山西师范大学校园。该校园地处半干旱、半湿润的季风气候区,属暖温带大陆性气候,四季分明,雨热同期,冬寒夏热。华北景天、费菜和垂盆草(*Sedum sarmentosum* Bunge)于 2008 年 6 月采于山西省霍山七里峪国家森林公园,经过 4 年的栽培,长势良好。

基金项目 山西省大学生创新性实验项目(105075)。

作者简介 郝海叶(1991-),女,山西临汾人,本科,专业:生物科学。
* 通讯作者,副教授,博士,从事植物分子生物学研究, E-mail: 007ndc007@163.com。

收稿日期 2013-08-02

1.2 方法

1.2.1 叶绿体和核 DNA 分步提取方法的改进。①分别取景天属植物佛甲草、八宝景天、华北景天、费菜和垂盆草的新鲜叶片适量,放入预冷的研钵中,加入适量预冷的 0.35 mol/L 的 NaCl 溶液,充分研磨成浆。②吸取植物浆液 1.0 ml 放入 1.5 ml 的离心管中。③将离心管于 4℃,1 000 r/min 离心 15 min,取上清于另一离心管中,标记为 A,用于叶绿体 DNA 的提取。沉淀用于核 DNA 的提取,标记为 B,直接进入步骤⑤。④将 A 管中上清液在 4℃,3 000 r/min 离心 15 min,弃上清。⑤向沉淀中加入 700 μl 预热的浓度 2% 的 CTAB 溶液,迅速混匀,于 65℃水浴 20~30 min。⑥冷却至室温,加入等体积的氯仿异戊醇,作用 15 min;然后于 12 000 r/min 离心 10 min,取上清。再重复此步骤 1~2 次。⑦加入等体积遇冷的异戊醇,缓慢颠倒混匀,室温沉淀 10~15 min。⑧再于 12 000 r/min 离心 10 min,弃上清,用浓度 70% 乙醇洗涤沉淀 2~3 次,室温挥发乙醇后加适量的重蒸水溶解。

1.2.2 DNA 的检测。①琼脂糖凝胶电泳检测。用浓度 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳,在紫外光下观察。②PCR 检测。分别用 ropB 和 ITS2 序列引物对叶绿体 DNA 和核 DNA 进行 PCR 扩增,再用浓度 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳,在紫外光下观察。

2 结果与分析

2.1 琼脂糖凝胶电泳检测结果 图 1 和图 2 表明,用改进后的方法得到的核 DNA 条带较亮且清晰,说明核 DNA 的得率高,质量好;叶绿体 DNA 条带虽然没有核 DNA 亮,但质量较好,均能满足后续的相关分子生物学研究。

2.2 PCR 检测结果 从电泳结果可知,分别用 ropB、ITS 引物对,以提取的叶绿体 DNA 和核 DNA 为模板,进行 PCR 扩增均得到理想的条带,扩增率为 100% (图 3)。重复 3 次试验,扩增结果完全相同,说明 DNA 模板质量符合要求。



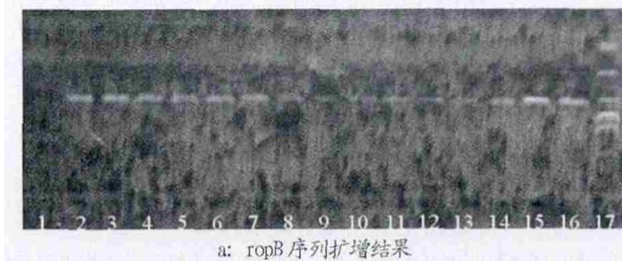
注: 1~6 为佛甲草; 7~18 为八宝景天; 19~24 为华北景天。1、2、3、7、8、9、10、11、12、19、20 和 21 为改进后提取的叶绿体 DNA; 4、5、6、13、14、15、16、17、18、22、23 和 24 为改进前提取的叶绿体 DNA。

图 1 叶绿体 DNA 琼脂糖凝胶电泳结果



注: 1、2 为佛甲草; 3、4 为八宝景天; 5、6 为华北景天; 7、8 为费菜; 9、10 为垂盆草。

图 2 方法改进后核 DNA 琼脂糖凝胶电泳结果



注: 1 为空白对照; 2~4 为佛甲草; 5~7 为八宝景天; 8~10 为华北景天; 11~13 为费菜; 14~16 为垂盆草; 17 为 DL2000。



图 3 PCR 扩增结果

3 结论与讨论

(1) 研究表明 不同的分子生物学研究目的需要不同类型的 DNA 模版。在 DNA 条形码序列研究中 需要对核 DNA 序列和叶绿体 DNA 序列进行 PCR 扩增。如果扩增叶绿体 DNA 序列时以总 DNA 作为模版 很难得到理想的结果。因此 有必要进行分步提取 得到纯度较高的叶绿体 DNA 和核 DNA。

(2) 在研磨植物材料时 试验采用 0.35 mol/L 的 NaCl 溶液作为研磨缓冲液 既简化了缓冲液的配制 也降低了成本 而提取的 DNA 质量较好 达到了后续分子生物学试验的要求。

(3) 景天属植物叶片中含有较多的碳水化合物 植物浆液成黏胶状。因此 在提取叶绿体 DNA 时 应尽量吸取淡绿色的上清液 避免带有植物碎屑 以保证提取的叶绿体 DNA

纯度。离心时 最好在 4 °C 条件下离心 有利于抽提。此外 室温下沉淀 DNA 可保证所得 DNA 的质量。

参考文献

- [1] 王艳玲. 几个景天品种在大庆地区的引种和应用[J]. 科技信息 2008 (32): 383.
- [2] 那冬晨 任彩琴 柴婷 等. 华北景天叶片有机渗透调节物质对水分胁迫的响应[J]. 北方园艺 2011(17): 96-98.
- [3] 那冬晨 王文斗 杨丽静 等. 水分胁迫对华北景天叶片结构和叶绿素含量的影响[J]. 安徽农业科学 2011 39(26): 15902-15903 15912.
- [4] 王欢欢 郭春景 张兴 等. 辐射八宝景天 ISSR 遗传多样性分析[J]. 北方园艺 2010(9): 149-151.
- [5] 李春霞 李宏飞. TAB 法高效提取苹果叶片 DNA 的研究[J]. 北方园艺 2009(2): 49-52.
- [6] NA D C, WANG W D, YANG L J, et al. Effect of Water Stress on the Structure and Chlorophyll Content of Sedum tatarinowii Maxim Leaves[J]. Medicinal Plant 2011 2(9): 40-42.

(上接第 10225 页)

究体系的光电性质。首先 辅助配体的改变对分子构型有影响; 其次 2 种配合物红外光谱振动频率和谱线强度差别较大是由于二者的主要振动模式不同。通过电子吸收光谱分析, 发现 2 种配合物联吡啶基和桥连嘧啶也有一定程度的贡献, 并且没有发现轨道间明显的简并现象。

参考文献

- [1] 唐敖庆 杨忠志 李前树. 量子化学[M]. 北京: 科学出版社 1982.
- [2] 徐光宪 黎乐民 王德民. 量子化学基本原理和从头计算法[M]. 北京: 科学出版社 1985.
- [3] 黄春晖 李富友 黄维. 有机电致发光材料与器件导论[M]. 上海: 复旦大学出版社 2005.
- [4] BARONE V, FABRIZI DE BIANI F, RUIZ E, et al. Electron Transfer in the $[Pt(NH_3)_4]^{2+} [W(CN)_8]^{3-}$ Donor-Acceptor System. The Environment

Effect: A Time-Dependent Density Functional Study[J]. J Am Chem Soc, 2001 123: 10742-10743.

- [5] ALDRIDGE T K, ELIZABETH M S, MCMILLIN D R. Studies of the room-temperature absorption and emission spectra of $[Pt(trpy)X]^+$ systems[J]. Inorg Chem 1994 33: 722-727.
- [6] TANG C W, VANSLYKE S A. Organic electroluminescent diodes[J]. Appl Phys Lett 1987 51(12): 913-917.
- [7] 符浩. 金属钷酰胺类有机小分子发光材料的合成与应用[D]. 无锡: 江南大学化学与材料工程学院 2008.
- [8] LEE C, YANG W, PARR R G. Development of the colle-salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density[J]. Phys Rev B 1998 37: 785-789.
- [9] 肖慎修 王崇愚 陈天朗. 密度泛函理论的离散变分方法及其在化学和材料物理学中的应用[M]. 北京: 科学出版社 1998.
- [10] PEUKERT V. A new approximation method for electron systems[J]. Journal of Physics C: Solid State Physics 1978 11: 4945-4956.