

系统与进化植物学中的 分子标记

邹喻苹 葛 颂 王晓东 编著

(中国科学院植物研究所系统与进化植物学开放研究实验室)

科学出版社

2001

内 容 简 介

本书深入浅出地阐述了 RAPD, PCR-RFLP, SSR 以及 AFLP 等常用分子标记技术的原理与方法以及有关的分子生物学背景知识;通过大量典型实例展示了上述分子标记在植物居群生物学、保护生物学、遗传资源保护和利用、品种鉴定及有关野生种亲缘关系分析以及植物系统发育研究中的广泛应用;通俗易懂地介绍了分子标记数据处理的基本原理和方法以及一些常用的数据分析软件。其内容力图反映上述领域的国际最新动态。本书可成为从事植物分子系统学、分子生态学、居群生物学、保护生物学、生物多样性研究的工作者和研究生以及从事这个领域管理工作的一本可读性较强的入门指南。本书对于从事遗传育种、植物生理与病理、园艺、环境保护、遗传病与流行病的检测与诊断、亲子鉴定以及法医诊断的工作者也颇具参考价值。

图书在版编目(CIP)数据

系统与进化植物学中的分子标记/邹喻苹,葛颂,王晓东编著.-北京:科学出版社,2000.12

ISBN 7-03-008711-9

I.系… II.①邹… ②葛… ③王… III.①分子-标记化合物-应用-植物-进化 ②分子-标记化合物-应用-植物分类学 IV.Q94

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2000)第 39442 号

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2001 年 2 月第 一 版 开本:787×1092 1/16

2001 年 2 月第一次印刷 印张:17 1/4

印数:1—1 500 字数:394 000

定价:39.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换〈环伟〉)

序

“系统与进化植物学”(systematic & evolutionary botany)也可以说就是广义的“植物分类学”(plant taxonomy)。它的生日应该是1753年,那时林奈发表了他的《植物种志》(Species Plantarum),双名法也随之问世了。这本划时代著作也标志着近代生物学的诞生。因此系统与进化植物学是生物学中历史最悠久的学科之一。虽然有着近两个半世纪的历史,系统与进化植物学离完成它的历史使命却还很遥远。按我们理解,这门学科应当回答三大问题:(1)形形色色、绚丽多采的植物世界有多少种类,如何对它们分门别类?(2)各类群之间是什么关系?(3)这种关系是如何形成的?可以说,迄今为止,哪一个问题也未有满意的答案。即便是第一个问题,至今仍有大量新分类群被发表,同时又有大量,甚至更多分类群被归并,被降级。这说明分类修订的任务依然十分艰巨!过去系统发育重建依据外部形态、解剖、胚胎和孢粉学等资料,而这些资料常常由于性状的平行进化、异速进化、趋同和逆转等原因而被扭曲。由此,不同学者会给同样的资料以不同的解释和权重,得出不同结论。古植物学资料是系统发育的直接记录,可惜特别在植物界,残缺不全。由于这些原因,植物学家在追求系统发育重建的征途上曾一度叹息过。这一领域的两位权威人士 Davis 和 Heywood 曾在《被子植物分类学原理》(Principles of Angiosperm Taxonomy)一书(1963)中说过:“达尔文后的系统发育系统是建立在错误的、非常可疑的假说上,我们无法说它们是对还是错。”这在不同程度上代表当时大多数学者的态度。在物种形成的研究方面,人们曾对物种生物学(biosystematics)寄予满腔热情,指望它能用杂交亲和性和遗传距离给物种的概念和划分以客观标准,清除分类中的主观性。到了20世纪60年代,这一曾在30~50年代十分活跃的学科,也一度徘徊于十字路口(1969年在美国西雅图召开的第11届国际植物学大会上曾有一个名为“十字路口的物种生物学”的学术报告会)。

当然,许多植物学家仍然在奋斗,在献身,在寻求更有力的手段,以解开系统与进化植物学中许多未解之谜。20世纪50年代诞生的分子生物学于60年代开始向这一领域渗透。1964年 Hoyer 等进行DNA杂交,以期探讨植物的亲缘关系;1974年 Boulter 等测定细胞色素c的氨基酸序列,建立分子树;1966年 Harris、Hubby 等学者同时利用电泳技术检测到居群内同工酶的多态性。这一切都使系统与进化植物学家兴奋不已。还是那位 Heywood 先生,13年后一改悲观情绪,于1976年在《植物分类学》一书中改口说“……这种技术将是直接而又客观地评价高层次分类群之间亲缘关系程度的惟一方法”,“打开了一个巨大而令人兴奋的新领域”。80年代更是系统与进化植物学迎来革命的年代。当然这一方面要归功于 Hennig 的分支系统学(分支分类学, cladistics)的渗入,但更为重要的是以 RFLP (restriction fragment length polymorphism, 酶切片段长度多态性)为起始的一系列DNA分子标记被引入这一领域。最使我激动的有两个例子(也许是我孤陋寡闻碰巧看到的两个例子)。其一是 Soltis 夫妇(1989,1990)利用 RFLP 标记不仅确定婆罗门参属在北美西部的杂种 *Theropogon miscellus* 为多次起源, *T. dubius* 和 *T. pratensis* 都曾作过它的母本,而且具体点出了来自哪个居群。其二是关于植物界最大的科——菊科的起源问题。Jansen 和

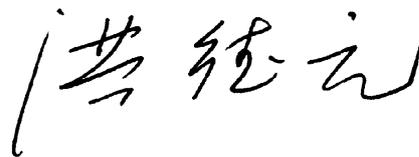
Palmer(1987)用 RFLP 为标记,揭示出菊科的 Bamadesiinae 亚族和其他三种亲缘关系遥远的陆地植物(地钱、裸子植物和碧冬茄)之间在叶绿体 DNA 顺序上一致,而菊科其他所有类群都发生了 22kb 的倒位。因而结论是明明白白的,倒位发生在 Bamadesiinae 起源之后。Bamadesiinae 是一个小类群,仅有两个属,分布于南美安第斯山脉。这就无可争辩地说明,菊科起源于南美。这两个事例使我们清楚地认识到,分子手段可以揭示进化事件,不带主观臆断;一个系统与进化植物学实验室不发展分子手段,不发展分子系统学(molecular systematics),就不会有光明前途。经过近 10 年的努力,我们实验室不仅建起了一个装备精良的分子系统学实验室,而且利用这一条件使一些类群,如桦木科、松科,特别是稻属的系统与进化研究跻身于世界前沿;保护遗传学(conservation genetics)的研究也在国内外产生了重要影响。

邹喻苹、葛颂两位研究员以及王晓东博士编著的这本书是他们经过近 10 年的实践,并掌握了大量的文献,融合理论与实践之后写成的。本书内容翔实,从实验到结果分析,从技术原理到应用范围都交待得清清楚楚。翻开本书的目录即可了解,本书介绍的方法和原理应用范围十分广泛,从分类群的系统发育重建、品种鉴定到居群生物学研究中的克隆鉴定、亲子检测、揭示交配系统,都能在本书找到合适的方法。只要选择的方法得当,就会快捷地得到结果,而且结论不再那么模棱两可。

我虽然对分子系统学的重要性有足够认识,但对其内容,却只知晓一鳞半爪。浏览邹喻苹研究员等编著的这本书之后更使我有分子手段是系统与进化植物学研究的法宝之感。本书对系统与进化植物学领域以及园艺、遗传育种领域的高年级学生、教师和研究人員一定大有裨益。有关领域的学术带头人和管理人员也会从中得到启示。分子手段就像一套新式武器,发展和传播异常迅速。本书的编著和出版一定会大大促进这一发展和传播的进度,推动系统与进化植物学的发展。本书的问世很是及时。我有幸成为第一位读者,我要感谢三位编著者对本学科所作的重大贡献。衷心感谢他们的辛勤劳动!

中国科学院院士

中国科学院植物研究所系统与进化植物学开放研究实验室主任



2000 年 4 月 9 日

前 言

植物系统学(plant systematics)是研究植物类群之间的关系和系统安排的一门植物学分支学科,常常和广义的植物分类学(plant taxonomy)等同,研究内容包括植物类群间的系统发育关系、进化的过程和机制以及类群的分类处理。为了更明确地强调其核心内容,近年来这门学科又被称为系统与进化植物学。由于植物系统学建立在生物学各分支学科基础上,体现了高度的综合性,因此生物学各分支学科的发展都会对系统与进化植物学研究产生重要的影响。

近 20 年来,分子生物学的迅猛发展以及向生命科学各个研究领域的广泛渗透,极大地促进了生物学各分支学科的发展。植物系统学这门古老学科也因此焕发了新的活力,取得了令人瞩目的成绩。分子生物学技术和方法在植物系统学和进化研究中的广泛应用,不仅提供了许多新的技术手段,在研究方法、策略上发生了变革,而且对一些传统的观念进行了挑战。因此,分子系统学和分子进化成为国际上该领域研究的热点,有关的研究成果频频出现在相关的重要刊物上,而且所占比重逐年增加。1989 年由 Hillis D.M. 和 Moritz C. 主编的《分子系统学》(Molecular Systematics)诞生,很快于 1996 年又推出了第二版。Li W-H. 也于 1997 年出版了极受欢迎的《分子进化》(Molecular Evolution)。Soltis P S, Soltis D E. 和 Doyle J J. 则组织植物系统和进化研究方面的权威于 1992 年编撰了《植物分子系统学》(Molecular Systematics of Plants),并于 1998 年出版了其姊妹篇《植物分子系统学 II》(Molecular Systematics of Plants II),对该领域的研究进行了精辟的概述和总结。与此同时,一批涉及 DNA 指纹技术及其他分子标记技术在该领域应用的专著也相继出版,受到广泛的关注,包括由 Weising K, Nybom H. 等四位博士 1995 年撰写的《植物与真菌中的 DNA 指纹分析》(DNA Fingerprinting in Plant and Fungi)以及 Schierwater B, De Salle R. 等 1994 年编著的《分子生态与进化:方法与应用》(Molecular Ecology and Evolution: Approaches and Application)等。这些新著为分子标记技术的原理、方法与应用提供了极其丰富的信息与宝贵的参考资料。

尽管生物技术和分子生物学等研究领域在我国已蓬勃开展起来,但国内植物分子系统学和分子进化领域的研究与国际先进水平的差距比较明显。这一方面在于我国基础性的编目工作仍未完成,还不可能投入大量的人力和财力开展分子系统学和进化方面的研究;另一方面也在于我们对分子系统学和分子进化研究的基本原理和意义认识不够。可喜的是,近些年来,国内一些研究所和大学已逐步建立起相关的研究条件并针对中国类群开展了富有成效的研究,但有关教科书和论著还很少。基于这样的考虑,我们着手编著了本书。希望通过广泛涉猎国内外有关文献,并结合我们自己的研究经验,向读者介绍目前 DNA 分子标记技术的基本原理、方法及其在植物系统学和进化研究中的应用,尤其是近年来在国内外所取得的成果和进展,为从事系统与进化植物学、生物多样性与保护生物学、生态学以及遗传学研究的科技工作者与研究生及有关的教学与管理工作者提供参考。鉴于分子标记技术在其他诸多领域如分子标记辅助育种、植物病理、园艺品种的鉴定与专

利申请、遗传病与流行病的诊断与治疗、亲子关系的鉴定以及法院破案等方面有广泛的应用,我们相信本书的读者面会比较宽,即使是从事上述领域工作的行政管理人員和实验室技术人员也值得一读。

本书共分为 12 章。第 1 至第 6 章由邹喻莘撰写;第 7 至第 9 章由葛颂撰写;第 10 至第 12 章和索引由王晓东撰写。前 6 章较为系统地介绍了在系统与进化植物学研究中常用的 DNA 分子标记技术,包括常用的分子生物学背景知识、各种分子标记技术的基本原理、具体的实验操作及其注意事项等等。对于基本原理,我们力求深入浅出,并使用大量图表来辅助说明;对于实验技术,则力图详细、清晰,以使初学者在了解各种方法基本原理的同时,可以马上着手进行实验。在随后的 5 章中,我们通过大量典型实例的介绍,展开了 DNA 分子标记在居群生物学、保护生物学、遗传资源保护和利用、栽培植物亲缘关系分析和植物系统学研究中的应用,旨在反映该领域所取得的主要成果和国际最新动态。在最后一章中,我们阐述了分子标记数据处理的基本原理和方法,同时介绍了一些常用的数据分析软件的最新版本。书后附录了重要术语和拉丁学名索引,以便于读者查询和检索书中的相关内容。

由于植物系统学所涉及的领域非常广,而分子生物学技术在该领域的应用又无处不在,不可能在一本书中面面俱到,因此本书的内容侧重于 DNA 分子标记的基本原理及其在居群和低分类水平上的应用,这在一定程度上反映了编著者的背景和擅长。中国科学院植物研究所系统与进化植物学开放研究实验室应用和改进了本书中提到的绝大部分实验技术,并积累了相当的经验。许多研究实例也是选自编著者自己的工作,尤其是在承担国家自然科学基金委“八五”重大项目期间,开放室建立和完善了一系列的实验研究体系,利用分子生物学手段针对中国的类群开展了较为深入的研究,同时培养了一大批具有实际工作经验的研究和技术人员。因此,我们对所有在本实验室工作过,对各种操作程序做出贡献的以及负责实验室管理的朋友们表示衷心的感谢。

感谢本开放室洪德元院士自始至终关心本书的写作并欣然作序;感谢中国农业大学阎隆飞院士以及本所张明理博士审阅书稿并提出宝贵建议;感谢张富民、郑治国、蔡美琳为本书绘制插图;感谢美国 Illinois 大学 Ashley 博士,荷兰 Wageningen 农业大学 Qi Xiaoquan 博士,中国农业科学院品种资源研究所杨凯博士,中国水稻研究所李云海博士,中国林业科学院刘丹硕士,中国科学院植物研究所植物园索志立博士,本开放实验室王晓茹、汪小全、黄锦岭、谢中稳、钱韦诸位博士提供有关的实验照片。

本书中所涉及的一些实验和研究结果承国家自然科学基金委“八五”重大项目(39391503)资助。本书的出版经费承蒙国家自然科学基金资助,特此致谢!

由于本书涉及的范围较广,加之这一学科领域近几年突飞猛进的发展,使我们面对浩如烟海的新文献、眼花缭乱的实验方法和功能多样的数据处理程序,感到虽几经修改,力求全面,但仍有不少有价值的资料和成果未能收录和介绍,原则上我们收集有关的资料截止到 1998 年。鉴于编著者的水平有限,疏漏之处在所难免,我们殷切期待着读者对本书的缺点和错误提出批评指正。

编著者

2000 年 3 月于北京香山

目 录

序

前言

第 1 章 关于分子标记的简短评述	(1)
1.1 多态性与分子标记	(1)
1.2 分子标记的性质与种类	(1)
1.3 分子标记技术的优越性与争论	(3)
1.4 分子标记的选择	(5)
第 2 章 植物 DNA 提取、纯化与鉴定	(9)
2.1 植物组织的收集与保存	(9)
2.2 植物 DNA 分离提取的关键问题	(13)
2.3 介绍几个常用的提取植物 DNA 的方案	(16)
2.4 植物 DNA 的浓缩与纯化	(22)
2.5 植物 DNA 的分析与鉴定	(26)
第 3 章 RAPD 标记	(30)
3.1 发展历史与工作原理	(30)
3.2 RAPD 检测的实验流程	(34)
3.3 反应成分与 PCR 程序对 RAPD-PCR 的影响	(36)
3.4 RAPD-PCR 的优缺点	(41)
3.5 RAPD 片段用作探针	(45)
3.6 RAPD 指纹的应用	(47)
第 4 章 PCR-RFLP	(52)
4.1 植物 RFLP 分析的历史回顾	(52)
4.2 限制性酶切位点分析的原理	(53)
4.3 DNA 序列的选择与限制	(56)
4.4 PCR-RFLP 分析的步骤	(62)
4.5 PCR-RFLP 的应用	(64)
第 5 章 微卫星标记	(68)
5.1 发现历史与命名	(68)
5.2 微卫星的丰度和真核基因组的可变性	(70)
5.3 基于杂交的 SSR 指纹	(81)
5.4 基于 PCR 的 SSR 指纹	(93)
5.5 微卫星位点的 PCR 扩增	(98)
5.6 SSR 标记在植物基因组分析中的应用	(103)
第 6 章 AFLP 标记	(108)

6.1	AFLP 的原理	(108)
6.2	引物与接头的设计	(109)
6.3	引物的筛选与 AFLP 指纹式样	(110)
6.4	AFLP 的实验流程	(111)
6.5	AFLP 技术的特点	(117)
6.6	AFLP 标记的应用	(118)
第 7 章	DNA 分子标记在植物居群生物学研究中的应用	(122)
7.1	植物个体鉴定和克隆结构的研究	(122)
7.2	亲本鉴定和父系分析	(124)
7.3	植物居群的遗传结构及其影响因素	(125)
7.4	植物的物种形成	(135)
第 8 章	DNA 分子标记在保护生物学研究中的应用	(140)
8.1	稀有和濒危物种的遗传多样性	(140)
8.2	物种濒危的因素及其遗传学效应	(144)
8.3	濒危物种保护的原理和策略	(146)
第 9 章	遗传资源研究、保护和利用中的 DNA 分子标记	(150)
9.1	植物遗传资源的调查、研究和采集	(150)
9.2	植物遗传资源的鉴定和评估	(155)
9.3	植物遗传资源的保存、管理和利用	(157)
第 10 章	分子标记与系统植物学研究	(161)
10.1	系统植物学研究进展概述	(161)
10.2	植物分子系统学的研究内容和方法	(162)
10.3	应用于系统植物学研究的分子标记	(165)
10.4	分子标记在系统植物学中的应用	(166)
第 11 章	分子标记在栽培植物亲缘关系分析中的应用	(178)
11.1	品种鉴定及其与野生近缘种的关系	(178)
11.2	分子标记辅助育种	(184)
第 12 章	分子系统学数据的处理与分析	(190)
12.1	数据的获得	(190)
12.2	统计学处理	(190)
12.3	表征分析与系统发育分析	(193)
12.4	常见分析软件介绍	(195)
参考文献		(210)
附录 1	植物学名索引	(240)
附录 2	缩写与专有名词	(254)
附录 3	核酸常用数据换算	(262)
附录 4	用于一些代表性类群表征或分支分析的 RAPD 研究	(263)

第 1 章 关于分子标记的简短评述

1.1 多态性与分子标记

在世纪之交的今天,科学家们已常规地使用生物大分子(蛋白质和核酸)的遗传信息来探究生命的历史和有机体的进化关系。随着分子生物学理论和技术的突飞猛进以及信息时代的到来,人们已将收集到的浩如烟海的分子数据整合到比较形态学、细胞学、系统学、生态学、古生物学和居群遗传学并加以比较与综合,使得这些历史悠久的古老学科变得生机勃勃。

DNA 自身拥有丰富的变异,组成 DNA 分子的碱基虽然只有 A、T、C、G 四种,碱基配对的方式也只有 A—T 和 C—G 两种,但碱基可以任何顺序排列。例如,RAPD 的引物是以任意顺序排列的 10 个碱基组成的寡核苷酸片段,它的排列方式可达 4^{10} ,因此用这些引物扩增出来的随机 DNA 片段的变异几乎是无限的,在理论上任何一个包含遗传信息的基因片段的多样性也几乎是无穷的。每个 DNA 分子的碱基顺序构成了 DNA 分子的特异性,不同的 DNA 链编码出完全不同的多肽链。DNA“多态性”(polymorphism)是描述 DNA 分子变异大小的一个术语,它适于解释居群水平上的遗传变异。

分子进化研究包括两方面的内容,一是研究特定遗传系统中变异的分子基础,即生物大分子自身进化的原因与结果,另一仅仅是应用分子生物学技术来揭示生物类群的系统发育和进化历程(Avise et al. 1994, Li. 1997)。研究这两个相互联系又相互区别的内容都要在分子水平上通晓遗传变异的式样和生物突变的性质等有关背景知识。

20 世纪 80 年代中期以来,应用日新月异的分子生物学技术直接或间接地检测生物大分子的一级结构,在基因组上寻找多态位点,用以揭示个体间或居群间的遗传变异或评估种间的亲缘关系。在生物系统与进化研究中,每个能反映遗传变异的,能提供系统学信息的多态位点称为一个分子标记;在遗传育种研究中每个与感兴趣的性状或目的基因连锁的多态位点也称为一个分子标记。能提供分子标记的分子生物学技术称为分子标记技术。

1.2 分子标记的性质与种类

1.2.1 蛋白质标记

在蛋白质多态性基础上发展的分子标记称为蛋白质标记,最常用的技术是蛋白质电泳及与其配套的专一性染色,例如种子蛋白的肽谱分析和迄今为止仍广为采用的等位酶分析。Prakash(1969)把同一基因位点上不同等位基因编码的同种酶的不同分子形式称为“等位酶”(allozyme),并把它从广义的同工酶(isozyme, Markert & Moller 1959,催化同一生化反应,在电泳中有不同迁移率的一种酶的多种形式)相区分,使得酶谱分析具深刻的遗传学意义,酶谱的变化反应了等位基因和位点的变化。30 多年来等位酶技术为动植物的居

群遗传学和进化研究,为栽培植物种质资源的研究、开发和利用作出了重要贡献(葛颂 1994,王中仁 1996,Harmrick & Godt 1990, Avise 1994)。有关等位酶分析的原理和方法详见有关专著(王中仁 1996,Myrphy et al. 1996)。

20 世纪 60 年代蛋白质序列分析(血红蛋白、细胞色素 c 等)积累了许多数据,在系统与进化研究中起过重要作用,例如对人—大猩猩—类人猿歧化时间的推测成绩卓著,并发现在不同的哺乳动物中,蛋白质的氨基酸替换速率大致恒定,在此基础上提出了分子钟假说(Zuckermandl & Pauling 1962, 1965)。由于氨基酸序列分析在技术上较麻烦,在以后的系统与进化的研究中逐渐被核苷酸的序列分析代替。

1.2.2 DNA 序列分析

在 DNA 一级结构水平上检测多态性最直接的方法是进行 DNA 的序列分析,即采用某种策略测定核苷酸在基因组 DNA 特定区域的排列顺序。序列分析可提供高度重复的、信息丰富的数据,适合于中等和高层次分类群的系统学研究,近年来用于居群水平的研究也逐渐增加(Hoelzel & Green 1998, Cummings & Clegg. 1998, Olsen & Schaal. 1999)。测序的策略多种多样,近几年由于 PCR 技术的广泛应用,在系统学研究中普遍采用 PCR 产物直接测序,配之以全自动测序仪和高灵敏的荧光检测,使得 DNA 序列分析成为快速而方便的常规手段。但值得注意的是,有时 PCR 产物会混合多个不同序列在内,此时需采用克隆测序来分辨,因此 PCR 测序不能完全代替克隆测序。DNA 序列分析的原理和方法及其在系统与进化研究中的应用和最新进展请见有关专著(陈之端等编译 1998, Hillis & Mable et al. 1996)。

1.2.3 DNA 指纹分析是重要的分子标记技术

Jefferes 等(1985a)第一次在人类基因组上发现了高变的“小卫星”区域,正式提出“小卫星”这个术语,奠定了 DNA 指纹技术的基础。他们当时描述了一种检测 DNA 变异的方法:采用专一的多位点探针(串联重复序列),与用限制性内切酶消化过的人类基因组 DNA 片段进行杂交,在电泳图谱上可同时检测到许多代表高变位点的,后来称之为 DNA 指纹的电泳带。Tautz 等(1984)发现的简单序列重复(simple sequence repeat,简称 SSR)为真核生物特有,后来被 Litt 等(1989)命名为“微卫星”。早期在杂交基础上进行的 DNA 指纹分析以及 90 年代初期在 PCR 基础上的 DNA 指纹分析集中反映在 1991 年和 1993 年召开的有关 DNA 指纹的两次国际会议上(Burk et al. 1991, Pena et al. 1993)。

20 世纪 90 年代以后由于 PCR 技术的广泛应用, DNA 的多态性可通过体外克隆方法快速、高效而灵敏地检测出来。于是 DNA 指纹分析不仅局限于杂交的方法,许多新的策略相应产生,在短短几年中,基于 PCR 的 RFLP、RAPD、SSR 和 AFLP 等新的 DNA 指纹技术犹如雨后春笋般层出不穷。如今这些在 PCR 基础上发展起来的检测 DNA 多态性的分子标记技术也称为 DNA 指纹技术。

本书重点对 RAPD(random amplified polymorphic DNA,随机扩增的多态性 DNA)指纹, SSR(即微卫星 DNA)标记,PCR-RFLP(基于 PCR 的限制性片段长度多态性)指纹以及 AFLP(限制性酶切片段的选择性扩增)指纹的原理、方法及其在系统与进化植物学研究中的应用分章节详细介绍,并涉及杂交和 PCR 两方面的技术。所有这些都是在一级结构的基础

上对 DNA 片段的序列进行间接分析(相对于 DNA 序列分析而言)的常用而有效的手段。这些分子标记技术在遗传育种、品种鉴定与专利申请以及遗传病的诊断等方面的应用也简单涉及。

1.2.4 DNA 的构象变化与 SSCP 分析

核苷酸序列的变化也会影响 DNA 片段的构象或稳定性,这些变化可以通过合适的电泳技术检测。由于序列变化而引起单股 DNA 折叠的变化,从而影响电泳迁移率,产生单股 DNA 构象的多态性(single-stranded conformation polymorphism, 简称 SSCP),见 Orita 等(1989), Hayashi 等(1991), Dean 和 Milligan 等(1998)。另一途径是用变性梯度胶电泳(denaturing gradient gel electrophoresis, 简称 DGGE)来检测 DNA 双螺旋稳定性的精细变异(Myers et al. 1986, Myers et al. 1989, Lessa 1993),各种相关的 DNA 片段只要有一个碱基的差异就能在聚丙烯酰胺凝胶电泳上得到分离与检测。这些内容涉及 DNA 的二级结构(折叠与螺旋)不在本书讨论之列。

1.3 分子标记技术的优越性与争论

在描述生物类群的系统发育关系和进化历史时,早期的方法是采用比较形态学、细胞学、生理学乃至遗传学等一切可以记录表型特征的手段。为什么如今的居群遗传学研究和系统发育重建要收集分子数据?相对于上述方法,分子标记技术有哪些优越性?当前争论的焦点是什么?

1.3.1 分子信息是可遗传的

Avise(1994)认为分子数据是可遗传的,这个简单的常识具有极其重要的意义。因为“就本来意义而言,系统发育是遗传流”(Simpson 1945)。只有那些在遗传上可传递的属性才能提供评估系统发育的信息。不仅蛋白质和 DNA 的特性是可遗传的,分析这些大分子所揭示的可变性状状态的遗传基础和传递模式也能被清楚地确定。因此根据遗传信息的数量与性质的分析,有信心得出分子基础上的系统学结论。而采用常规的形态学或生理学性状来进行分类在很多时候缺乏遗传基础,因为这些表型特征是不稳定的,很容易受环境因素的影响。在植物中这种情况更明显,有时会把某物种在特殊生境下某些形态变异作为发现新种的依据。与此相反,分子数据是可遗传的,因此在野生物种中获得的分子性状不会受环境因素的影响,在栽培品种中的分子性状也不会因栽培条件而变。

1.3.2 分子标记技术为遗传学研究打开了完整的生物世界

在引入分子途径以前,经典遗传学的研究是十分有限的,大多数的研究往往集中在少数几个模式类群,例如孟德尔的豌豆、大肠杆菌及其噬菌体、玉米、果蝇和家鼠等等,而且多在可控制的实验室条件下进行杂交实验。从这些种跨代的遗传式样来推测那些可分析的形态学和生理学性状的遗传基础。如此的研究方式很难期望获得全世界范围内广泛分布的生物区系的遗传多样性,也不可能获得基因组内各遗传组分间的多样性。与此不同,分子技术可提供有关的任何基因(或 DNA 片段)或它们编码的蛋白质的直接或间接的结

构证据,并可应用到任何大小、任何地区的生物(Avise 1994)。当今的科学家们已经常规地并且会越来越多地应用分子标记技术从微生物到人类,从藻类到高等植物,从古至今,从全世界的生物区系收集数据,用于比较与综合。特别要指出的是 PCR 技术发明以后,提供分析用的 DNA 可少到 $\text{ng}(10^{-12} \text{g})$ 水平,供提取 DNA 用的原材料只需几毫克植物叶片或几微升动物血液,这种优越性对濒危物种和化石的研究特别有用。

1.3.3 分子标记技术所提供的遗传多样性几乎是无限的

基因组的信息含量是巨大的。细菌基因组的大小范围是 $0.6 \times 10^6 \sim 13.2 \times 10^6 \text{ bp}$, 原生动物的基因组为 $23 \times 10^6 \sim 686 \times 10^9 \text{ bp}$, 多细胞真菌、植物和动物的基因组为 $8.8 \times 10^6 \sim 300 \times 10^9 \text{ bp}$, 其中菊科植物基因组线性序列的长度大约比 18 卷世界百科全书中所有条目的字母排列开来还要长 100 倍。基因组就好像百科全书一样,是个巨大的信息库,它不仅编码蛋白质和其他的细胞组成,而且在它的核酸序列中记录了与其他基因组之间的进化关系(Avise 1994)。

在许多物种内的遗传变异也是惊人的。21 世纪初,人类基因组全序列的 30 亿个碱基对将公布于世。据估计,随机取样的两个人之间的 DNA 序列差异约占全序列的 0.03%, 也就是说它们之间拥有 100 万个碱基对的差异。估计其他物种内核苷酸的多样性为 0.5% ~ 2.0%, 种内居群间、个体间 DNA 序列碱基对差异的绝对值就更为庞大(Avise 1994)。由此可见,在作居群遗传分析或系统发育研究时没有必要也不可能进行全序列测定,部分序列所保存的遗传变异的信息被某种或某几种分子标记技术揭示后只要有足够的多态位点就可用于分析。

1.3.4 分子数据能区分同源性和相似性

系统学研究的中心任务是要将从共同祖先遗传下来的同源性(homology)和由于趋同进化从不同祖先演变而来的相似性(analogy)区分开来。进化意义上的分类只应该反映真正的同源性(Avise 1994)。而主要根据形态性状的经典分类有明显的局限性,有时毫不相干的物种由于长期生活在共同的环境中会逐渐演化出相似的形态性状,这种相似性往往给分类造成混乱。在分子生物学技术中可以用 DNA 杂交的方法来区分上述的同源性与相似性。例如,两个 DNA 样品(居群中的个体或两个种)用 RAPD-PCR 得到的相同分子量的多态性片段可能是同源的但也不一定是同源的,将该片段切下来作为探针与原来的 RAPD 带谱进行杂交,有杂交信号的则是同源的性状(从共同祖先遗传的性状);无杂交信号的则是在居群内或种内独立产生的同塑的(homoplastic)性状(Tingey & Tufo 1993, Williams et al. 1993)。

1.3.5 分子数据能提供共同的尺度

任何生物有机体包括动物、植物和微生物有许多共同的分子属性,例如在呼吸代谢中的基因和酶系统大都相同,碳水化合物、脂肪、氨基酸和核酸的合成途径及包括的一系列酶也大同小异,因此分子数据可提供共同尺度来直接比较任何有机体任何分类层次之间相对水平的遗传变异(Avise 1994)。经典分类学靠各类群的专家分别制定各自的标准去操作,兰科分类学家不可能应用茄科的分类标准去进行兰科分类。而在分子系统学的研

究中,情况就很不一样,例如由于 cpDNA 在结构和序列上的高度保守性,从烟草叶绿体基因组克隆的一整套探针、根据其全序列设计的一整套引物通用于植物许多科、属的 RFLP 分析(详见第 3 章)。美国 Operon 公司提供的 1000 个任意序列的 10 碱基引物通用于动物、植物和微生物的 RAPD 分析。

1.3.6 争论和前景

分子系统学是一门年轻的高度综合的新学科。它要求分类学、地理学、形态解剖学、细胞学,特别是遗传学、生物化学、分子生物学、数学以及计算机学等多学科的相互渗透,共同努力才能较好地解决问题。它是当前生物学领域中难度最大的分支学科之一。从哲学概念到具体操作存在许多争论,用什么方法处理数据也带有一定的主观意识。争论的焦点之一是:分子数据与形态数据的相对价值问题,究竟是分子性状还是形态性状是评估系统发生的更好的信息来源。研究表明形态变化与分子趋异(divergence)是彼此独立的,反应了不同的进化压力和随后的不同规则。系统学家真正关心的是所检测的性状表现的变异是否能阐明提出的问题,是否这些性状有清楚的和独立的遗传基础,是否以这种方式收集的数据有可能比较和综合以及从中衍生出系统发育假说。过分强调两者之间的矛盾进行空洞的、泛泛的争论是徒劳无益的。应该重视实践与积累,强调两者之间的协同性(concordance),每种途径有其各自独特的优点与缺点。许多分子数据有清楚的遗传基础,而且全套数据只受基因组大小限制。由于 PCR 技术的广泛应用,分子生物学家还可以从化石中收集分子信息,推断系统发育的历史进程。因此,分子途径对产生一种很有竞争力的系统发育假说极具生命力。形态数据的收集仍然是系统学的基础工作,而且也可以从化石中收集到大量保存完好的信息,进而从个体发育的历史中得到解释。因此,综合分子与形态两方面的研究比单一研究会生物多样性提供好得多的描述与解释。

1.4 分子标记的选择

在研究课题确定以后如何选择合适的技术来收集分子数据是有关科学家首先要考虑的问题,如果陷入盲目性则会事倍功半,在时间和经济上造成巨大的浪费。

1.4.1 理想的分子标记的标准

Weising 和 Nybom 等(1995)指出,令人满意的分子标记应该符合以下标准:

- 1) 多态性高;
- 2) 共显性遗传,在二倍体的生物中能区分纯合与杂合状态;
- 3) 在基因组中频繁出现,甚至贯穿分布于整个基因组;
- 4) 选择中性;
- 5) 容易获得(探针或引物已是商品或自己构建和合成比较容易);
- 6) 容易操作,自动化程度高;
- 7) 重复性好;
- 8) 所得数据可在实验室之间交流和比较。

迄今为止,还没有任何一种分子标记能完全满足上述各项标准。在研究工作中如何

选择合适的分子标记技术,首先是要根据所要解决的问题以及所研究类群的遗传背景。

表 1.1 应用于系统与进化研究的几种分子标记的比较

问 题 \ 标 记	等位酶	RAPD, ISSR	酶切位点分析	SSR*	AFLP	测序
交配系统	+	m	m	+	-	n
克隆检测	+	+	+	+	+	n
杂合度	+	-	+	+	-/+	n
父系测定	m	m	m	+	m	n
亲缘关系	m	m	m	+	+	n
地理变异	+	+	+	+	+	+
杂交区	+	+	+	+	+	+
种间界限	+	+	+	+	+	+
系统发育						
0~5 兆年	+	m	+	+	m	+
5 兆~50 兆年	+	-	+	+	-	+
50 兆~500 兆年	m	-	m	m	-	+
500 兆-3500 兆年	-	-	-	-	-	+

* 包括基于杂交的 SSR 指纹和 SSLP; + 有效和适合; - 无效和不适合; m 勉强可用; n 可行但目前在时间和经济上不合算。

从表 1.1 可见,有时为了解决同一问题可采取多种途径。例如为了查明一个濒危物种在历史上的迁移路线,它曾经有过的避难所,可采用 RAPD、RFLP、SSR 和 AFLP 指纹技术中的任何一种,此时主要取决于研究者所在实验室的工作条件和技术水平。若在一些国家或部门的重点实验室拥有全自动测序仪和相关的软件,拥有成熟的技术,人们可能用为数很少的(2~3 对)AFLP 引物组合即可获得足够进行居群遗传结构分析的百余个多态位点。其效率之高,分析之精确是迄今为止任何 DNA 指纹技术无可比拟的,而所花费用甚至会比 RAPD 低。在对某物种特别是那些很少有参考资料的野生种进行 RAPD 分析时首先要从 20~40 个甚至上百个的随机引物中筛选出多态性高、扩增强、重复性好的引物才能得到足够的多态位点,而且为了精确统计位点必须采用质量好分辨高的 DNA 分子量标准,否则在统计多态位点时误差极大,这对居群水平的工作而言所花的费用是十分昂贵的,所花时间也可能得不偿失。在 SSR-PCR 分析中得到的多态百分率可能很高,但每对引物只产生几个等位基因,因此要获得与 AFLP 同样多的多态位点就要求有十几对甚至更多的引物对,合成荧光标记引物的经费会比 AFLP 多好几倍,但 SSLP 的最大优点是能分辨二倍体的纯合与杂合位点。RFLP 用于居群水平的分析要求有多个探针/酶或多对引物/酶的组合才能得到足够的多态位点,限制性内切酶较为昂贵。如果不能使用异源探针或异源引物,那么花在构建探针或设计引物上的时间和经费(须构建基因组文库或 cDNA 文库)也是很可观的。因而对于一般的多样性检测采用显性的 AFLP 或 RAPD 即可,在条件较好的实验室宁可用 AFLP 标记技术,在一般的实验室只要经费充足, RAPD 仍不失为一种可行的较好的分子标记技术。除了在引物的退火温度要摸索以外,ISSR-PCR 的实验操作类似于 RAPD-PCR,但它产生多态性的比例往往高于 RAPD,因此采用 ISSR 检测遗传多样性的工作逐渐多起来(见第 5 章)。

从表 1.1 也可见,解决不同的问题要采取不同的途径。RAPD、ISSR 和 AFLP 是显性标记,它们要解决交配系统,计算杂合度和父系分析等问题效果不佳。无论是杂交基础上的 SSR 指纹(多位点)还是 PCR-SSR(单位点)指纹都是共显性标记,它们具有等位酶分析的全部功能,除了可揭示居群的遗传结构、检测种内的遗传多样性以外还可检查居群的交配系统、计算杂合度、进行亲子关系的鉴定和基因流的分析以及探查居群间、亚种间甚至种间的分化和亲近的程度。而 SSR 指纹又具备等位酶分析所不具备的优点,其在真核生物中几乎是贯穿整个基因组广泛分布又处在基因组的高变区。正如第 5 章所述,在 EMBL 和 GenBank 1994 年的查询结果表明,在真核基因组中所有可能的 2 核苷酸[除(CG)_n外]和 3 核苷酸的重复基元比随机分布的频率高 5~10 倍,在双子叶与单子叶植物中平均分别每 21kb 和 65kb 出现一个简单序列重复,SSR 这种丰度高、可变位点多的特性使其在指纹分析中具有许多优势。在基因组中等位基因的数目是有限的,因而检测到的多态位点也是很有限的,何况作等位酶分析要求用新鲜材料,作 SSR 分析可用干燥叶片提取 DNA。

1.4.2 几个度量标准

为了有效选择合适的分子标记技术服务于特定的应用目的,在此介绍几个度量标准(引自 Powell et al. 1996)。

- 1) 期望杂合度 (H) 每个位点期望杂合度 $H_n = 1 - \sum p_i^2$, 在此 n 是指被分析的标记(位点)数, p_i 是指第 i 个标记的频率。在衡量遗传变异时,应求得全部位点的平均期望杂合度: $H_{AV} = \sum H_n / n = \beta \sum H_p / n$, 在此 $\beta = n_p / (n_p + n_{np})$, p 为多态位点, np 为非多态位点(实际上,非多态位点在实验系统中常被排除)。
- 2) 标记系统的多重系数(multiplex ratio)定义为每次实验所同时分析的位点数目(例如一个电泳胶的样孔所产生的带数),显然 AFLP 与 RAPD 的多重系数高于 RFLP 与 SSR。
- 3) 标记指数(marker index, 简称 MI) 如果 n 个独立的位点被同时分析(例如在 AFLP 或 RAPD 实验的每个凝胶样孔产生的带),平均期望杂合度是 H_{AV} , 那么在比较一对基因型时每个凝胶样孔产生的多态标记称为标记指数(MI)。
- 4) 对于一整套的种质资源而言,每次实验所分析的多态位点的数目称为有效多重系数 E 。此时 $E = n\beta$ 、 $MI = EH_{AV(p)}$, 因此简单说来,标记指数是有效多重系数和平均期望杂合度的产物。

Powell 等(1996)在分析大豆种质资源时,比较了 RFLP、RAPD、AFLP 和 SSR 4 种分子标记技术。结果表明 SSR 标记有最高的期望杂合度(0.6), AFLP 标记具最高的有效多重系数(19)和最高的标记指数(6.14)。标记指数可用于评估一种标记系统总的有效性和实用价值。RFLP、AFLP 和 SSR 揭示的栽培大豆和野生大豆的遗传相似性矩阵高度和谐,而 RAPD 的数据与其他分子标记系统得到的数据相关性较低,这是因为 RAPD 对种间的相似性产生偏高的数据。在栽培大豆种内,RAPD 与 AFLP 产生的相似性系数比其他的分子标记较为接近。

Russell 等(1997)在用 RFLP、AFLP、SSR 和 RAPD 比较 18 个栽培大麦样品的遗传变异水平时引入了多样性指数(diversity index)这个度量标准,根据 $1 - \sum p_i^2$ 的数值来计算多样性。他们的结果表明以上 4 种方法在每个样品中都能获得独有的指纹,但在检出多态

性的量上有差异,13对SSR引物都是多态的,平均每对引物检出5.7个等位基因,而在AFLP产生的片段中有54%是单态的。最高的多态性指数(0.973)在AFLP中观察到,最低的(0.322)在RFLP中发现,见表1.2。

表 1.2 RFLP、RAPD、SSR 和 AFLP 分析在大麦品系中产生的带的式样(Russell et al. 1997)

标记	检测单位数目	带的总数	多态带%	每检测单位带数目	每检测单位基因型数	多样性指数*
RFLPs	114(42 探针 3 个酶)	299	249 83.2%	2.62	2.37	0.322
RAPDs	22(引物)	107	71 66.3%	4.86	3.41	0.521
SSRs	13(引物对)	70	70 100%	5.38	5.38	0.566
AFLPs	6(引物组合)	297	139 46.8%	49.5	17.2	0.937

* 多样性指数 = $1 - \sum p_i^2$

第 2 章 植物 DNA 提取、纯化与鉴定

无论采用哪种分子标记技术,首要步骤是获得数量足够、质量符合要求的 DNA 样品。在提取植物组织 DNA 时遇到的主要困难是自身 DNA 酶的剪切和次生代谢产物的干扰,其中最讨厌的是多糖类的污染。多糖与 DNA 共沉淀后很难除尽,严重抑制以后各种生化反应中酶的活性。对古生物或化石样品而言,最棘手的问题是现代 DNA 的污染以及在不可避免的保存条件下的原位降解。DNA 的提取与纯化过程是一个不断小心避免内源 DNA 酶剪切,不断清除蛋白质、RNA 以及各种次生代谢物的过程。好的分离提取与纯化方法可获得高的 DNA 产率和好的 DNA 质量。一般认为,质量好的 DNA 的标准是:① 分子量应至少保留大约 50kb,可与 λ DNA(48kb)比较;② 有清晰的和强的 PCR 扩增式样;③ 可被限制性内切酶完全消化。基于 PCR 与基于杂交的分子标记技术对 DNA 的质与量有不同的要求,在以下有关的章节中分别叙述。

2.1 植物组织的收集与保存

提取 DNA 的组织样品应尽量保持新鲜,使其中的 DNA 维持结构完整与生理活性状态。冷冻是保持组织成分最有效方式,因此野外收集新鲜组织最好要有液氮或干冰设备,至少配备冰壶或冰袋。收集后遇到的困难是如何运输? 通常火车或空运不愿意接受液氮罐或干冰作为行李。去国外工作的收集者会发现,海关对生物活性物质要求特殊的许可证。本节提供组织的收集、包装与储存方法。我们强调有系统地收集生物材料,强调在工作的所有阶段都必须小心标记样本,对每份样本的产地、生境、形态性状、采集时间与采集人都要作详细记录,使得样本在采集、包装、运输、输入数据库直到发表文章的各个阶段都不会丢失信息。如果丢了标签,任何样本都无用。

2.1.1 熟悉获得样本的法规

我国是一个法治国家,森林保护法、野生动植物资源保护法、濒危物种保护法以及农作物和园艺品种专利权保护法正在不断完善。采集者应熟悉地区、省、国家与国际的有关法律与法规,应有充分的时间得到许可证。采集与运输生物材料的各种法规是为安全、公共健康、保护农作物和濒危物种而制定的。国际上规定严禁运输濒危物种与危险物种。科学家们欲要进口或出口动植物组织或其他样品,必须尽可能多地了解我国和其他国家的有关法律与法规。科学收集许可证对于采集天然居群通常是需要的,这些可从地区、省或国立野生动植物保护办公室得到。

2.1.2 新鲜样品的采集与保存

采样的植株应是活的或死后尽快采样,以保持生物大分子结构完整性与生理活性。

这样的样本是许多生物学研究领域的十分宝贵的资源,有时甚至极微量组织对于研究大分子是很有价值的。例如从几十毫克名贵中药材人参的根须中提取的 DNA 足够用于分子系统学研究(马小军等 1999)。每 2~5ng DNA 通过 RAPD 扩增可供遗传多样性分析,而纳克量的 DNA 来自毫克量新鲜植物组织(或干燥组织)的小规模制备。采集与保存植物组织的种类与数量取决于研究者的需要,原则上是要收集尽可能多的组织类型和最大量的多样性。许多国家的自然历史博物馆、标本馆、科研单位和大学实验室积累和保存了这样的收集,国际上统一的标准列于表 2.1。

表 2.1 组织收集与保存方式的国际范例(Dessauer et al. 1996)

样本大小	类群	地区	材料
1=<100	1=鱼类	A=新北区	1=核酸
2=100~1000	2=两栖类	B=古北区	2=质粒
3=1000~5000	3=爬行类	C=新热带区	3=探针,引物,文库
4=5000~10 000	4=鸟类	D=非洲埃塞俄比亚	4=提取的蛋白质
5=10 000~30 000	5=哺乳动物	E=东方	5=细胞株系
6=>30 000	6=节肢动物	F=澳大利亚	6=冷冻组织
	7=其他无脊椎动物	7=血液	
	8=细菌,真菌,藻类	8=抗血清	
	9=绿色植物	9=种子或孢子	

如此的收集与保存方式便于地区之间,国际之间科学家的交流与协作。例如美国印第安纳大学生物系 Palmer 实验室收集和保存了被子植物叶绿体基因组的 100~1000 号克隆样品,包括核酸、质粒、引物、探针和文库,其收集范围从 A 到 F(包括新北区、古北区、新热带区、非洲、东方和大洋洲)。又如华盛顿 Smithsonian 研究所的自然历史国家博物馆的 Zimmer 实验室收集和保存了 5000~10 000 号绿色植物的核酸、质粒、引物、探针和文库,其收集范围包括新北区、新热带区和东方。从事植物分子系统学研究的实验室与上述有关实验室建立各种联系,无论在实验材料、探针与引物甚至文库的交流上或研究进展的信息沟通上都会获得很多方便。中国科学院植物研究所系统与进化植物学开放研究实验室对我国主要珍稀濒危植物和原始被子植物的 DNA,例如 5 个居群 100 余号中国活化石银杉(*Cathaya argynophylla*)的总 DNA(Wang et al. 1996),44 个居群 1168 号中国普通野生稻(*Oryza rufipogon*)的总 DNA(Xie et al. 1999),16 个居群 150 余号野生牡丹(*Peonia Sect. Moutan* DC)的总 DNA(邹喻莘等 1999b)以及 500 余号原始被子植物的总 DNA(陈之端等 1998)已妥为保存,这些仅是该开放研究实验室 DNA 库重要组成的一部分,是中华民族一笔宝贵的遗传资源。

提取 DNA 的植物材料应尽量采用新鲜的、成熟的组织,幼叶必须展开,种子、孢子或花粉都必须达到一定的饱满度与成熟度,活跃生长的组织如从种子萌发的幼芽或幼苗应是提取 DNA 首选的好材料。新鲜样本采好后装入密封的塑料管、塑料袋或紧包在铝泊中,尽可能快地放在避光的冷环境中(液氮罐、干冰箱、冰壶、冰袋),飞机和火车可能拒绝运输液氮罐或干冰箱,因此携带冰袋或冰壶较现实,在短距离,如在本单位的温室或实验地采样也要带冰袋或冰壶。样本运回实验室后最好及时提取 DNA,或立即放入-75℃无

自动化霜装置的超低温冰箱长期保存待用,或在液氮中研磨成糊状后再存入 -75°C 待用。

核酸虽然在化学上不如蛋白质活跃,但对氧化与水解的变化是脆弱的,Lindahl (1993)指出,核酸虽然变化速率较慢,但长时期处在不利条件下也不稳定,其结构会发生破坏。RNA 对水解十分敏感,是因为它的分子有 2' 羟基存在。DNA 分子中没有 2' 羟基,因而稳定了 DNA 的 3', 5' 二脂键,但增加了它的嘌呤残基中的 N-糖基对水解裂解的敏感性。DNA 链一旦失去了嘌呤碱就会弱化,易遭到裂解,而胞嘧啶与五甲基胞嘧啶对脱氨作用敏感。将 DNA 暴露到氧中可能引起鸟嘌呤氧化成 8-羟基鸟嘌呤,使其优先与腺嘌呤而不是与胞嘧啶配对,造成碱基错配。其他的氧化作用还包括嘌呤二脂的形成以及在碱基与糖磷脂之间环嘌呤结构的形成。

在 37°C 、pH 7.4 条件下保存的单链 DNA 溶液中,有几个过程的反应速度很慢,例如胞嘧啶的半衰期为 200 年,丢失嘌呤的速度与其相似或更慢。双链 DNA 的结构能有效保护胞嘧啶的抗脱氨作用,在双链 DNA 中上述同样反应的速度只有在单链 DNA 中的 0.5%~0.7%,例如在双链 DNA 中每个胞嘧啶的半衰期为 30 000 年。低温和缺氧能使 DNA 的上述结构变化限制到最小。脱水、高盐浓度、加入 HAP(hydroxyapatite, 羟基磷灰石)和 EDTA(ethylene diaminetetraacetic acid, 乙二胺四乙酸)以抑制核酸酶的活性,也是稳定 DNA 的有效措施。新鲜组织的常规处理,例如冻化操作和乙醇保存只会引起 DNA 很小程度的剪切。从这样的组织样本中提取的 DNA 对 DNA-DNA 杂交、RFLP、RAPD、基因克隆以及序列分析都能成功。Sibley 与 Ahlquis(1990)用从乙醇保存的鸟组织中提取的 DNA 做了一系列 DNA-DNA 杂交研究。Dessauer 等(1994)称他们曾从冷冻储存了 20 多年的爬行类红细胞提取到高分子 DNA,这些 DNA 产生的限制性片段指纹可与从新鲜血液得到的 DNA 指纹比较。McBee 等(1987)从死后 72h 保存在 24°C 的哺乳动物的脑、骨骼肌和肝组织中提取了 DNA,他们发现脑组织中的 DNA 最稳定,肝组织中的最不稳定。Golemberg 等(1990)从 2000 万年前中新世的叶岩内获得木兰属(*Magnolia*)叶化石中 820bp 的 *rbcL* 基因片段并进行了测序。Soltis 等(1992)测定了中新世落羽杉属(*Taxodium*)化石中 1320bp 的 *rbcL* 基因的序列。Cano 等(1993)从黎巴嫩 1 亿年以前的琥珀保存的象鼻虫(*Nemomychilde*)中成功地分离到 18S rDNA 及转录间隔区,测序的结果与当今现存的象鼻虫序列进行比较确定了它是一种已灭绝的象鼻虫。迄今为止,这个工作仍然是分子古生物学中最有系统学意义的例子。DNA 的寿命取决于它的保存条件,埋藏在琥珀中的昆虫完全处在绝氧的环境中,因此其中的 DNA 从远古到当今仍保留了一定的完整性。

2.1.3 组织的干燥与保存

分析 DNA 水平上的变异要求有纯度好、分子量至少为约 50kb 的 DNA 样品,往往还要求有大量的平行样品作比较生物学分析。例如做居群水平的研究,对一个种采样,要有足够的居群代表,对每个居群又要求有足够的个体。特别是对于那些分布在远离实验室的交通极为不便的边远地区、或海拔很高的地区的濒危物种,要采集和及时运输新鲜植物材料供提取 DNA 用十分困难,因此需要发展一系列植物组织干燥与保存的方法。

Doyle 和 Dickson(1987)曾用过一系列解剖学和细胞学上常用的化学试剂例如 FAA(70%乙醇:甲醛:冰醋酸=18:1:1)、乙醇:醋酸=3:1 将植物材料固定 24h 以后转入 70%乙醇,或预先不固定,直接用 70%乙醇、氯仿:乙醇=4:3 以及 10% NaCl 处理从单个茄属

(*Solanum glutinosum*)植株采下的叶片去提取 DNA,均未获得成功。上述化学试剂处理均使 DNA 明显降解,而他们干燥处理(为制作干标本而压过的植物材料在 42℃过夜,然后压在室温下待用)过的组织至少在几个月内可保持 DNA 的完整性,其产率和纯度都可和从新鲜组织提取的 DNA 相比较。干燥组织中的 DNA 的完整性究竟能维持多长时间依植物类群而定,茄科植物最多 3 个月。从放了 12 个月未上架的 *Solanum lanceolatum* 腊叶标本提取的 DNA 严重降解,其平均分子量只有 2kb,而干燥处理过的豆科植物例如 *Glycine tabacila* 中的 DNA 的完整性可维持 26 个月,这些以月或以年为单位(而不是以小时或以天为单位)缓慢降解的 DNA 可用来做酶切位点分析。对豆科植物而言,用干燥一年的材料所得的杂交效果与用温室的新鲜材料一样好。因此人们在野外干燥处理的植物材料带回实验室后几个月或 1 年内提取 DNA 无妨,但一定要放在干燥器内,有条件最好存入 -75℃待用,在深冻条件下可长期储藏,但一定要密封好以保持干燥。Doyle 和 Dickson (1987)认为 Rogers 和 Bendich (1985)从一系列腊叶标本提取 DNA 未能取得成功是因为他们用的都是保存了 20 年以上的干材料,在如此漫长的时间中 DNA 已严重降解。在 Doyle 实验室,用其他一些干燥材料例如双子叶植物 *Claytonia* (马齿苋科)、单子叶植物 *Coralorrhiza* (珊瑚兰属,兰科)以及 *Caryota* (鱼尾葵属,棕榈科)也得到高分子量的 DNA 适合做酶切位点分析。由此可见这些方法有广泛的应用前景。但他们用的所有干燥样品都未经消毒与灭菌处理,可想而知这些处理必定会引起 DNA 降解。对于一些叶片革质化的类群可直接将叶片放入信封或塑料袋,无需压制,从产地邮回实验室存放至 -75℃或立即提取 DNA。Doyle 和 Dickson (1987)通过这种途径从一系列南美洲豆科植物 (*Peltogyne*、*Swartzia*、*Acosmium*、*Macrolobium*、*Pithecellobium*、*Aldina*、*Parkia*、*Dalbergia*) 中提取到高分子量的 DNA。他们从南美洲和非洲邮回实验室的棕榈科 (*Dictyocaryum*、*Iriartella*、*Wettinia*、*Podococcus*) 叶子提取 DNA 也获得成功,所幸的是他们采用的上述方法都十分简单。

Liston 等 (1990)比较了用新鲜的和在 42℃空气干燥了 36h 后分别放在密封的、装有硅胶的塑料袋中并于 37℃存放 1~5 个月的菠菜叶片提取总 DNA 的效果。用上述两组材料在 37℃存放 5 个月提取的 DNA 都严重降解,而存放 1~4 个月的材料均可和直接用新鲜叶片提取的 DNA 相比较。其中未经 42℃干燥处理得到的 DNA 略有降解。他们在我国新疆地区采集了菊科 (*Asteraceae*)、十字花科 (*Brassicaceae*)、石竹科 (*Caryophyllaceae*)、藜科 (*Chenopodiaceae*)、景天科 (*Crassulaceae*)、莎草科 (*Cyperaceae*)、豆科 (*Fabaceae*)、龙胆科 (*Gentianaceae*)、芍药科 (*Paeoniaceae*)、车前科 (*Plantaginaceae*)、禾本科 (*Poaceae*)、报春花科 (*Primulaceae*)、毛茛科 (*Ranunculaceae*)、蔷薇科 (*Rosaceae*)、玄参科 (*Scrophulariaceae*) 等 14 科的 15 种植物,放在当地的空气温度下干燥 4~6 周后提取 DNA,除了蔷薇属外其余的都很成功。这些 DNA 与向日葵属 (*Helianthus*) 的 18S~25S nrDNA 重复和 9.9kb 的莴苣属 (*Lactuca*) 的 cpDNA 探针成功地进行了杂交。他们也曾报道 CaSO_4 可满意地用来干燥植物叶片,但它吸水后成糊状,吸水能力(自身重的 10%~14%)远不如硅胶(自身重的 31%),再生温度 (204℃)高于硅胶 (150℃),因此不可取。

Thomson 等 (1993)报道了一个更简单的干燥叶片的方法,他们将采集的新鲜叶片装在纸信封中置于室温下自然干燥。从用这种方式干燥 24h、20 天、122 天的植物材料提取的 DNA 以及用这些 DNA 进行 5S RNA 基因间隔区扩增的产物和 RAPD 扩增的式样可以和新鲜叶片得到的结果相媲美,从 42℃加热 24h 处理的叶片提取的 DNA 也比较成功,但在

65℃加热 24h 和在微波炉中档加热 10min 的叶片未得到好的结果。以上方法已成功用于桃、大麦、鹰嘴豆、苜蓿、燕麦、高粱、大豆和向日葵的叶片 DNA 的提取,但是否适于其他植物和其他含水量高的组织有待于实践证明。

Chase 等(1991)对手边的几个类群例如 *Malpighiaceae* 和 *Orchidaceae* 等,用标准的标本馆干燥的样本提取的 DNA 是高度降解的,因此认为上述 Doyle 和 Dickson(1987)介绍的方法不是对所有的类群都适合。他们发现从硅胶干燥的一系列植物样本提取的 DNA 对有花植物的系统发育分析非常有用,因此推荐这种十分理想的干燥植物叶片材料——硅胶。其具体方法如下:将 4~6g 新鲜叶片放在一个 12cm×8cm 的带拉锁的小塑料袋中。如果叶片的长或宽大于 3cm,可撕成不超过 2cm² 的碎片,然后在塑料袋中加入 50~60 克变色硅胶,摇动使叶片与硅胶充分地、均匀地接触,硅胶颗粒的大小影响不大。我们使用国产的二级变色硅胶即可,根据报道以及我们的经验,硅胶与叶片的比例至少要 10:1 (w/w),以保证叶片在 12h 之内干燥。在野外一旦发现硅胶已从深蓝色变成粉红色要即时更换,叶片干燥的程度是用手指捻时发出劈啪声最好。干燥的材料带回实验室后,可取出大部分硅胶重新烤干(175℃,1h)待用,为避免植物材料之间的交叉污染,烤干的硅胶只能用于原来的植物材料。装有已干燥好的植物材料的塑料袋要保留少许硅胶以及时检查这些材料是否再吸水,这些塑料袋可放在室温下的干燥器中几个月或长期储存在 -75℃ 待用,但一定要密封好,以防吸潮。有些单子叶植物的叶片很厚,可撕成更小的碎片加入更多的硅胶以减少干燥的时间,保证 DNA 的完整性。在野外用硅胶干燥植物材料简单、方便、便宜和有效。我们实验室已成功地用硅胶干燥的裸子植物针叶如银杉属、松属;被子植物的叶片如芍药属、升麻属、葡萄属、人参属、沙参属、葱属、稻属、铃兰族、金缕梅科、桦木科等提取到完整的 DNA,有效地用于 RAPD、PCR-RFLP、ISSR、RFLP 以及序列分析(邹喻苹等 1994,汪小全等 1996,黄锦岭等 1996,Wang et al. 1997,何兴金等 1998,陈之端等 1998,葛颂等 1998,马小军等 1999,Xie et al. 1999)。

2.2 植物 DNA 分离提取的关键问题

2.2.1 提取植物 DNA 的必经步骤

- 1) 破碎细胞壁 在液氮或干冰中迅速研磨组织,以释放细胞内含物,必要时辅加少许灭过菌的石英沙。小规模制备只需加少许石英砂在 1.5-ml 离心管中研磨,此时研磨介质须预先加热到 60℃,若联上电动匀浆器更好。在这一步的所有措施都是为了尽一切可能抑制核酸水解酶的活性
- 2) 裂解细胞膜 在去垢剂 SDS(Sodium Dodecyl Sulfate, 十二烷基硫酸钠)或 CTAB(Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide, 十六烷基三甲基溴化胺)的作用下,质膜、细胞器膜、液胞膜、核膜破裂,核酸释放到提取介质中,与此同时各种次生物质也释放出来。此时,应防止激烈震荡以尽量避免 DNA 的机械剪切,在 65℃ 保温 30~60min 以钝化内源核酸酶的活性,在提取介质中含 EDTA 以螯合激活核酸酶的镁离子。
- 3) 去多糖与多酚等次生物质 在一开始就要采取各种措施去除多糖与多酚等次生物质,详见下节。
- 4) 变性与分离蛋白质 酚、酚与氯仿(1:1)、氯仿与异戊醇(24:1)能有效去除蛋白质,

5mol/L 乙酸钾也是很好的蛋白质沉淀剂,必要时用蛋白酶 K 水解蛋白质。

- 5) 沉淀核酸 用冰冷的 0.6 体积异丙醇或两倍体积的乙醇沉淀核酸,收集沉淀,用 70% 乙醇洗去沉淀中的无机离子。
- 6) 去除 RNA 用 RNase(核糖核酸酶)消化或 LiCl 沉淀去除 RNA。
- 7) 浓缩 DNA 在中等浓度的一价离子的存在下用两倍体积的乙醇沉淀,将沉淀溶解在合适体积的 $1\times\text{TE}$ (或 $0.1\times\text{TE}$) 缓冲液中。
- 8) 分装成若干个小包装储存在 -20°C 或 4°C 待用。

2.2.2 多糖、多酚与其他次生物质的去除

与动物细胞不同,植物细胞具有加厚的次生壁和硕大的液胞。因此植物细胞储存了大量的、种类繁多的次生物质,例如多糖、多酚、乳汁、树脂等等,使得植物 DNA 的提取与纯化比动物和微生物要难得多。这些次生物质在提取 DNA 的过程中与 DNA 共沉淀,形成黏稠的胶状物难以溶解或产生褐变。如此质量的 DNA 既不能做酶切位点分析又不能做 PCR 扩增,因为上述次生物质的存在严重地抑制限制性内切酶和 *Taq* DNA 聚合酶的活性。因此,去除多糖与多酚等次生物质成为提取与纯化植物 DNA 的关键步骤。以下介绍几种去除多糖与多酚等次生物质简单而有效的方法:

- 1) 材料的选择与处理 供提取 DNA 的植物材料应尽量新鲜与幼嫩。有可能时应尽量采用种子萌发的幼苗,采收成熟的幼叶提取 DNA。从野外采集的新鲜叶片若比较衰老,运回后可放在 4°C 的黑暗中饥饿 1~2 天,以消耗淀粉和其他多糖。
- 2) 在细胞裂解之前分离细胞核 细胞总 DNA 的 85% 存在细胞核中,若不是作叶绿体或线粒体基因组的研究可先将细胞核分离出来。在研磨之后细胞壁已破碎,果胶类多糖已释放出来,但大部分核膜、质体膜甚至液胞膜还是完整的。此时用低速离心(2000 r/min 或 5000~7000 r/min)收集沉淀,可有效将细胞核(在沉淀中)与保留在上清液中的多糖与多酚类次生物质分开。进行这步操作时,研磨介质中不加去垢剂以保持核膜的完整性。
- 3) 提取介质的组成 细胞膜的裂解需借助于去垢剂的作用,常用的去垢剂有 SDS 和 CTAB,提取植物基因组 DNA 时更常用的是 CTAB。核酸与 CTAB 在不同的盐浓度下选择性地生成沉淀(Murray et al.1980)。当 NaCl 浓度为 0.7 mol/L 时,RNA 和 DNA 溶于 CTAB,当盐的浓度降至 0.4mol/L 时核酸沉淀,但在 DNA 溶解的盐浓度下许多多糖不溶解,此时 CTAB 与多糖和残留的蛋白质形成复合物,它们在以后乳化和用酚或氯仿抽提时停留在界面上,容易去除。在提取介质中最常用 2% CTAB,在多糖含量高的类群如海枣(Aitchitt et al.1993)和山龙眼(Maguire et al.1994)的提取中可增至 3%。

为了去除多酚类次生物质,在提取介质中必须加抗氧剂,最常用的有 β -巯基乙醇(β -mercaptoethanol)、抗坏血酸钠、半胱氨酸、二硫苏糖醇(Dithiathreitol, DTT)等。它们共同的作用是提供 SH—(巯基),与多酚类物质竞争氧,因而有效地防止了酚氧化成醌,避免了褐变。所用抗氧剂的种类与用量依植物类群而定,最常用的是 β -巯基乙醇,其终浓度范围是 0.1%~2% (V/V),在一些多酚含量高的类群中,例如莲(Kanazawa et al. 1992),亚麻(Aldrich et al.1993)等,巯基乙醇的终浓度可高达 5%,所有抗氧剂都要在研磨前临时加入,否则无效。PVP(polyvinylpyrrolidone, 磷酸吡哆醛)是一种聚合物,常用

PVP40(相对分子质量为40 000),它与多酚结合形成一种不溶的络合物,因此也能有效去除酚,通常与抗氧化剂一起使用,终浓度为2%~6%(w/v)。在一般的情况下(非顽拗类群),研磨时临时直接加入少许抗坏血酸钠和PVP粉末即可,无须严格定量(邹喻苹等1998)。也有报道(Parterson et al.1993)在提取棉花DNA的介质中加入多酚氧化酶的抑制剂,如0.1%(w/v)DIECA(diethyldithiocarbamic acid)可有效去除酚。

提取介质的pH通常为8.0,有报道(Guillemaut et al.1992,邹喻苹等1994)低pH(5.5)可避免酚类物质的电离化和随后的氧化。施苏华等(1996)报道,在研磨后加入提取介质之前用-20℃预冷的丙酮抽提两次提取核酸的效果好。

- 4) 高浓度盐去多糖 在氯仿/异戊醇(24:1)抽提后的水相中加入0.5体积的5 mol/L的NaCl,然后再加2体积的乙醇使DNA沉淀,此时大部分多糖仍在上清液中。这种简单、迅速和便宜的方法可有效去除植物DNA中的多糖(Wang et al.1996)。实验证明在DNA的水溶液中,NaCl的终浓度为0.5~3.0 mol/L都能去糖,但2.0 mol/L的效果最好(Fang et al.1992)。
- 5) CTAB/NaCl溶液提取与氯仿/异戊醇抽提 Murray等(1980)介绍了一种从现存的基因组DNA去多糖的有效方法。将现有DNA样品的NaCl浓度调到0.7 mol/L,加0.1体积的CTAB/NaCl(溶解4.1g NaCl于80ml H₂O中,在加热和搅拌下缓慢加入10g CTAB,如果需要,加热到65℃使溶解,定容到100ml),混匀后用氯仿/异戊醇(24:1)抽提,产生的白色界面表明多糖与其他大分子污染物去除。重复用CTAB/NaCl溶液提取与氯仿/异戊醇抽提几次,直到白色界面消失为止。
- 6) 糖苷水解酶的使用 在DNA的粗提液中同时加入RNase与糖苷水解酶(例如caylase M3)的混合物,去除RNA与果胶类多糖可在一步完成(Rether et al.1993)。用此法得到的DNA制剂去除了与DNA共沉淀的胶体状物质,没有RNA的污染,它的A₂₆₀/A₂₈₀大约为1.8。多糖的种类很多,因此在实际应用中也要求有不同种类的糖苷水解酶,加之酶制剂比较昂贵,因此这个方法不一定实用。Li等(1994)报道,caylase M3虽然水解多糖效果好,但此酶常被核酸酶污染,不好用。
- 7) 几种柱层析方法去多糖 RPC-5反向柱层析是一种分离与纯化核酸强有力工具,迅速而便宜(Person et al.1971)。原来这种柱子成功地用于植物总tRNA以及细胞器tRNA的分离(Guillemaut et al.1990),后来发现它也能有效改善用任何方法提取的DNA纯度(Guillemaut et al.1992)。这样纯化过的DNA适于做PCR扩增和限制性酶切等各种分析。Li等(1994)报道,用Sephacryl S-1000(Sigma: allyl dextran与N, N'-methylenebisacrylamide交联的共聚物,一种凝胶过滤的介质)凝胶过滤,结合PEG 8000沉淀能有效去除可溶性多糖,他们认为这种方法优于用2 mol/L NaCl/乙醇沉淀去多糖。
- 8) 稀释DNA制剂 我们实验室的经验是在进行RAPD这类PCR扩增时,每反应的模板DNA可少至2ng,因此在一般的情况下,初步纯化的DNA制剂(经上述某个合适的方法去多糖和去多酚)稀释到PCR扩增的有效浓度(~2ng/反应),就能得到好的扩增。Pandey等(1996)报道,阿拉伯半乳聚糖、葡聚糖、瓜耳树胶(gum guar)、刺槐豆胶(gum locust bean)、菊粉(inulin)、甘露聚糖(mannan)及淀粉等中性多糖在1500~2000ng多糖:1.5ng菠菜DNA的比例下不抑制RAPD扩增;而同样比例的酸性多糖如角叉菜胶(carrageenan)、硫酸葡聚糖、茄替胶(gum ghatti)、果胶以及木聚糖却完全抑制RAPD扩增,在低

比例情况下如 50ng 硫酸葡聚糖:1ng 菠菜 DNA 就可完全抑制 RAPD。这些酸性多糖或改变 PCR 缓冲液的 pH 或抑制 *Taq* DNA 聚合酶的活性,而不是与 DNA 结合。5%~7% DMSO(二甲基亚砷)和 5%~7% 的 PEG 400(polyethylene glycol, 聚乙二醇)可部分恢复这种抑制作用。他们也认为稀释 DNA 提取液是排除多糖抑制作用的最有效途径。在实际操作时,主要应考虑所研究植物类群的特点,根据多酚与多糖的种类与含量的高低选择既行之有效又经济可行的措施。

9) CsCl(氯化铯)梯度离心 (见本章 2.4.3)

2.3 介绍几个常用的提取植物 DNA 的方案

提取植物基因组的方法层出不穷,可归纳为:CTAB 法,高盐低 pH 法,核 DNA 的制备,小规模制备,提取试剂盒的使用,用 Chelex-100(一种树脂的商标)制备,用 Silica(硅石)分离 DNA 等。在现有方法的基础上还会不断改进与完善,可根据植物类群的特点以及研究项目的要求采用不同的方案。

2.3.1 CTAB 法

此法最初用于细菌基因组 DNA 的提取,利用在一定的盐浓度下,DNA 与多糖在 CTAB 溶液中溶解度不一样而达到去多糖的目的。80 年代(Murry et al.1980)以后 CTAB 广泛用于植物基因组 DNA 的提取。Rogers 等(1988)用 CTAB 法成功地从 30 多种植物的 60 个类型的组织如叶片、幼苗、悬浮培养液、种子、胚、胚轴、胚乳、子叶和花粉等提取了可进行限制性内切酶消化的 DNA,所需新鲜组织的量小于 500mg。Doyle 等(1987)首先将 CTAB 法引入植物分子系统学研究领域,他们成功地用此法提取了新鲜叶片和干标本中的 DNA。我们实验室从成几千号野生稻、银杉、高山松等一系列裸子植物到原始被子植物,从单子叶到双子叶大都采用 CTAB 法提取 DNA,在 CTAB 的基础上根据类群的特点和实验要求各有所改进。这些 DNA 适于做 RAPD、酶切位点分析和序列分析。我们实验室用 CTAB 法提取总 DNA 的步骤如下:

- 1) 在液氮中迅速研磨 0.5~2g 新鲜组织或 0.1~0.5g 硅胶干燥的组织,使成糊状或粉状,在研磨时即时加入少许抗坏血酸钠和 PVP 干粉(加入的量依植物类群而定)。
- 2) 将糊状或粉状物转入 50ml 离心管(聚苯乙烯管,耐氯仿)后,加入 5~10ml 65℃ 的 2×CTAB 提取介质(100mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 1.4mol/L NaCl, 20mmol/L EDTA, 2%CTAB, 0.1%~2% β-巯基乙醇),放入 65℃ 水浴保温 30~60min,开启摇动阀维持缓慢摇动。
- 3) 加入等体积的氯仿/异戊醇(24:1),缓慢翻转离心管使内含物充分混匀后形成乳浊液,在 6000 g 离心 10min 使分层,取出水相转入另一离心管。
- 4) 重复第 3) 步,即用氯仿/异戊醇再抽提一次。
- 5) 在两次抽提后的水相中加入 2/3 体积冰冷的异丙醇,置于 -20℃ 30min 或过夜。然后在 10 000 g 离心 10min 收集沉淀,在室温下自然风干 4~5 分钟。
- 6) 将此沉淀溶于合适体积的(200~300 μl) 0.1TE 缓冲液(1.0mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 0.1mmol EDTA pH 8.0),加入 2~3μl RNase A 储备液(10mg/ml),在 37℃ 保温 1h 以裂解 RNA。

- 7) 保温后用等体积的氯仿/异戊醇(24:1)再抽提一次,将水相转入另一1.5-ml离心管,加入1/5体积10mol/L的NH₄Ac(使其总浓度为2mol/L),然后加入2体积冰冷的95%乙醇,在-20℃放置至少30min。
- 8) 在10 000 g离心10min,收集沉淀。
- 9) 加入70%乙醇洗沉淀(10 000 g离心10min)去除残留的无机离子,在室温下自然风干直至沉淀无乙醇味,若沉淀过干则难溶解。
- 10) 视沉淀的多少而溶入适量的(200~300μl/g新鲜组织)0.1TE缓冲液,分装后放入-20℃储存或放入4℃待用。

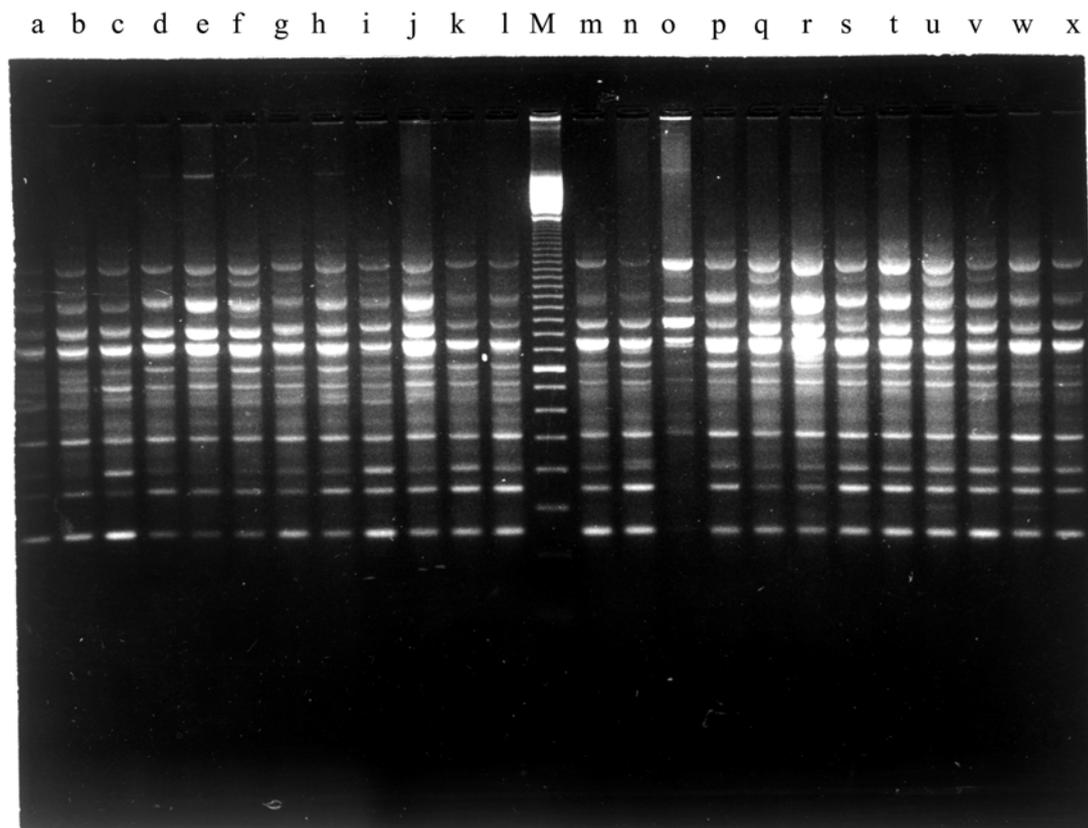


图 2.1 用 CTAB 法提取美国鹅掌楸(*Liriodendron tulipifera*)几个居群幼芽的 DNA 进行 RAPD-PCR 的式样,引物为 OP-C 20(刘丹硕士提供 1998)
a~b:密苏里居群; c~g:路易斯安那居群; h~l:北卡居群; m~r:南卡居群;
s~x:佐治亚居群; M: Pharmacia DNA 分子量标准

2.3.2 高盐低 pH 法

Guillemaut 等(1992)发展了一个快速、便宜而可靠的方法提取植物 DNA,这个方法的核心是提取介质的改进,他们使用 pH5.5 的酸性介质避免了多酚类物质的电离化和以后的进一步氧化,5mol/L 的 KAc(乙酸钾)是很好的蛋白质沉淀剂,也有利于多糖的去除,用去垢剂 SDS 代替了 CTAB,如果有必要可用不贵的 RPC-5 反向柱进一步纯化 DNA。邹喻苹等(1994)采用这个方法成功地提取了几种濒危植物及其近缘类群的总 DNA,这样的 DNA 可直接用于限制性酶切和 RAPD 分析,并未经过 RPC-5 柱纯化,具体步骤如下:

- 1) 在 1g 新鲜叶片或 0.2~0.3g 硅胶干燥的叶片中加入少许提取介质(100mmol/L pH4.8

的 NaAc, 50mmol/L pH8.0 的 EDTA, 500mmol/L NaCl, 2%PVP, 1.4%SDS, 此种介质刚好为 pH5.5) 及 1g 石英砂迅速研磨后, 用 10~15 ml 的提取介质将上述糊状物洗入离心管。(对裸子植物的针叶, 革质化或质地硬的叶片以及海带的配子体等必须用液氮研磨)

- 2) 在 65℃ 水浴保温 30min, 缓慢摇动。
- 3) 在室温下 10 000 g 离心 10min, 必要时上清液通过 4 层纱布过滤。
- 4) 在上清液中加入 2/3 体积 pH4.8 的 2.5mmol/L KAc, 混匀后置于 0℃ 30min 沉淀蛋白质。
- 5) 在 4℃ 下 10 000 g 离心 10min, 弃蛋白质沉淀。
- 6) 在上清液中加入 0.6 体积的冰冷的异丙醇, 混匀后置于 -20℃ 30min 沉淀核酸。
- 7) 沉淀溶于 0.5~1 ml 无菌水中, 10 000 g 离心 10min, 弃不溶物。
- 8) 在上清液中加入 0.6 体积的异丙醇, 混匀后于 10 000 g 离心 10min, 收集 DNA。
- 9) 用 70% 乙醇洗沉淀, 在空气中干燥 5min。
- 10) DNA 沉淀溶解在合适体积的 (~200 μ l) 0.1TE 缓冲液中, 分装后存放于 -20℃ 或 4℃ 待用。

2.3.3 核 DNA 的制备

细胞总 DNA 的 85% 存在于细胞核中, 如果人们不是做叶绿体 DNA 或线粒体 DNA 研究, 提取核基因组 DNA 就足以满足多种分子生物学研究的要求。对做居群生物学研究而言, 只需在组织研磨(研磨介质中不含 CTAB 或 SDS 等去垢剂)后细胞裂解前加一次低速离心(一般在 2000 g 以下)将细胞核粗制剂分离出来, 然后在此基础上再用 CTAB 法或高盐低 pH 法分离核 DNA。以下介绍 Wang 等(1996)发展的从硅胶干燥的野生葡萄叶分离核 DNA 的方法:

- 1) 在液氮中研磨 0.5g 硅胶干燥的叶片, 研磨同时加入 2g (~6%, W/V) PVP 干粉。
- 2) 将研磨好的干粉转入 50-ml 离心管, 加入 35ml 冰冷的提取介质 1 (0.2 mol/L Tris-HCl pH8.0, 50mmol/L EDTA, pH8.0, 0.25 mol/L NaCl) 和 0.7ml β -巯基乙醇 (2%, V/V) 在 0℃ 放置 10min。
- 3) 在 4℃ 下 7000r/min 离心 10min, 收集沉淀(在此转速下叶绿体和部分线粒体也随核颗粒沉淀下来, 增加了 DNA 的产率)。
- 4) 在核颗粒中加入 15ml 65℃ 的提取介质 2 [100mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 20mmol/L EDTA pH 8.0, 2% (m/V) CTAB, 1.4mol/L NaCl] 和 30 μ l (0.2%) β -巯基乙醇, 在 65℃ 下保温 40min 或更长时间, 不时摇动。
- 5) 加入等体积的氯仿/异戊醇 (24:1), 混匀后于 4℃ 下 7000r/min 离心 10min, 将水相转入另一离心管。
- 6) 重复第 5) 步。
- 7) 在抽提后的水相中加入 2/3 体积的冰冷的异丙醇, 摇匀后于 -20℃ 放置 30min 或更长时间。
- 8) 在 4℃ 下 10 000r/min 离心 5min, 颗粒在室温下重新悬浮于 5ml 的 1 \times TE 中。加入 1/2 体积的 5mol/L 的 NaCl, 缓慢摇匀后加入 2 体积的冰冷乙醇, 在 -20℃ 放置 30min 或更长时间。
- 9) 在 4℃ 下 10 000r/min 离心 5min, 用 70% 乙醇洗沉淀两次, 然后在空气中干燥 30min。

10) 沉淀重新溶解在合适体积的 $0.1\times$ TE 缓冲液中。

王晓东等用野生葡萄硅胶干燥叶片提取核 DNA 进行 RAPD-PCR 的式样见图 2.2。

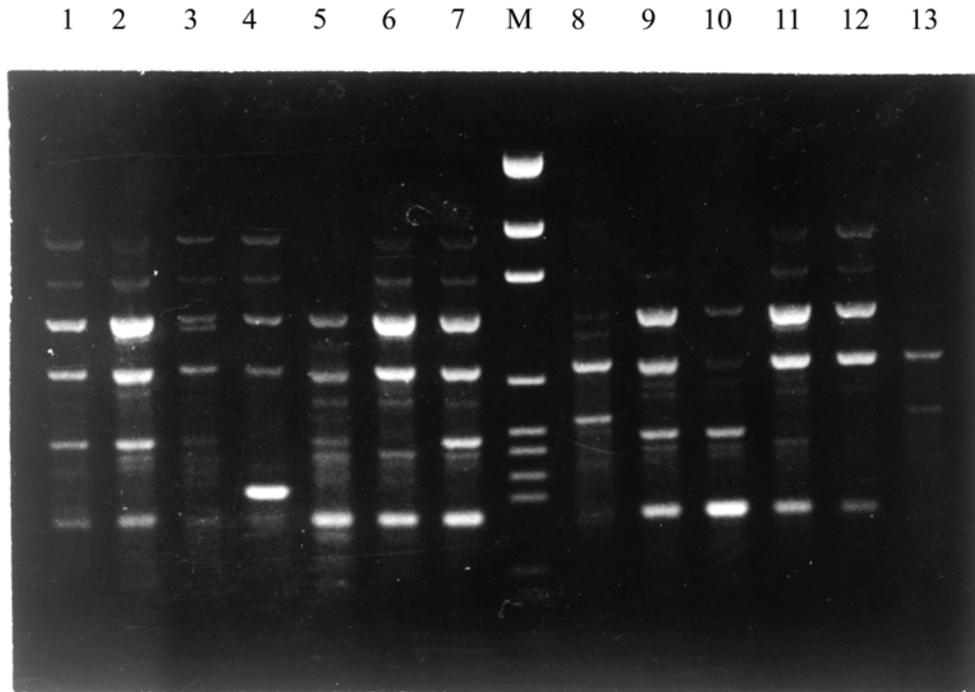


图 2.2 用引物 OP-A4 对山葡萄 (*Vitis amurensis*) 复合体几个近缘种的 RAPD 扩增式样(王晓东博士提供)

1~5 *V. amurensis*; 6~10 *V. amurensis* Rupr. var. *yanshanensis* D.Z. Lu et H.P. Ling;

11~13 *V. baihuashanensis* M Pharmacia 100bp DNA 梯子分子量标准

为做核基因组分析用,需要大量的和十分纯净的核 DNA, Peterson 等(1997)发展了一个从高酚含量的西红柿中提取毫克量核 DNA 的方法。未经冰冻的新鲜西红柿幼苗或叶片用乙醚处理和彻底洗净后放在含有核稳定剂的缓冲液中,用组织捣碎机匀浆化使核从细胞中释放出来,通过 TritonX-100 处理除去叶绿体和线粒体,用 Percoll(硅溶胶)梯度浓缩细胞核,在此基础上提取与纯化核 DNA。

2.3.4 DNA 的小规模制备

如果制备 DNA 的材料来之不易(珍稀濒危,化石或腊叶标本),或同时要提取大量平行样品(例如用 PCR 技术进行居群遗传学研究常常需要提取数以百计或上千份 DNA 样品)时,人们宁愿选择小规模制备方法。30~50mg 干材料或 100~200mg 鲜材料加入少许石英砂后直接在 1.5ml 离心管中研磨,研捶可用合适大小的玻璃棒加工而成,玻璃棒的一端用金刚砂磨成毛面,其大小正好与离心管的底部吻合,如有条件使用电动匀浆器则更好。研磨以后的步骤根据需要或采用 CTAB 法或采用高盐低 pH 法提取 DNA。图 2.3 是 Xie 等(1999)用小规模制备普通野生稻硅胶干燥叶片总 DNA 及其 RAPD-PCR 式样,从图 2.3a 可见野生稻的 DNA 可与 λ DNA 相比较,其分子量接近 50kb,未见任何降解与弥散,由于模板质量好而得到好的 RAPD 扩增式样,扩增信号强,带与带之间清晰无弥散背景(见图 2.3b)。

λ 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13

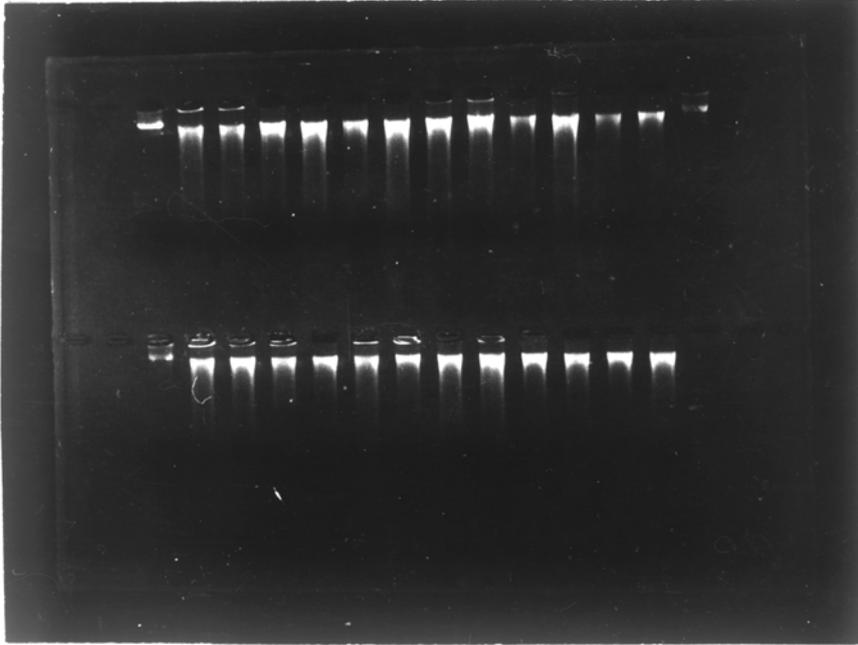


图 2.3a 用小规模制备方法从普通野生稻 (*Oryza rufipogon*) 第 10 居群的 25 个个体的硅胶干燥叶片制备的总 DNA, 上、下两行左边第一个泳道皆为 λDNA

a b c d e f g h i j k l m n o p q r s t u v w x y

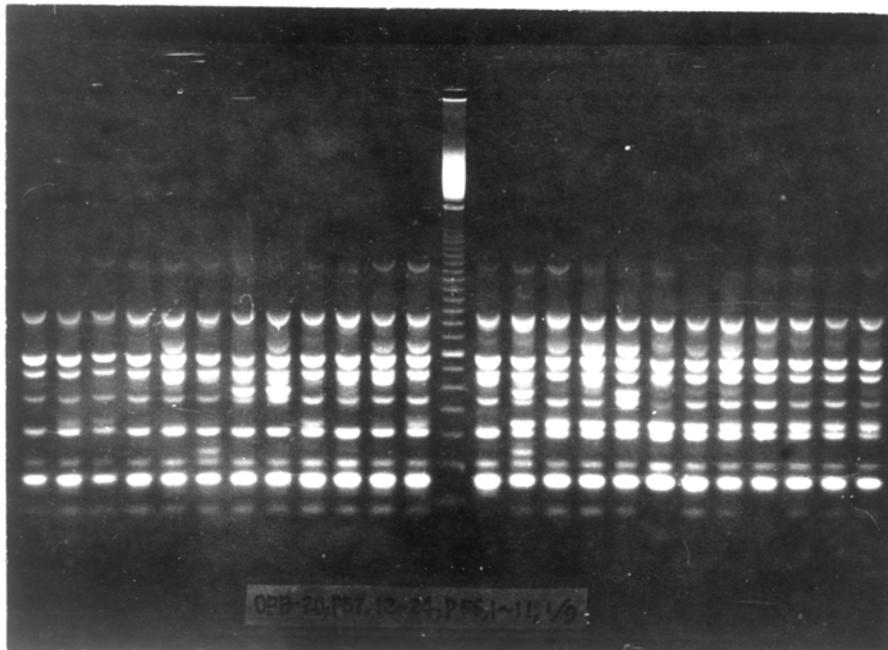


图 2.3b 用引物 OPB-20 在普通野生稻两个居群中的 RAPD 扩增式样: 左 a~l 泳道为第 57 居群的 12 个个体, 中间泳道为 Pharmacia 公司 100bp DNA 梯子作为分子量标准, 右 n~y 泳道为第 55 居群的 12 个个体

2.3.5 用试剂盒制备 DNA

国内外许多生物技术公司生产制备植物 DNA 的试剂盒, 制备流程各步骤所需介质、缓冲液、DNA 吸附物、沉淀剂、抽提液、洗涤液等全部商品化, 买来可直接用, 使得需要大

数量制备 DNA 时变得简单、方便,既节省时间又保证质量。例如 Dneasy Plant Mini Kits 是 QIAGEN 公司生产的一种制备植物 DNA 的小型试剂盒,大约花 1645 元可制备 50 个 DNA 样品。宝灵曼(Boehringer Mannheim)公司推出的植物 DNA 分离试剂盒是为从植物叶片和悬浮培养细胞中提取完整的高分子量的 DNA 而设计的,不含有机试剂,价值 319 美元的试剂盒可完成 150 个反应(植物材料 10mg~1g),获得的 DNA 可用于 PCR、限制性酶切和 Southern 印迹。安发玛西亚生物技术有限公司(Amersham Pharmacia Biotech.)1997 推出一种有效的去多糖的提取植物与真菌 DNA 的 Nucleon™ Phytopure™ 系统。该系统含有一种特有的带游离硼酸基 $[-B_3(OH)_2]$ 的树脂,它与多糖共价结合,产生一种环式硼酸酯,在氯仿提取时的有机相与含 DNA 的水相之间形成半固体的不溶物,因而能有效去除多糖,获得高产又高质的 DNA。该试剂盒小包装为 0.1g/50 次(150 美元),大包装为 1g/50 次(280 美元)。总的印象是使用试剂盒提取植物 DNA 虽然方便但比较昂贵。

2.3.6 用 Chelex-100 制备 DNA

Chelex-100 是一种 100~200 目的螯合树脂,对多价金属有高的亲和力,这种树脂是由苯乙烯二乙烯苯共聚物组成,其螯合基团是成对的亚氨基二乙酸盐离子。在 100℃ 高温和 $pH > 9$ 时,细胞膜胀破,DNA 被释放到溶液中,在这种条件下 DNA 不但会变性,而且在低离子强度的溶液中,从细胞中释放出来的金属离子还会加剧 DNA 的降解,正是因为 Chelex-100 可从溶液中除去金属离子,才使得在上述极端的条件下迅速提取 DNA 成为可能(Singer-Sam et al.1989,Walsh et al.1991)。用 Chelex-100 方法的主要缺点在于得到的是变性 DNA,不适合于克隆、Southern 印迹或限制性片段分析,而非非常适合于 PCR 扩增,因此对极微量的古生物材料如琥珀、博物馆储存的干样、化石(Cano et al. 1993,Sensabaugh 1994,尹蓁等 1996)以及法医上有重要价值的组织如血斑、精液斑、毛发等(Walsh et al. 1991,Sensabaugh 1994)有广泛的应用前景。要注意的是,在这种强碱性($pH 10 \sim 12$)的树脂中制备的 DNA 比用其他方法制备的更易降解(Sensabaugh 1994)。具体方法如下(Milligan. 1998):

- 1) 将组织样品放入装有 1ml 消毒蒸馏水的 1.5-ml 离心管中,在 20~25℃ 保温 15~30min,不时翻转离心管或温和震荡。
- 2) 在 12 000 g 离心 2~3min,去细胞残渣。
- 3) 取 20~30 μ l 上清液加入到 5% Chelex 悬浮液中,终体积为 200 μ l(5% Chelex 在不断缓慢搅拌下用剪去尖头的 1ml 移液头转移)。
- 4) 在 56℃ 保温 15~30min 后,高速震荡 5~10s。
- 5) 在 100℃ 沸水浴中保温 8min。
- 6) 在 12 000 g 离心 2~3min 沉淀树脂颗粒。
- 7) 取 20 μ l 上清液进行 PCR。
- 8) 其余样品存放在 -20℃ 或 4℃ 待用,在取出另一份进行 PCR 之前重复震荡和离心步骤。

2.3.7 用 Silica(SiO₂, 硅石)分离总 DNA

用分级处理过的硅石粉或微晶(现已有商品如 Sigma S-5631, Sigma D-5384 或其他来源)分离 DNA 十分迅速而简单。DNA 结合到硅石颗粒上,其他细胞成分通过洗涤去掉,然

后用 TE 缓冲液将 DNA 从硅石上洗提下来(Hoss & PÄÄbo 1993, Carter 1993)。这个方法可用于多种组织的 DNA 提取(Cano et al.1993, Hoss et al.1993, Nollau et al.1996),尤其适合于古生物和法医材料。多种商业上提取 DNA 的试剂盒,例如 Bio 101 公司的“GeneClean”和“RPM”;Bio-Rad 公司的“Prep-A-Gene”以及 Promega 公司的几种“Wizard”试剂盒都是用硅石结合 DNA,用 GuSCN(guanidinium isothiocyanate, 异硫氰酸胍)作为洗涤液(除了 GeneClean 用 NaI 外)。用硅石分离 DNA 的具体方法(Milligan. 1998)如下:

试剂

- 提取缓冲液: 6mol/L GuSCN, 100mmol/L Tris pH 7.0, 200mmol/L EDTA pH7.0, 1.3% (v/v) Triton X-100
 - 分级处理过的硅石浆(方法见 Milligan.1998)
 - 80% 乙醇, -20°C;
 - 洗涤缓冲液: 6mol/L GuSCN, 100mmol/L Tris pH 7.0
 - 丙酮
 - TE: 10mmol/L Tris pH 8.0, 1mmol/L EDTA pH 8.0
- 1) 在盛有 0.5~1.0ml 提取缓冲液的微量离心管中加入 25mg 组织样品(或 500mg 骨粉), 在 60°C 保温 1 至几小时, 不时混匀。
 - 2) 在 12 000 g 离心 5min, 去除任何细胞残渣。
 - 3) 转移 500 μ l 上清液至一新的含有 1ml 硅石浆(100mg 硅石)的微量离心管中, 在 20~25°C 保温 10min。
 - 4) 在 12 000 g 离心 5~10s, 使硅石沉淀。
 - 5) 用洗涤缓冲液洗硅石颗粒两次, 每次洗后使其沉淀。
 - 6) 用 100 μ l 80% 乙醇洗硅石颗粒两次, 每次洗后使其沉淀。
 - 7) 用 100 μ l 80% 丙酮除去残留的乙醇, 使硅石沉淀。
 - 8) 在 65°C 的炉或热板上干燥硅石颗粒。
 - 9) 用两份 65 μ l TE 在 65°C 洗提核酸, 取 5 μ l 做 PCR。
 - 10) 洗提下的 DNA 存放在 4°C 或 -20°C。

2.4 植物 DNA 的浓缩与纯化

在进行 PCR、限制性酶切或其他进一步分析之前通常需要纯化或浓缩 DNA。最常用的方法是用酚或氯仿抽提, 然后用乙醇或异丙醇沉淀。近十年来, 用改进的玻璃奶吸附法使纯化 DNA 的方法简单易行。另一方法是用 StrataClean 树脂(Stratagene 公司), 它是一种羟基化了的硅胶颗粒, 吸附蛋白质而对 DNA 的亲合力低, 因而达到纯化 DNA 的目的。氯化铯梯度离心是十分有效的纯化 DNA 的方法, 但需要超高速离心机, 氯化铯也比较昂贵。

2.4.1 有机溶剂抽提与沉淀

最常用的去除蛋白质的方法是用酚抽提, 酚能有效变性蛋白质, 而且可能溶解它。氯仿也是有用的蛋白质沉淀剂, 使得水相与有机相的界面稳定。酚与氯仿混合物可减少水相在有机相的滞留量, 因而可提高 DNA 的产率。异戊醇使界面清晰, 有助于两相分离, 变