

降香黄檀木材 DNA 提取方法的研究

余敏¹, 张浩¹, 周亮¹, 刘盛全^{1*}, 钱良存¹, 金青², 李大周³

(1. 安徽农业大学林学与园林学院, 合肥 230036; 2. 安徽农业大学生命科学院, 合肥 230036;

3. 海南省林业科学研究所, 海口 571100)

摘要: DNA 分析是一种有效地鉴别木材的方法, 但它要求要从木材中得到足够质量和数量的 DNA。因此, 本试验以降香黄檀气干材为原料, 采用改良的 CTAB 法、QIAGEN 试剂盒法和 PTB 法分别提取降香黄檀心材和边材部位的 DNA, 比较从不同部位木材组织中提取 DNA 的质量差异, 以期为从心材和边材组织中提取 DNA 探寻合适的方法。结果表明, 3 种方法从边材和心材部位提取 DNA 浓度范围分别为: 75.95 ~ 937.38 ng·μL⁻¹, 4.46 ~ 806.56 ng·μL⁻¹, 其中 PTB 法从边材和心材部位提取的 DNA 浓度都是最高的, 试剂盒法提取的 DNA 浓度都是最低的。3 种方法提取的边材部位 DNA 经纯化处理后能够满足 PCR 扩增目的片段的要求; 只有 PTB 法提取的心材部位的 DNA 经纯化处理后能够满足 PCR 扩增目的片段的要求。3 种方法都能够从边材组织中提取出 DNA, PTB 法更适合从心材组织中提取 DNA。

关键词: 降香黄檀; 气干木材; DNA 提取; PTB; PCR

中图分类号: S781

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2013)04-0603-05

DNA extraction from wood tissue of *Dalbergia odorifera* T. Chen

YU Min¹, ZHANG Hao¹, ZHOU Liang¹, LIU Sheng-quan¹, QIAN Liang-cun¹, JIN Qing², LI Da-zhou³

(1. School of Forestry and Landscape Architecture, Anhui Agricultural University, Hefei 230036;

2. School of Life Science, Anhui Agricultural University, Hefei 230036;

3. Hainan Institute of Forestry, Haikou 571100)

Abstract: DNA analysis is an effective method for wood identification. Obtaining sufficient quantity and quality DNA is the prerequisite. In this paper, *Dalbergia odorifera* T. Chen of *Leguminosae* sp. family was selected as material. Three methods, i.e., modified CTAB, DNeasy Plant Mini kit (QIAGEN) and PTB (N-phenacylthiazolium bromide) were employed to extract the DNA in sapwood and heartwood. The quality and quantity of the DNA extractions in the two zones were compared to explore the proper methods for extracting DNA in different parts of wood. The results showed that the concentration of DNA in sapwood and in heartwood isolated by the three methods ranged from 75.95-937.38 ng·μL⁻¹, 4.46-806.56 ng·μL⁻¹, respectively. The maximum value of DNA concentration was reached by the PTB method in sapwood and heartwood, meanwhile, the minimum value was reached by the kit method. The target sequence of DNA in sapwood isolated by the three methods was amplified successfully after being purified, while the DNA in heartwood isolated by the PTB method were subjected to polymerase chain reaction after being purified. The DNA in sapwood can be extracted by the three methods, but the DNA in heartwood can be extracted more suitably by the PTB method.

Key words: *Dalbergia odorifera* T.Chen; air-dried wood tissue; DNA extraction; N-phenacylthiazolium bromide; polymerase chain reaction

降香黄檀 (*Dalbergia odorifera* T. Chen), 俗称海南黄花梨, 是海南特有濒危树种, 为国家二级保

护植物。海南黄花梨其木纹如行云流水、质地坚韧缜密如玉, 木色瑰丽动人, 其木屑泡水饮用具有降

收稿日期: 2012-12-20

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31070636) 和安徽省高校木材科学与技术重点实验室经费共同资助。

作者简介: 余敏, 男, 博士研究生。E-mail: yuminwood@163.com

* 通信作者: 刘盛全, 男, 博士, 教授, 博士生导师。E-mail: liusq@ahau.edu.cn

血压、血脂的神奇药用功效,从明代开始就是我国高档传统家具的主要用材,民间素有“紫檀木中之王、黄花梨木中之后”的称誉^[1]。近年来,市场上出现了一种在气味、颜色、纹理、结构等方面与海南黄花梨极为相似的木材,主要来源于越南,故称之为越南黄花梨,学名多裂黄檀(*Dalbergia rimosa* Roxb)。因其与海南黄花梨从木材粗视构造上很难区分开来,市场上常有人用这种越南黄花梨冒充海南黄花梨,一般不是长期与黄花梨打交道的人很难分辨^[2]。越南黄花梨在市场上以次充好的现象出现,极大地扰乱了市场秩序,给消费者带来了巨大的经济损失。

准确、正确地识别木材材种对于按质论价、合理经营、识别假冒伪劣产品、科学合理地利用木材资源具有重要的意义,传统的木材识别方法要求识别者具有丰富的木材构造特征方面的专业知识,且传统的木材识别方法很难鉴别木材到种^[3]。随着分子遗传标记的发展,使其作为一项重要的法医学工具被广泛地应用到亲子鉴定和犯罪案件的侦破过程之中,特别是这项技术在考古学研究领域的成功应用^[4],为运用这项技术准确地识别木材提供了借鉴和依据。

运用 DNA 分子遗传标记技术识别和鉴定木材的前提是从木材组织中提取到足够质量和数量的 DNA 来满足 PCR 扩增反应的需求^[5]。因此,作者尝试从豆科常见显心材树种国槐生材中提取和扩增 DNA 并获得成功(另文发表)。在此基础上,以降香黄檀气干心材和边材为研究对象,利用 3 种不同的方法提取降香黄檀木材中的基因组 DNA,探索一种适合降香黄檀心材和边材基因组 DNA 的提取方法,为深入开展在分子水平上对降香黄檀等名贵木材进行分子标记识别打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料

本试验所使用的降香黄檀的边材和心材部分均为气干材,取自海南省海口市霸王岭。所有的木材试样在使用前用 75% 的乙醇对木材表面进行彻底的消毒,经无菌水冲洗并用已灭菌的滤纸擦干,用无菌的刀片切除试样表面部分以避免其他植物组织的污染,将样品切成小块,使用植物组织切片机将木块切削成碎片,随后放入预冷研钵中加入液氮和适量石英砂研磨成粉末备用。

试验所需试剂有 3% CTAB 提取缓冲液[100 mmol·L⁻¹ Tris-HCl (pH8.0), 20 mmol·L⁻¹ EDTA

(pH8.0), 1.4 mol·L⁻¹ NaCl, 3% CTAB, 1% PVP-40, 20 μL β-巯基乙醇(用时加入)], CTAB 洗涤缓冲液(76%乙醇, 10 mmol·L⁻¹ 醋酸铵), 氯仿:异戊醇(24:1), 异丙醇, TE 缓冲液(pH8.0)(10 mmol·L⁻¹ Tris-HCl, 1 mmol·L⁻¹ EDTA), 0.5 mol·L⁻¹ EDTA (pH8.0), 3 mg·mL⁻¹ 蛋白酶 K, 0.1 mol·L⁻¹ PTB, 酚:氯仿(1:1), 7.5 mol·L⁻¹ 醋酸铵。

1.2 DNA 的提取方法

边材和心材的基因组 DNA 分别用改良的 CTAB(3%)法、QIAGEN 试剂盒法和 PTB (N-phenacylthiazolium bromide) 法进行提取。

1.2.1 改良的 CTAB 法 取 0.5 g 木材粉末转移至 15 mL 离心管中并加入 4 mL 65℃ 预热的 3% CTAB 提取缓冲液,混合均匀后 65℃ 水浴 2 h,期间不时颠倒混匀;水浴结束后,混合物被等体积的氯仿:异戊醇(24:1)抽提 2 次(5 000 r·min⁻¹,离心 10 min);将上层水相转移至一新的 15 mL 离心管中,加入等体积的预冷异丙醇并完全混匀后置于-20℃ 下过夜;5 000 r·min⁻¹,离心 20 min,倒去液体后用 1 mL CTAB 洗涤缓冲液冲洗 2 次,室温下干燥;沉淀用 70%乙醇洗涤 2 次,并在室温下干燥;用 200 μL TE 溶解干燥后的沉淀,放入-20℃ 保存备用。

1.2.2 QIAGEN 试剂盒法 使用 QIAGEN 试剂盒法提取心材和边材基因组 DNA 时需用 DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) 和 DNeasy Plant Maxi Kit (QIAGEN) 中的 QIAshredder Maxi spin column。

相比较叶片和其他一些植物组织而言,使用 QIAGEN 试剂盒法提取木材 DNA 时需要对试剂盒说明书中的前 2 个操作步骤进行改变,以利于提高 DNA 提取效率。将第 1 步改为:称取 1 g 木材粉末放入到预冷研钵中并加入 4 mL Buffer AP1 浸泡 10 min;加入液氮和适量的石英砂到研钵中研磨湿的木材粉末;用小勺转移样品到 50 mL 离心管中并用 1 mL Buffer AP1 冲洗小勺;加入 8 μL RNaseA, 65℃ 水浴 10 min,期间上下颠倒混匀 2~3 次;加入 1.625 mL Buffer AP2 到混合物中混匀,放置到冰上 5 min, 12 000 r·min⁻¹ 离心 10 min。第 2 步骤改为:慢慢倒出水相到 QIAshredder Maxi spin column 中,离心后将浸湿的木材粉末用小勺加入到 QIAshredder Maxi spin column 中继续离心,收集流出物。其他步骤严格按照试剂盒说明书操作步骤进行。

1.2.3 PTB (N-phenacylthiazolium bromide) 法 取 1 g 木材粉末转移至 50 mL 离心管中,加入 5 mL 0.5 mol·L⁻¹ EDTA 使木材粉末完全浸没在 EDTA 中,室温下放置 48 h 使其脱矿质;脱矿质结束后,加入 500

μL 蛋白酶 K (MERCK) 和 1 mL $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PTB (Prime Organics), 使各组分混合均匀后 65°C 水浴 12 h; 水浴结束后加入等体积的酚:氯仿抽提, $12\ 000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min 后将上清液移至新离心管中; 向上清液中加入等体积的氯仿:异戊醇 (24:1), $12\ 000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min 将上清移至新 50 mL 离心管中, 重复此步骤; 加入 2 倍体积冷无水乙醇和 $500 \mu\text{L}$ $7.5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 醋酸铵, -20°C 下存储 12 h 沉淀 DNA; 结束后 $12\ 000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 20 min 倒去液体, 沉淀用 80%乙醇洗涤 2 次并在 80%乙醇中静置过夜; $12\ 000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 20 min 后室温下干燥, 加入 $200 \mu\text{L}$ TE 溶解沉淀后放入 -20°C 保存备用。

1.3 DNA 纯度和浓度的检测

3 种方法提取的心材和边材基因组用 NanoDrop ND-1000 分光光度计检测样品的 A_{260} 和 A_{280} 的吸光度值, 计算 $A_{260/280}$ 的比值, 并用 1.0%琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 样品的完整性和降解程度。

1.4 基因组 DNA 的纯化

通过预实验结果发现, 直接以 3 种方法提取的基因组为模板扩增目的片段, 扩增反应都是失败的, 这是由于未纯化的 DNA 原液中存在 PCR 反应的抑制物。故 3 种方法提取的心材和边材基因组在进行 PCR 反应之前都需要用 High Pure PCR Template

Preparation Kit (Roche) 对其进行纯化处理。

1.5 PCR 扩增反应

选择扩增 rDNA ITS2 (internal transcribed spacer 2) 序列, 根据 ITS2 两侧的保守序列 5.8S 和 26S 设计引物, 引物由上海 invitrogen 公司合成。

F(5'-ATGCGATACTTGGTGTGAAT-3')

R(5'-GACGCTTCTCCAGACTACAAT-3')

$25 \mu\text{L}$ 的反应体系包括 TaKaRa LA Tap ($5 \text{ U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) $0.3 \mu\text{L}$, $10\times\text{LA Buffer II}$ $2.5 \mu\text{L}$, dNTP Mixture $1 \mu\text{L}$, 上下游引物各 $1 \mu\text{L}$, 纯化后的基因组模板 $1 \mu\text{L}$, 其余用灭菌的 ddH_2O 补足 $25 \mu\text{L}$ 。扩增程序: 94°C 预变性 5 min, 94°C 变性 30 s, 56°C 退火 30 s, 72°C 延伸 45 s, 进行 40 个循环后 72°C 延伸 10 min。以灭菌的 ddH_2O 代替模板 DNA 作空白对照。扩增产物经 1.2%琼脂糖凝胶电泳进行分析。

2 结果与分析

2.1 紫外分光光度计检测 DNA 质量

使用 NanoDrop ND-1000 分光光度计检测经 High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche) 纯化前和纯化后基因组的 A_{260} 、 A_{280} 并计算 $A_{260/280}$ 和 DNA 浓度。结果见表 1。

表 1 3 种 DNA 提取方法提取不同部位的 DNA 的质量和浓度
Table 1 Quality and concentration of DNA extraction in different zones by the three methods

材料 Material	DNA 提取方法 DNA extraction method	纯化前 Before purification		纯化后 After purification	
		$A_{260/280}$	浓度/ $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ Concentration	$A_{260/280}$	浓度/ $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ Concentration
边材 Sapwood	改良的 CTAB 法 Modified CTAB method	1.75	499.45	1.91	126.80
	试剂盒法 Kit method	1.60	75.95	1.82	26.40
	PTB 法 PTB method	1.83	937.38	1.92	62.94
心材 Heartwood	改良的 CTAB 法 Modified CTAB method	1.17	5.82	1.80	2.27
	试剂盒法 Kit method	1.34	4.46	1.82	0.04
	PTB 法 PTB method	1.16	806.56	1.88	18.80

通过试验数据可以看出, 3 种方法从边材和心材部位提取 DNA 浓度范围分别为: $75.95\sim 937.38 \text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, $4.46\sim 806.56 \text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, 3 种方法提取的心材和边材基因组除了 PTB 法提取的边材基因组纯度较好外, 其他各组样品均存在不同程度的蛋白质、多糖和酚类污染, 通过纯化操作后 3 种方法提取的心材和边材基因组的纯度均得到提高, 蛋白质、多糖和酚类物质去除明显。使用 PTB 法提取的心材和边材基因组浓度明显高于其他 2 种方法, 经纯化操作后由于降解成小片段的 DNA 在纯化过程中被洗

脱下了, 造成各组样品浓度均有较大损失。3 种方法提取的边材基因组经纯化后的浓度均能满足后续的 PCR 反应要求, 而只有 PTB 法提取的心材基因组经纯化后的浓度能够满足后续的 PCR 反应要求。

木材中的 DNA 是否被成功提取出来是通过 PCR 反应是否成功扩增出目的片段来判断的, 而不是单纯地以紫外分光光度计检测样品中的 A_{260} 、 A_{280} 比值为指标来判断的。因为从木材中提取的 DNA 含有蛋白质、芳香族化合物、酚类和多糖等物质, 这些物质的存在会使紫外分光光度计不能准确的测

量出 DNA 的含量,而且由于木材存放环境的影响多造成木材中常有内生细菌的污染,这些内生细菌基因组的存在也会造成木材 DNA 含量不能准确被紫外分光光度计准确的测量出来^[6]。

2.2 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量

取 5 μ L DNA 提取液,用 1.0%琼脂糖凝胶在 100 V 电压条件下电泳 30 min,经 UVP 凝胶图像分析系统检测,结果见图 1。

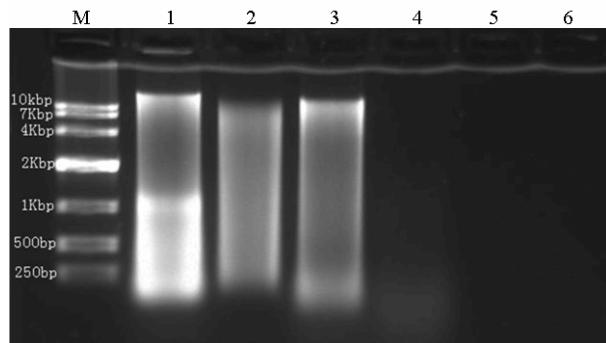


图 1 3种方法提取木材不同部位基因组 DNA 电泳
Figure 1 Agarose gel electrophoresis of genomic DNA from wood in different zones by the three methods

1~3 为边材分别用改良的 CTAB 法、试剂盒法和 PTB 法提取 DNA 琼脂糖检测条带;4~6 为心材分别用 PTB 法、改良的 CTAB 法和试剂盒法提取 DNA 琼脂糖检测条带

Lanes of 1-3 represent detection results of extracted DNA from sapwood with modified CTAB method, kit method and PTB method, respectively. Lanes of 4-6 represent detection results of extracted DNA from heartwood with PTB method, modified CTAB method and kit method, respectively

通过基因组 DNA 凝胶电泳图可以看出,3 种方法提取心材和边材基因组均呈现出不同程度的降解。3 种方法提取的边材基因组降解的片段范围大小从 100 bp 到 15 000 bp,其中改良的 CTAB 法提取的基因组片段在 1 000 bp 以下更为集中。3 种方法提取的心材基因组只有 PTB 法提取的基因组能被检测出来并且都降解成为 2 000 bp 以下的片段。

改良的 CTAB 法和试剂盒法从心材中提取的 DNA 丰度低,且以这 2 种方法提取的 DNA 为模板进行 PCR 扩增反应都是失败的。这 2 种方法提取的 DNA 浓度低,无法为 PCR 反应提供足够的模板。这是由于在心材 DNA 提取过程中存在 Maillard 产物和多糖类 PCR 抑制物质^[7]。Maillard 反应的副产物正是造成 DNA 氧化从而降低 DNA 质量和丰度的原因。PTB 法能够成功的从心材中提取出 DNA,是由于 PTB 能够切断 Maillard 反应中还原性糖和蛋白质之间的交联键,帮助 DNA 从中释放出来^[8]。

1~3 分别为改良的 CTAB 法、试剂盒法、PTB 法提取边材基因组扩增 rDNA ITS2 序列;4 为 PTB 法提取的心材基因组扩增 rDNA ITS2 序列;CK: 空白对照

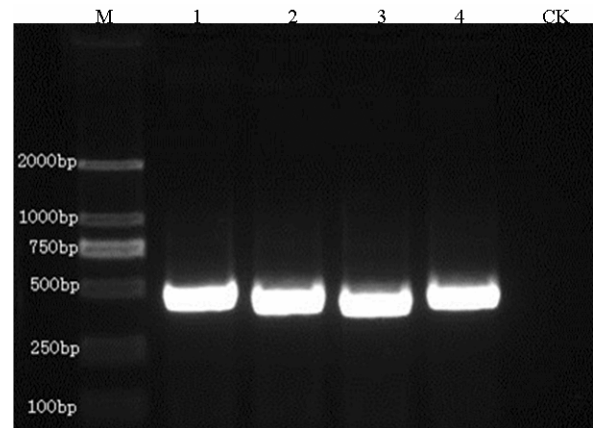


图 2 PCR 扩增 rDNA ITS2 序列凝胶电泳
Figure 2 Agarose gel electrophoresis pattern of PCR products of amplified rDNA ITS2

Lanes of 1-3 represent amplified rDNA ITS2 band using extracted DNA from sapwood with modified CTAB method, kit method and PTB method, respectively; lane 4 represents amplified rDNA ITS2 band using extracted DNA from heartwood with PTB method; CK, blank control

2.3 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物

以纯化过的 3 种方法提取的边材基因组和 PTB 法提取的心材基因组为模板,在 BIO-RAD C1000 PCR 仪上扩增 rDNA ITS2 序列,扩增结束后取 5 μ L PCR 产物,用 1.2%琼脂糖凝胶电泳检测(见图 2)。

通过图 2 可以看出,各泳道的 PCR 目的条带特异性好、丰度高。由于木材中存在许多如多糖、单宁、木质素和蛋白质等化合物,这些化合物的存在会严重干扰和抑制 PCR 扩增反应的顺利进行^[9]。如果直接以未纯化的基因组为模板来扩增目的条带,结果都是无法扩增出来的,我们通过对提取的 DNA 进行纯化操作以后,PCR 反应都能够顺利进行。说明经纯化操作之后得到的基因组 DNA 能够符合分子生物学操作要求。

3 小结与讨论

早在 20 世纪 70 年代,对木质部管状分子(TE)分化的细胞学以及 DNA 含量的变化就有许多研究,许多研究都已证明 TE 的分化是一种典型的细胞编程性死亡^[10](PCD)。具有一定功能的边材细胞向心材转变的过程发生在木质部细胞 PCD 过程的降解清除阶段。TE 逐渐失去其原生质体,各种细胞器和细胞核开始降解, DNA 片段化产生 DNA ladder^[11],最终细胞器消失,片段化的 DNA 附着在细

胞壁上,直至心材中所有细胞死亡。

相比较那些新鲜、幼嫩且具有分生能力的植物组织而言,从木材组织中提取和扩增 DNA 要困难的多。主要体现在以下几个方面:(1)木材组织中存在的 DNA 数量和质量都较低,且都降解成小片段^[12]。(2)木材组织中存在有厚壁的管状分子,导致在研磨处理这些坚硬的组织时更易产生高温,从而进一步损伤 DNA 分子。(3)木材中存在一些如蛋白质、酚类、多糖、单宁和色素等物质,这些物质往往会影响 DNA 聚合酶的活性,干扰引物与模板的结合,从而导致 PCR 扩增的失败^[6]。(4)木材存储环境的影响,如潮湿环境下极易造成木材腐朽和真菌污染,导致 DNA 的进一步降解和污染^[13]。

本试验通过 3 种方法分别对降香黄檀气干木材的心材和边材进行基因组 DNA 提取、纯化并进行 PCR 扩增 rDNA-ITS2 序列。通过试验结果可以看出,3 种方法都能够从边材组织中提取出 DNA,PTB 法更适合从心材组织中提取 DNA,通过纯化处理后,从心材和边材中提取的 DNA 都能够进行 PCR 扩增反应并扩增出目的条带,为实现以 rDNA 的 ITS 序列来标记识别木材奠定了基础。

参考文献:

- [1] 邱治军,周光益,陈升华.海南特有珍贵红木树种-降香黄檀[J].林业实用技术,2004(6): 41-42.
- [2] 李桂兰,徐峰,罗建举,等.海南香枝木与越南香枝木木材构造特征比较解剖研究[J].广西农业生物科学,2008,27(2): 154-157.
- [3] 任洪娥,高洁,马岩.我国木材材种识别技术的新进展[J].木材加工机械,2007(4): 38-41.
- [4] Gugerli F, Parducci L, Petit R J. Ancient plant DNA: review and prospects [J]. *New Phytologist*, 2005, 166(2): 409-418.
- [5] Yoshida K, Kagawa A, Nishiguchi M. Extraction and detection of DNA from wood for species identification [C]// *Proceedings of the international symposium on development of improved methods to identify shorea species wood and its origin*. 2007(1): 27-34.
- [6] Rachmayanti Y, Leinemann L, Gailing O, et al. DNA from processed and unprocessed wood: factors influencing the isolation success[J]. *Forensic Science International Genetics*, 2009, 3(3): 185-192.
- [7] Shepherd M, Cross M, Stokoe R L, et al. High-throughput DNA extraction from forest trees [J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2002, 20: 425a-425j.
- [8] Asif M J, Cannon C H. DNA extraction from processed wood: a case study for the identification of an endangered timber species (*Gonystylus bancanus*)[J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2005, 23: 185-192.
- [9] Pandey R N, Adams R P, Flournoy L E. Inhibition of random amplified polymorphic DNAs (RAPDs) by plant polysaccharides[J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1996, 14(1): 17-22.
- [10] Fukuda H. Programmed cell death of tracheary elements as a paradigm in plants [J]. *Plant Molecular Biology*, 2000, 44: 245-253.
- [11] 崔克明.植物发育生物学[M].北京:北京大学出版社,2007: 183-189.
- [12] Reynolds M M, Williams C G. Extracting DNA from submerged pine wood [J]. *Genome*, 2004, 47(5): 994-997.
- [13] Finkeldey R, Leinemann L, Gailing O. Molecular genetic tools to infer the origin of forest plants and wood[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 85(5): 1251-1258.