

# 植物標本DNA抽取、保存與應用分析



胡哲明

國立臺灣大學生態學與演化生物學研究所



# 植物標本館與當今研究領域之結合

- 實體標本的蒐藏保存
- 物種條碼(bar coding)的建置與問題
- 系統分類、分子譜系分析等研究，對植物標本館運作的挑戰
  - 對原有標本藏品的破壞
  - 針對DNA材料的額外準備
  - 抽取後DNA的保存
  - DNA抽取技術層面的問題

<http://www.dnabarcoding101.org>



# 利用DNA 序列做譜系分析的優點

## ● 優點

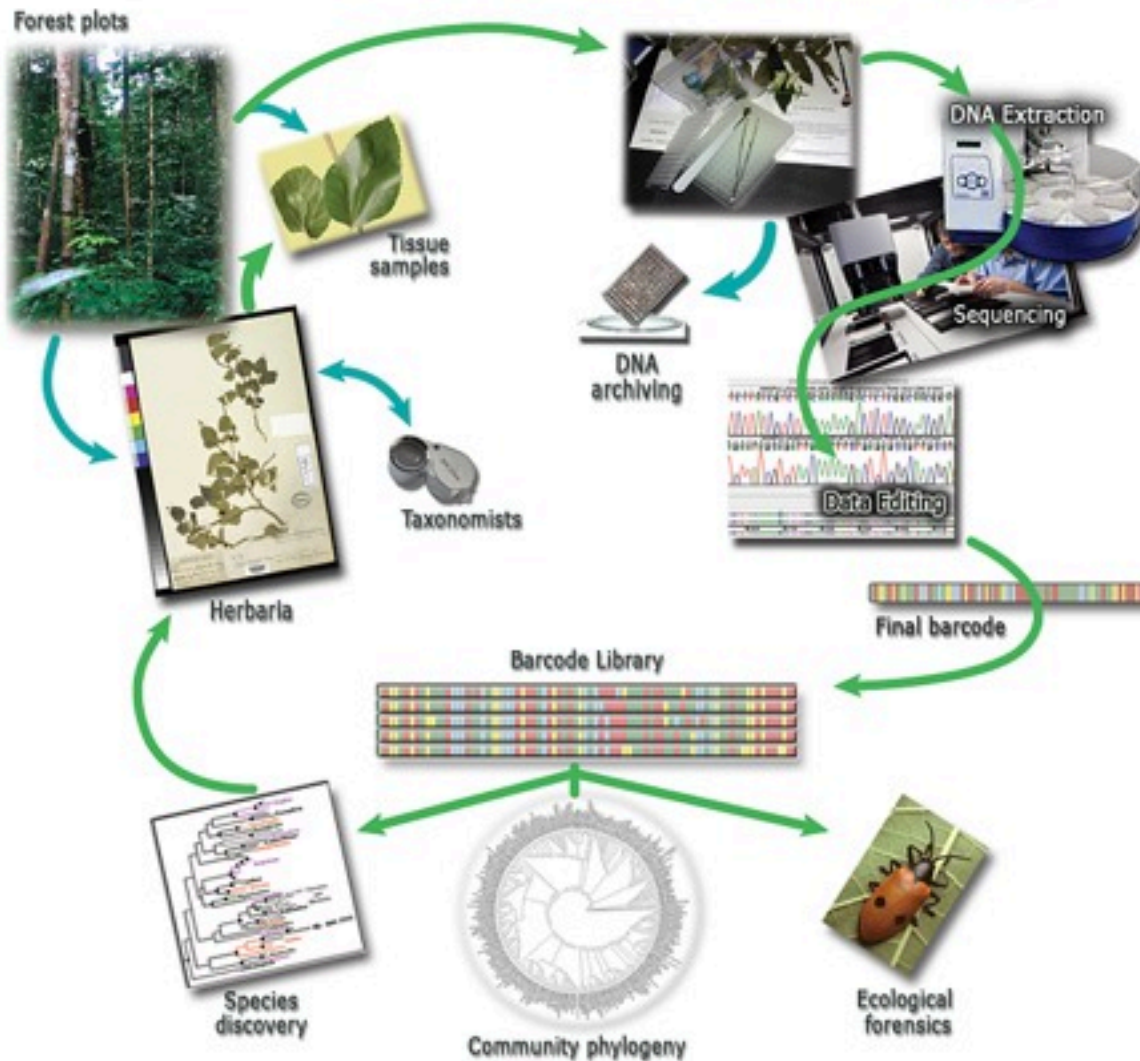
- 只需要極少量的DNA, 從標本, 甚至化石的DNA, 就可以做研究
- 很容易合併以前, 或他人的資料做分析
- 可以應用分子演化的模式進行更深入的分析
- 可以應用在所有的分類層級
- 在不同的基因組中都有研究

## ● 缺點

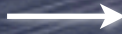
- 一般需要較長的片段才能得到足夠的有效特徵
- 某一些的DNA序列不見得能夠代表整個基因組的演化

# Plant DNA Barcode Project

## Plant DNA Barcode Cycle



# DNA材料準備的基本模式



以報紙壓乾



烘箱42°C烤乾



自標本上採樣

# DNA材料準備的基本模式



放入含硅膠的封口袋中



直接放入液態氮中



# DNA的萃取

植物材料



CTAB 65°C, 1 hr



Chloroform處理

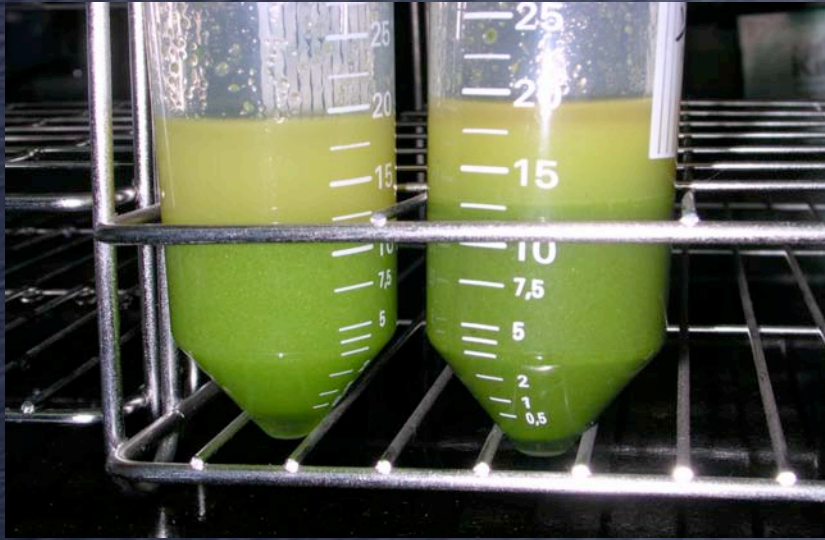


酒精或異丙醇沈澱

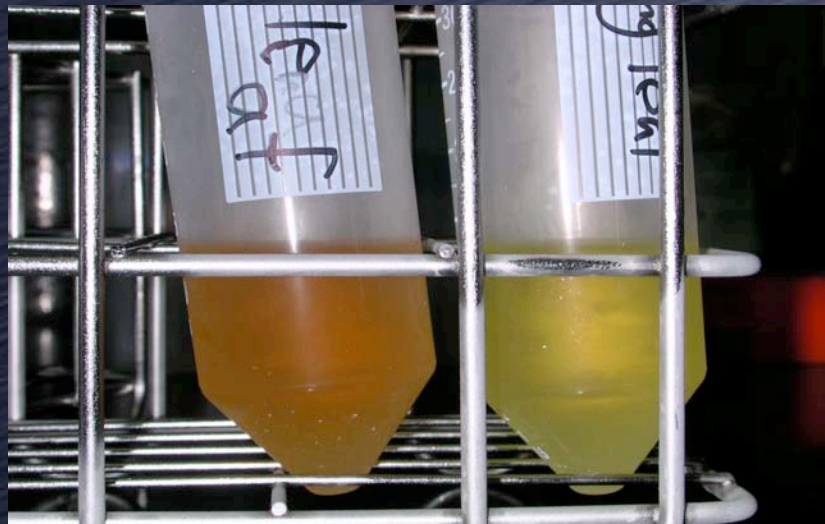


離心，乾燥後溶於TE buffer





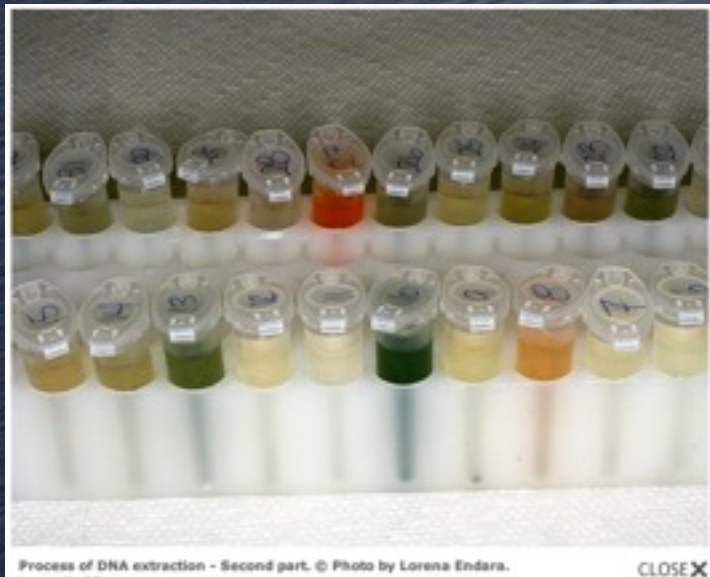
加入CTAB萃取液，置於65°C  
水浴1hour後。  
再加入Chloroform去除雜質和  
可溶性有機物質



加入CI溶液離心後，移至新  
離心管的澄清上清液。

以酒精沈澱DNA，再乾燥後  
溶於TE buffer





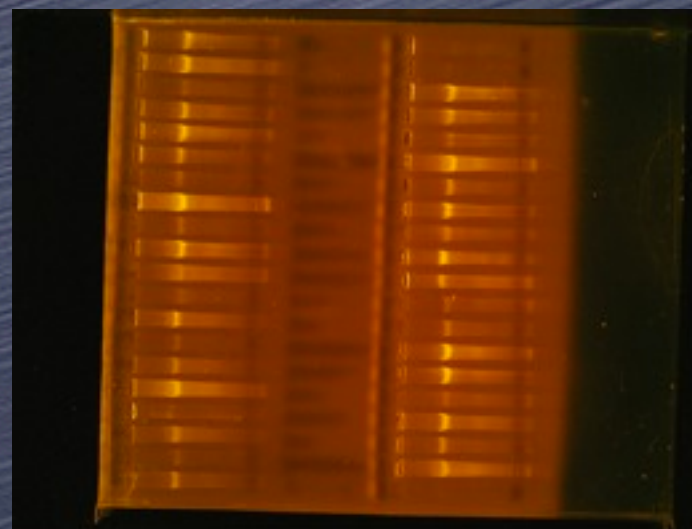
Process of DNA extraction - Second part. © Photo by Lorena Endara.

CLOSE X



Preparation of the gel to test the quality and extraction of DNA. © Photo by Lorena Endara.

CLOSE X



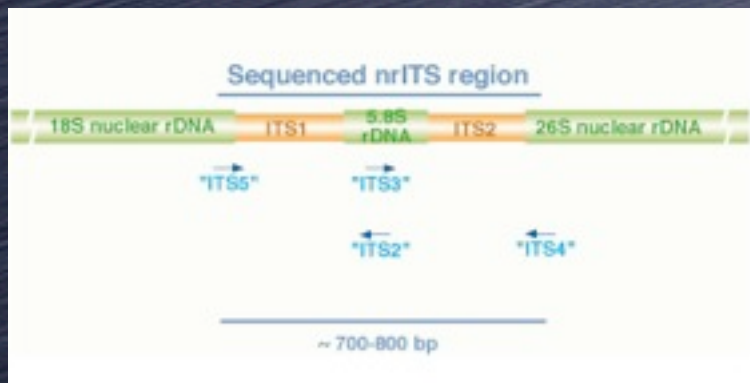
Gel showing the quality of the total DNA stored in the GRR. © Photo by Lorena Endara.

CLOSE X

## 確認DNA萃取結果

# DNA萃取法的修正

不純物	方法	效果
一般性	Change % of CTAB PEG Repeat chloroform wash Repeat precipitations Increase buffer:tissue	****
Polyphenolics	PVP-40	****
Mucilages	Separate organelles	**
Polysaccharides	Increase salts	***
Enzymatic activity	Columns EtOH precipitation	***



PCR



電泳



EtBr 染色



照像

後續定序分析

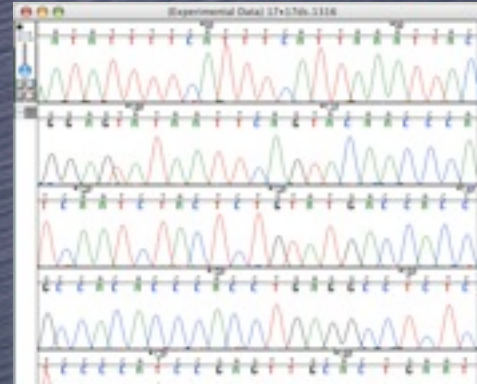
DNA extraction



PCR amplification

Cloning

Sequencing



Alignment

Phylogenetic analysis



# 琥珀中的DNA之保存效能

將一洋菇切塊



FAA固定

置陰涼處

置陽光下

置水中

DNA 成份分析  
PCR  
DNA序列定序

# 利用包於琥珀中洋菇的實驗結果

	新鮮 (控制組)	FAA固定	置陰涼處	置太陽下	置水中
DNA成份 分析	+	+	+	+	+
PCR擴增 反應	+	-	+	+	+
DNA定序	+	-	-	+	-

Best

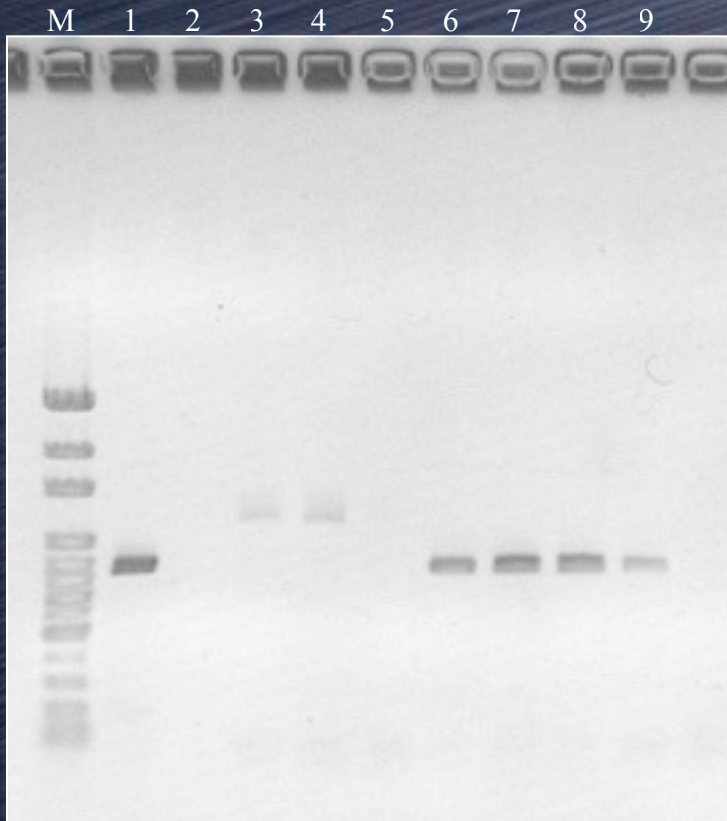
●在DNA定序結果中，以在陽光下乾燥琥珀之洋菇，其序列最  
近似乎新鮮材料；其餘都有3-62%的序列變異產生

## 利用 genomic DNA 進行譜系分析的難題

- Adequate markers sometimes difficult to find
  - Chloroplast markers are not always applicable, e.g. non-photosynthetic plants
  - Nuclear markers are either too difficult to amplify, or often subjected to gene family problems
- Impurities in ordinary DNA extraction prep can block the following PCR
- Solution
  - cDNA?

# genomic DNA purification問題

## PCR of nr18S rDNA



1: *Wisteria* DNA

2: 500ng

3: 180ng

4: 90ng

5: 20ng

6: 500ng

7: 180ng

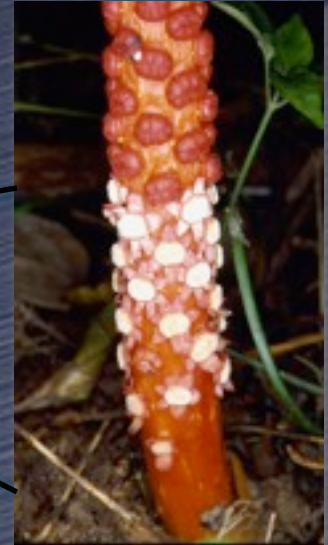
8: 90ng

9: 20ng

10: H<sub>2</sub>O

002: 穗花蛇菰

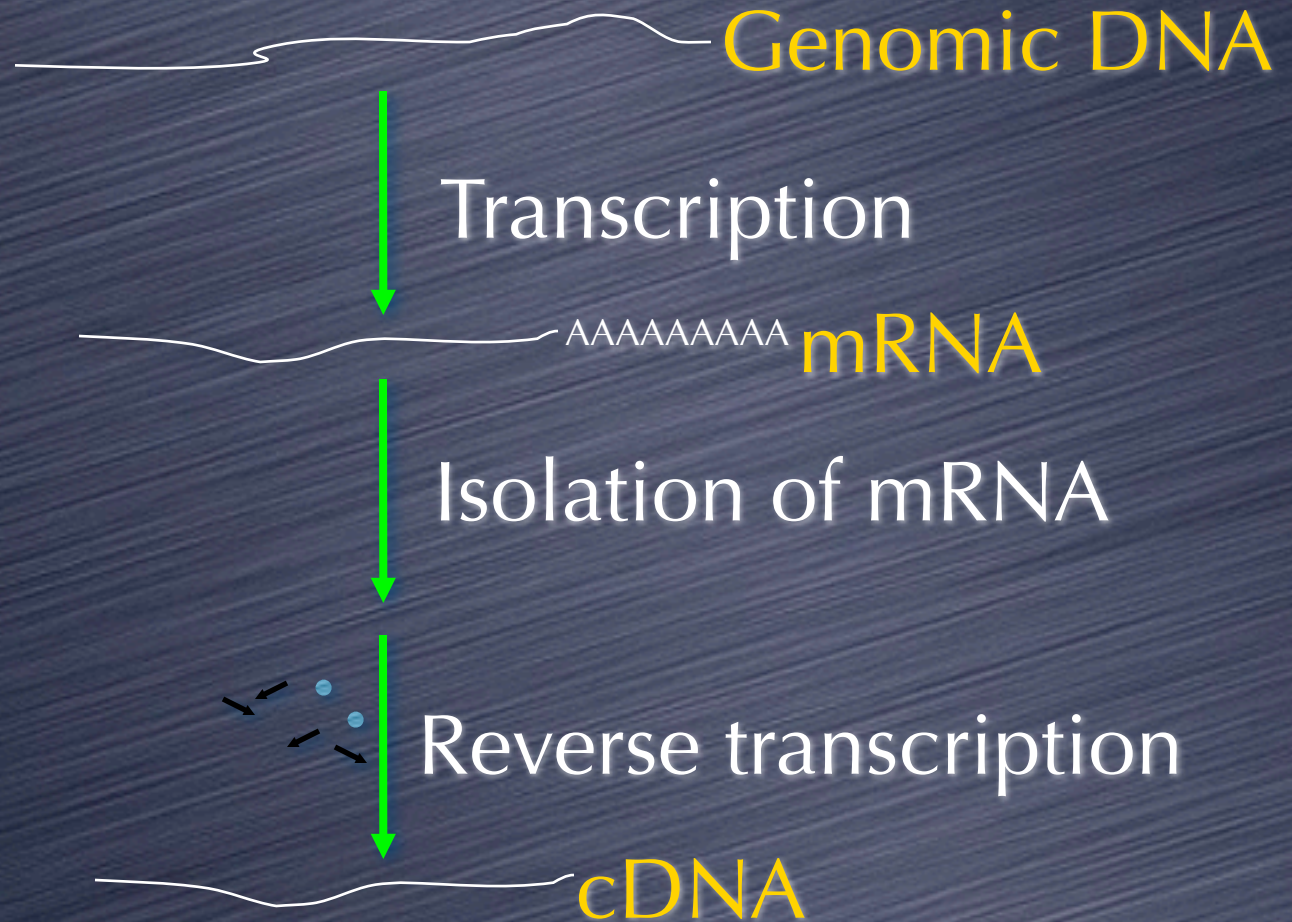
006: 水晶蘭



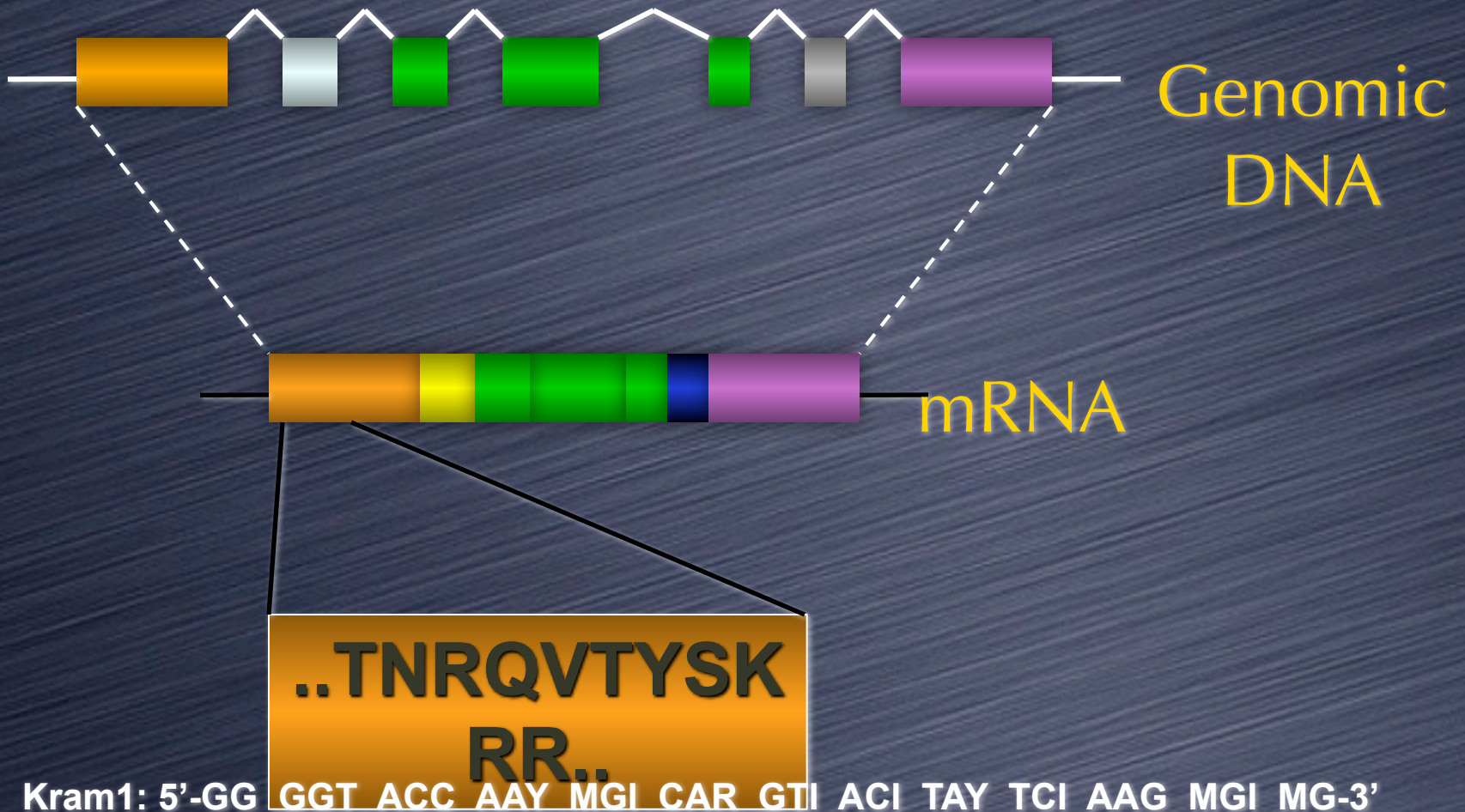
What can we do?



# The making of cDNA



# Example: MADS-box genes

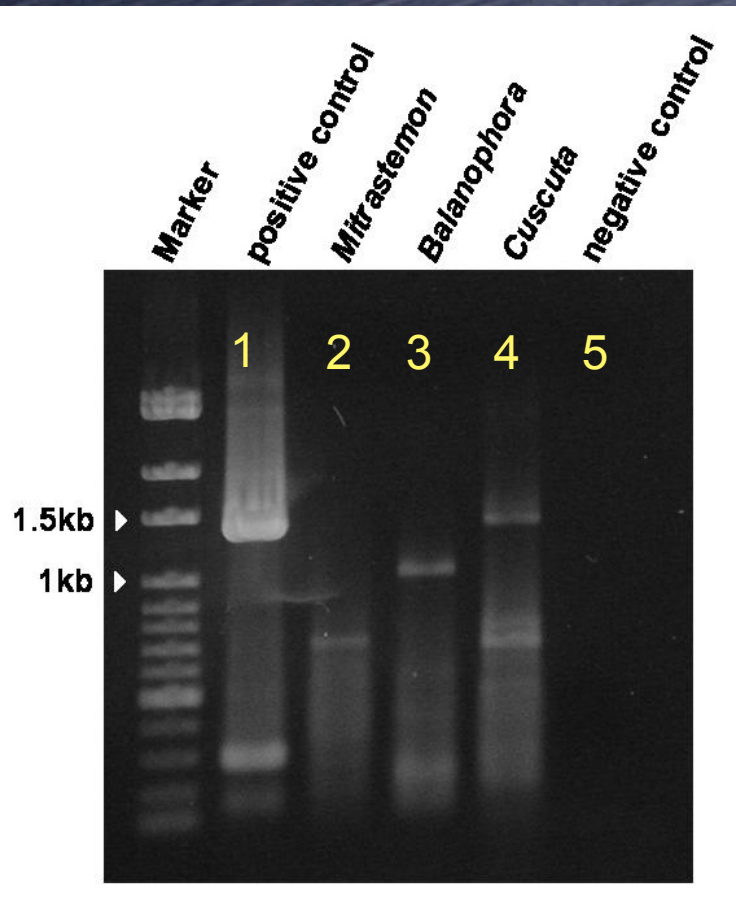


# RNA isolation

- LiCl method
  - LiCl-LiCl
- Pine Tree method (Chang et al. 1993)
  - CTAB-LiCl
- TRIzol (Invitrogen)
  - Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform
- Concert Plant RNA Reagent (Invitrogen)
  - 100mg-5g tissues



# RT-PCR of *rbcL*



## Taxa

## RNA isolating method

1: *Loranthus kaoi*

1: Pine Tree

2: *Mitrastemon kanehirai*

2: Pine Tree

3: *Balanophora laxiflora*

3: Pine Tree

4: *Cuscuta australis*

4: TRIzol

5: Negative control

# Pros and cons using cDNA data

## ● Pros

- Good for recalcitrant materials
- Relatively short
- Contain functional information
  - Analysis of deduced amino acid sequences
  - Codon usage
  - Expression assay

## ● Cons

- Fresh materials
- Known expressed in the sampled tissues
- Experienced hands
- RNA editing and phylogenetic analysis

# 植物標本館中的DNA長期保存

- 乾燥葉片標本的蒐藏保存
  - Silica gel
- 種子庫
- DNA的保存



<http://botany.si.edu/projects/dnabarcode/cycle.htm>

# DNA bank

- DNA抽取，資料蒐集與服務
- -80°C超低溫冰箱
- DNA資料庫
  - GenBank or others
  - DNA barcoding project



<http://herbarium.duke.edu/databases/fern-dna-database>

<http://www.nybg.org/science/dna-bank.php>

# Regulation on obtaining materials from herbarium specimens

- 大多數標本館同意因研究目的自標本上採集小部份材料進行DNA萃取
- 有同意的標本館都有共通的準則





# TAI植物標本館取樣原則

- 館藏同種類標本之份數量多者，同意取樣（量多之定義視不同種類及情況而定）
- 標本貯藏年份（珍藏年代久遠、屬珍稀者不同意取樣）
- 標本狀況：受蟲蝕情況（標本損壞嚴重、亟需加以維修保護者不同意取樣）
- 標本珍貴等級：若為模式、新紀錄種等特珍貴標本則不同意取樣
- 研究者背景：研究植物相關科學之博士班研究生以上，碩士班研究生需有指導教授簽章認可。

## 結論與建議

- 自標本館典藏標本採樣抽取DNA應為最後選項，乃不得已而為之的手段
- 標本館應另外有一套為DNA萃取使用的標本存放
- 利用silica gel貯存植物材料為最經濟的做法，但也需要
- 臺灣植物研究需要一個DNA bank，植物標本館應有現代化的前瞻作法

