

适用于 SSR 分析的广西莪术 DNA 提取方法考察

杨妮, 苏伟敏, 靳雅惠, 方彬华, 王建*
(广西中医药大学药学院, 南宁 530001)

[摘要] **目的:** 获取适用于广西莪术简单序列重复(SSR)分析的高质量 DNA, 为该品种的遗传多样性研究提供参考。**方法:** 选择广西莪术嫩叶为材料, 采用经典十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)法和改良 CTAB 法提取广西莪术总 DNA, 考察手工和机器研磨的差异性, 采用 UV 检测 DNA 浓度和纯度, DNA 作为模板进行聚合酶链反应(PCR)扩增, 引物选择 cleft SSR-01, cleft SSR-03, cleft SSR-06, cleft SSR-08, cleft SSR-14, cleft SSR-15, 利用聚丙烯酰胺凝胶电泳检测 DNA 扩增效果。**结果:** 改良 CTAB 法所提 DNA 的 $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ 1.8~2.0, 蛋白质、多糖、RNA 等物质去除较彻底, DNA 符合 PCR 扩增结果要求, 使用姜黄属通用引物能扩增出清晰条带。经典 CTAB 法所提 DNA 的 $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ 1.50~1.60, 含较多杂质, 无法用于 PCR 扩增等分子生物学研究。**结论:** 改良 CTAB 法提取所得 DNA 质量较好, 可有效去除次生代谢产物对 DNA 的干扰, 适用于广西莪术 SSR 分子标记和遗传多样性分析。

[关键词] 广西莪术; 基因组 DNA; 简单序列重复; 引物; 研磨方式

[中图分类号] R283.6; R282.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)04-0080-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015040080

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20141229.1037.009.html>

[网络出版时间] 2014-12-29 10:37

Investigation of Extracton Methods of DNA from *Curcuma kwangsiensis* for Simple Sequence Repeat Analysis YANG Ni, SU Wei-min, JIN Ya-hui, FANG Bin-hua, WANG Jian* (College of Pharmacy, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530001, China)

[Abstract] **Objective:** To obtain high quality DNA from *Curcuma kwangsiensis* for simple sequence repeat (SSR) analysis, and provide a reference for research of genetic diversity of this variety. **Method:** Taking *C. kwangsiensis* leaves as experimental material, total DNA was extracted by the classic cetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB) method and the modified CTAB method, difference between machine grinding and hand grinding was investigated, concentration and purity were determined by UV. DNA as a template for polymerase chain reaction (PCR) amplification, taking cleft SSR-01, cleft SSR-03, cleft SSR-06, cleft SSR-08, cleft SSR-14 and cleft SSR-15 as primers, polyacrylamide gel electrophoresis was adopted to detect DNA amplification effect. **Result:** When DNA extracted by the modified CTAB method, $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ of them was 1.8-2.0, proteins, polysaccharides, RNA and other substances were removed completely, DNA conformed to requirements of PCR amplification result, it could amplify out clear bands by *C. universal* primers and was suitable for SSR analysis. $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ of DNA extracted by the classic CTAB method was 1.5-1.6, it contained some impurities, which cloud not be used for PCR amplification and other molecular biology researches. **Conclusion:** DNA quality is good which was extracted by the modified CTAB method, this method can effectively remove interference of the secondary metabolites for DNA, it is suitable for SSR molecular marker and genetic diversity analysis analysis of *C. kwangsiensis*.

[Key words] *Curcuma kwangsiensis*; genomic DNA; simple sequence repeat; primer; grinding way

[收稿日期] 20140526(022)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81160500)

[第一作者] 杨妮, 在读硕士, 从事药用植物栽培和育种研究, Tel: 15296500906, E-mail: 2606343393@qq.com

[通讯作者] * 王建, 教授, 从事药用植物栽培和育种研究, Tel: 13217810893, E-mail: 642413556@qq.com

广西莪术为常用的活血化瘀药,用于治疗癥瘕痞块、瘀血闭经、食积胀痛、早期宫颈癌^[1]。广西莪术中挥发油成分的研究较多^[2-4],但有关其分子生物学方面的研究国内报道较少。简单序列重复 (simple sequence repeat, SSR) 分析的前提是必须从广西莪术中提取到高质量的 DNA,与其他分子标记技术相比,SSR 分子标记基因组 DNA 纯度要求并不高,但最好 $>20 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。植物 DNA 提取与纯化方法较多^[5-6],但不同植物种类的取材方法、部位、次生代谢产物特点不一,很难有通用性方法^[7]。广西莪术根茎含大量甾体类、生物碱类、黄酮类、倍半萜类等次生代谢产物,严重影响了 DNA 的提取质量和产量。采用经典 CTAB 法提取广西莪术基因组 DNA,结果无法扩增出清晰谱带,影响了其遗传背景分析^[8]。王晓慧等^[9]在莪术不同种和居群的 ISSR-PCR 分析研究中,采用改良 CTAB 法提取的 DNA 证实能取得满意效果。采用普通试剂盒提取法虽能提取得到纯度较好的基因组 DNA,但提取总 DNA 产量相对较少,无法满足后期 SSR 分析的多次重复试验,且植物基因组提取试剂盒成本较高,用于大规模种质资源研究需要较高实验成本。本实验选择广西莪术新鲜嫩叶为研究材料,研磨材料采用手工研磨和冷冻研磨仪打磨 2 种方式,利用经典 CTAB 法和改良的 CTAB 法分别对基因组 DNA 进行提取和纯化,通过 UV 检测 DNA 的浓度和纯度并计算产率,提取所得 DNA 作为模板进行聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 扩增,运用聚丙烯酰胺凝胶电泳检测 DNA 扩增效果,以得出一种适合广西莪术植物 DNA 提取的方法,为该品种 SSR 分子标记的开发和遗传多样性研究提供参考。

1 材料

FA1004 型电子天平 (上海精科天平仪器厂), MM400 型冷冻混合型研磨仪 [德莱驰 (上海) 贸易有限公司], BioSpec-nano 型紫外-可见分光光度计 (广州科能仪器设备有限公司), mini spin 型高速离心机 (德国艾本德公司), 9700 型 PCR 扩增仪 (北京利超兴业科技有限公司)。

广西莪术新展开的健康嫩叶,采自广西玉林、兴业、钦州、灵山、贵港、桂平、平南、青塘、横县、邕宁、金秀,经广西中医药大学王建教授鉴定均为姜科植物广西莪术 *Curcuma kwangsiensis*,按编号集中种植于广西南宁市仙葫区基地。取植株顶端和侧枝顶部的嫩叶, $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱遮光 4 ~ 7 d,提取 DNA 备用。2% 十六烷基三甲基溴化铵 (cetyl trimethyl

ammonium bromide, CTAB) 提取缓冲液 [$20.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ CTAB, 1.4 mol NaCl , 20.0 mmol 乙二胺四乙酸 (ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA), $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris·Cl, pH 8.0], 聚乙烯吡咯烷酮 (PVP, 德国 BASF 公司), 核糖核酸酶 A (RNase A, 美国 Sigma), 水为超纯水,试剂均为分析纯。

2 方法

2.1 DNA 提取

2.1.1 经典 CTAB 法^[10] 取新鲜叶片 0.5 g,液氮冷冻后分别用手工和冷冻研磨仪研磨至叶片粉碎,置于 1.5 mL 离心管中,加入 2% CTAB 600 μL ,于 $65 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴 15 min (期间取出振荡 1 次),冷却,加三氯甲烷-异戊醇 (24:1) 500 μL ,上下颠倒数次至液相深绿色,于 $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 3 min,取上清液置于 1.5 mL 离心管中,管内预装 95% 乙醇 1.0 mL,室温静置 10 min,于 $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 3 min,弃去上清液,加 70% 乙醇约 400 μL 洗涤沉淀,真空干燥,干燥后低温保存。使用时加水 300 μL 使溶解。

2.1.2 改良 CTAB 法 在经典 CATB 法基础上,改动为①CTAB 提取缓冲液在 $65 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴锅提前预热 30 min;②研磨时加入 PVP 0.1 g;③加入提取液后,水浴时间延长至 45 min,水浴时每隔 10 min 颠倒数次;④离心时间延长至 10 min,且重复 2 ~ 3 次;⑤改用 2 倍量预冷的异丙醇沉淀 DNA,于 $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 静置过夜,加入 Rnase A 3.0 μL ,终质量浓度 $20.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 保温 1 h;⑥增加抽提次数,用等体积平衡酚、平衡酚-三氯甲烷 (1:1) 及三氯甲烷-异戊醇 (24:1) 各抽提 1 次;⑦加等体积异丙醇沉淀 DNA,于 $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,沉淀用 75% 冰乙酸洗涤 1 ~ 2 次,室温干燥后加 TE 200 μL 溶解, $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

2.2 DNA 质量与浓度检测

2.2.1 UV 检测 波长 220 ~ 800 nm,样品量 1.0 μL ,以 TE 缓冲液 1.0 μL 为空白对照,取 DNA 样品 1.0 μL 进行测定,检测所提取样品 DNA 的纯度和浓度,分别计算产率 ($n = 3$)。

2.2.2 PCR 反应体系优化和 DNA 扩增效果检测 PCR 扩增引物参照文献 [11] 已经开发设计的通用姜黄属的 17 对引物,由上海生工生物技术有限公司合成。PCR 反应体系参照文献 [12] 对各反应因子设置了不同梯度组合,比较 PCR 扩增效果,每对引物至少扩增 2 次,筛选最适合的反应体系。最后确定为 DNA 模板 3.0 μL ,引物 1.0 μL , $2 \times \text{Ta}q$ PCR master mix 6.0 μL [Ta q DNA 聚合酶由 $0.05 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, $4.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MgCl_2 , $0.4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ dNTPs (dATP,

dCTP, dGTP, dTTP) 组成], 加水至 15.0 μL。PCR 反应程序参照文献 [13], 略有改动, 反应程序为 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 1 min, 35 个扩增循环, 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物在 7% 聚丙烯酰胺凝胶 (SDS-PAGE, 5 mg·L⁻¹), 200 V 稳压电泳 45 min ~ 1 h, 观察并用扫描仪扫描得到图片。

3 结果与分析

3.1 不同提取方法比较 通过 2 种不同的研磨、提取方法, 经重复试验, 均可从广西莪术中提取到一定纯度的 DNA, 见表 1。结果手工与机器研磨相比较, 机器研磨 DNA 产量较高, 可能由于手工研磨时力度不均匀造成材料飞溅形成一定损失; 从 DNA 粗提取物颜色可推断手工研磨要比机器研磨所含杂质少, 由于嫩叶材料水分含量高, 机器研磨时材料局限于离心管内, 空间小, 研磨机工作时, 材料易凝聚成团, 导致细胞破碎不完全。但经后期多次抽提, DNA 纯化物颜色均为白色, 所含杂质均能大幅减少。不同提取方

法的耗时存在差异, 机器研磨比手工研磨更省时, 改良 CTAB 法相比经典 CTAB 法提取步骤多, 耗时更长。

3.2 提取产物的纯度测定 广西莪术含多糖类、甾体类、生物碱类、黄酮类、倍半萜类次生代谢产物, 经典 CTAB 法提取总 DNA 不能很好地除掉这些物质, 导致提取 DNA 含杂质多, 无法用于 PCR 扩增等分子生物学研究^[14]。改进的 CTAB 法能有效除去细胞内次生代谢物, 阻止这些代谢物与 DNA 的结合, 使所得的 DNA 溶液呈浅黄色或无色, 见表 2。结果表明经典 CTAB 法提取所得 DNA 的 A_{260 nm}/A_{280 nm} 在 1.50 ~ 1.60; 而改良 CTAB 法均约在 1.80 ~ 2.00, 经典 CTAB 法所提 DNA 纯度较低, 不符合分子生物学操作要求, 改良 CTAB 法提取所得 DNA 纯度较高, 可用于 PCR 扩增等分子生物学操作。可能由于经典 CTAB 法提取的样品中还含有蛋白质和酚类等杂质, 而改良 CTAB 法提取的 DNA 纯度较高; 但从 DNA 的质量浓度和产率角度考虑, 经典 CTAB 法产量较高, 改良 CTAB 法相对较低。

表 1 广西莪术 DNA 不同提取方法的比较

Table 1 Comparison of different DNA extraction methods for *Curcuma kwangsiensis*

提取	方法	溶液色泽		抽提数/次	产量/mg·L ⁻¹	耗时/h
		DNA 粗提取物	DNA 纯化物			
经典 CTAB	手工	黄绿色	淡黄色	2	80.0 ~ 100.0	2
	机器	黄褐色	淡黄色	2	110.0 ~ 120.0	3
改良 CTAB	手工	白色	白色	5	40.0 ~ 50.0	5
	机器	淡黄色	白色	5	45.0 ~ 55.0	4

表 2 广西莪术基因组 DNA 的紫外分光光度法检测

Table 2 Ultraviolet spectrophotometry detection of genomic DNA from *Curcuma kwangsiensis*

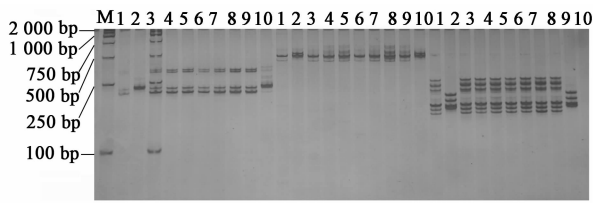
提取	方法	研磨	A _{260 nm}	A _{280 nm}	A _{260 nm} /A _{280 nm}	产量/mg·L ⁻¹	产率/μg·g ⁻¹
	机器	0.219	0.138	1.58	115.23	69.14	
改良 CTAB	手工	0.308	0.167	1.85	46.23	27.74	
	机器	0.308	0.160	1.92	50.75	30.45	

3.3 PCR 扩增和聚丙烯酰胺凝胶电泳检测 经典 CTAB 法提取的 DNA 无法扩增出清晰条带, 由于 DNA 纯度未达到分子生物学操作要求, 影响到 PCR 扩增结果; 改良 CTAB 法提取的 DNA 均可扩增出清晰条带, DNA 质量符合 PCR 要求。从所有用改良 CTAB 法提取得到的 DNA 模板中, 随机选择 10 份 DNA 提取物作为 PCR 模板, 分别用引物 clest SSR-01, clest SSR-03, clest SSR-06, clest SSR-08, clest SSR-14, clest SSR-15 进行 PCR 扩增, 电泳, 银染后扫描得图 1, 2。结果说明改良 CTAB 法从广西莪术嫩叶中提取的 DNA 虽然质量浓度较低, 但能够满足

PCR 分析的要求, 适合于广西莪术 SSR 分子标记和遗传多样性分析。

4 讨论

提取高质量 DNA 是进行广西莪术 SSR 分析的前提, 同时还要综合考虑采样方便、易于保存、操作方便、提取成本等因素, 以筛选适合的提取方法。研究表明相同质量的广西莪术嫩叶比老叶提取所得 DNA 的总量多, 幼嫩叶片组织的单位质量活细胞多, 易获得高浓度 DNA^[15], 且由于嫩叶次生代谢产物还未大量合成, 提取时可大大降低黄酮类、多糖类及酚类物质等的干扰。本文选择的广西莪术种植于



M. 2 000 bp DNA Ladder marker; 1 ~ 10. 样品(图 2 同)

图 1 广西莪术 DNA 用引物 clest SSR-01, clest SSR-03, clest SSR-06 (左→右) PCR 扩增凝胶电泳

Fig. 1 PCR amplification gel electrophoresis of DNA from *Curcuma kwangsiensis* with primers of clest SSR-01, clest SSR-03, clest SSR-06 (left to right)

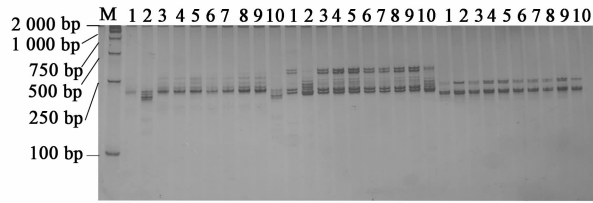


图 2 广西莪术 DNA 用引物 clest SSR-08, clest SSR-14, clest SSR-15 (左→右) PCR 扩增凝胶电泳

Fig. 2 PCR amplification gel electrophoresis of DNA from *Curcuma kwangsiensis* with primers of clest SSR-08, clest SSR-14, clest SSR-15 (left to right)

广西南宁市仙葫区基地,采集新鲜嫩叶样品立即提取存在困难,因此在苗期采集新鲜嫩叶带回实验室, -20 ℃低温冰箱保存后进行提取。

本文采用了手工和机器 2 种研磨方法,结果发现手工研磨提取所得 DNA 产量低于机器研磨,这是由于手工研磨力量不均匀导致材料溅出造成了损失。从初提物颜色可推断手工研磨所含杂质要比机器研磨少,而机器研磨需要进行多次抽提纯化才能得到较纯净的 DNA,提示少量植物材料提取 DNA 时,采用手工研磨提取所得 DNA 质量要优于机器研磨,当材料较多的情况下,机器研磨更能节省时间。

PCR 扩增和聚丙烯酰胺凝胶电泳检测发现,经典 CTAB 法所提 DNA 虽然产量高但杂质较多,无法扩增出清晰的 DNA 条带,影响了后期的 SSR 分子标记。本文对经典 CTAB 法进行了优化和改良,液氮研磨要充分,研磨好迅速加入提前预热的提取缓冲液中;为了使植物细胞充分裂解,增大了 CTAB 提取缓冲液的用量,以利于植物材料与缓冲液充分接触;水浴加热时间根据材料老嫩特点适当延长,使其破壁充分,使细胞质中次代谢产物充分析出;加入 PVP 粉可除去酚类物质干扰,有效防止褐变;为取得纯度高的 DNA,采用多次三氯甲烷-异戊醇抽提;加入 RNase A 可除去 RNA,提高 DNA 纯度;沉淀 DNA

用的是提前预冷的异丙醇,所需体积小且速度快,因此能提高沉淀效率,还能去掉多糖类物质;采用 TE 溶解 DNA 可稳定 pH。经检测,采用改良的 CTAB 法所提 DNA 的纯度和浓度较为理想,聚丙烯酰胺电泳检测 PCR 扩增情况能得到清晰多态性条带,改良 CTAB 法试验条件要求不是很高,操作过程比较简单,适用于大量提取。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:257-258.
[2] 李勇,林爱花. 莪术油的最新研究进展[J]. 中国实用医药,2012,7(5):243-244.
[3] 曾建红,戴平,黄凤香,等. 广西莪术挥发油抗肿瘤作用的谱效关系研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(13):91-94.
[4] 王丹. 广西莪术挥发油的最佳提取工艺研究[J]. 湖北中医杂志,2013,35(12):68-70.
[5] 冯图,黎云祥. 几种药用植物基因组 DNA 提取方法研究[J]. 毕节学院学报,2011,29(8):98-101,128.
[6] 杨立国,杨晶. 5 种常见植物 DNA 提取效率的比较[J]. 生物学通报,2012,47(9):44-46.
[7] 周倩,李兰芝,朱宏建,等. 一种适用于 PCR 的环境友好型植物 DNA 提取方法[J]. 湖南农业大学学报:自然科学版,2010,36(5):516-518.
[8] 肖小河,刘峰群,史成和,等. 国产姜黄属药用植物 RAPD 分析与分类鉴定[J]. 中草药,2000,31(3):209-212.
[9] 王晓慧,汤晓闯,杨恩秀,等. 莪术不同种和居群的 ISSR-PCR 分析[J]. 中国中药杂志,2008,33(18):2037-2040.
[10] 钱敏艳,赵海龙. 不同植物材料粗提取 DNA 的比较研究[J]. 中学生物学,2011,27(1):43-44.
[11] Siju S, Dhanya K, Syamkumar S, et al. Development, characterization and cross species amplification of polymorphic microsatellite markers from expressed sequence tags of turmeric (*Curcuma longa* L.) [J]. Mol Biotechnol, 2010, 44(2):140-147.
[12] Komatsu K, Sasaki Y, Tanaka K, et al. Morphological, genetic and chemical polymorphism of *Curcuma kwangsiensis* [J]. J Nat Med, 2008, 62(4):413-422.
[13] Hussain Z, Tyagi R K, Sharma R, et al. Genetic diversity in *in vitro*-conserved germplasm of *Curcuma* L. as revealed by RAPD markers [J]. Biologia Plantarum, 2008, 52(4):627-633.
[14] 戴平,黄凤香,曾建红,等. 广西莪术多糖水提醇沉工艺优化研究[J]. 食品工业,2012,33(6):52-54.
[15] 沈洁,罗安才. 提取蕨类植物 DNA 方法比较[J]. 安徽农业科学,2010,38(4):1738-1740.

[责任编辑 刘德文]