

# 山茱萸药材鲜品与干品总 DNA 提取方法比较

纪宝玉, 裴莉昕, 陈随清\*, 王丽丽  
(河南中医学院 药学院, 郑州 450046)

**[摘要]** 目的: 探讨山茱萸药材鲜品与干品总 DNA 的提取方法, 比较鲜、干品总 DNA 质量, 为以后的研究奠定基础。方法: 采用改良 CTAB 法 A、B 和经典 SDS 法, 提取山茱萸药材鲜品和干品总 DNA, 对其进行 DNA 含量测定和电泳检测。结果: 改良 CTAB 法 A 提取山茱萸药材鲜品与干品总 DNA 的  $OD_{260}/OD_{280}$  比值在 1.7~1.9 之间, 电泳条带清晰, 无拖尾, 对山茱萸药材鲜品与干品 DNA 进行综合比较, 结果显示鲜品获得的 DNA 质量高于干品。结论: 改良的 CTAB 法 A 是分离高质量完整 DNA 的方法简便、快速, 该方法得到的 DNA 适合下一步分子生物学研究。

**[关键词]** 山茱萸; 鲜品; 干品; DNA 提取方法

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)10-0070-03

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2015100070

**Total Genomic DNA Extraction from Dried and Fresh Herbs of Corni Fructus** Ji Bao-yu, PEI Li-xin, CHEN Sui-qing\*, WANG Li-li (School of Pharmacy, Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore the best total genomic DNA extraction method from the dried and fresh Corni Fructus and to compare the DNA quality as a foundation for future research. **Method:** The new modified CTAB method, SDS method were used to get DNA, the content of nucleic acid and agarose gel electrophoresis were tested. **Result:** The  $OD_{260}/OD_{280}$  ratios of DNA extracted by using the new modified CTAB method A were between 1.7-1.9 and the agarose gel electrophoresis results showed that the bands of the DNA were both tight and distinct. Compared with the DNA samples from dried herbs, results showed that DNA quality from fresh herbs was better. **Conclusion:** New modified CTAB is a simple and fast method for extract the DNA in high quantity and quality from herbs, the obtained DNA by this method is suitable for further studies of molecular biology.

**[Key words]** Corni Fructus; fresh herbs; dried herbs; DNA extraction

山茱萸含有生理活性较强的山茱萸苷、酒石酸、没食子酸、苹果酸、树脂、鞣质和多种维生素等有效成分<sup>[1-2]</sup>, 具有较好的调节免疫系统功能、降血糖、抗炎、抗菌等药理作用。同时, 又是中成药“六味地黄丸”的主要原料, 临床疗效显著<sup>[3]</sup>。

分子生物学技术在中药资源开发、药材鉴别、有效成分的鉴定和提取以及优良育种等方面显示了广阔的应用前景。利用基因组中标准的短 DNA 片段进行物种鉴定的 DNA 条形码技术, 已成为生物分

类、鉴定研究的热点和新方向<sup>[4-6]</sup>。获取高质量的 DNA 是进行 DNA 条形码研究的必要前提和关键环节。已有的中药总 DNA 多从叶片中提取, 由于市售中药材多为干品, 加工和贮藏过程中会造成 DNA 的降解; 且中药材种类繁多, 不同药用部位细胞中通常含有大量的多糖、脂质、色素、酚类和其他类次生代谢产物, 这些都会影响 DNA 的提取<sup>[7-10]</sup>。本研究从山茱萸鲜、干药材中获得高质量 DNA, 为山茱萸分子生物学深入研究提供技术依据。

**[收稿日期]** 20141107(009)

**[基金项目]** 国家科技支撑计划项目(2006BAI09B05-8); 河南省教育厅科学技术研究重点项目(12A360003); 河南中医学院苗圃工程(MP2012-05)

**[第一作者]** 纪宝玉, 硕士, 讲师, 从事中药规范化种植及质量标准研究, Tel:13607669844, E-mail:584810680@qq.com

**[通讯作者]** \* 陈随清, 博士, 教授, 从事中药品种整理及质量标准研究, Tel:0371-65676686, E-mail:suiqingchen@sohu.com

## 1 材料

山茱萸果实于 2009 年 10 月采自河南省西峡县栗坪村,一部分果实趁鲜放入冰箱中冷冻,备用;另一部分果实先沸水煮 5 min,去核,自然晾干。以上样品经河南中医学院陈随清教授鉴定为山茱萸科植物山茱萸 *Cornus officinalis* 的新鲜及干燥的成熟果实。

液态氮,聚乙烯吡咯烷酮(PVP),提取缓冲液[0.25 mol·L<sup>-1</sup> NaCl, 0.25 mol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl, 50 mmol 乙二胺四乙酸(EDTA)], 2×十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)缓冲液(2% CTAB, 100 mmol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl pH 8.0, 20 mmol·L<sup>-1</sup> EDTA pH 8.0, 1.4 mol·L<sup>-1</sup> NaCl), 20% 十二烷基硫酸钠(SDS)核裂解液,异丙醇(-20℃预冻),无水乙醇,5 mol·L<sup>-1</sup> NaCl 溶液,TE 缓冲液(10 mmol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl pH 8, 1 mmol·L<sup>-1</sup> EDTA)。

DYY-III-12B 型三恒多用电泳仪(北京六一仪器厂),TGL-16G 型低温冷冻离心机(上海安亭科学仪器厂),UV-2201 型紫外-可见分光光度计(日本岛津),AmpGene 凝胶分析系统(北京鼎永科技有限公司)。

## 2 方法和结果

**2.1 CTAB 法** 在已有研究<sup>[11]</sup>基础上,进行调整,简称改良 CTAB 法。取山茱萸新鲜果肉 3 g,用滤纸将果肉中的水分尽可能的吸取。加入 10% 的 PVP 粉末,与液氮共研,细粉转移至 5 mL 预冷的离心管中,加入冷藏提取缓冲液 3 mL,冰浴 10 min, 4℃, 10 000 r·min<sup>-1</sup>,离心 10 min,弃去上清液。加入预热的 CTAB 缓冲液 3 mL,β-巯基乙醇 0.8 μL,充分混匀后,65℃保温 2 h,期间晃动 3~4 次。4℃, 10 000 r·min<sup>-1</sup>,离心 10 min,取上清液。将上清液分装至 2 个 5 mL 离心管中,加入等体积的三氯甲烷-异戊醇(24:1)除杂,混匀,4℃, 12 000 r·min<sup>-1</sup>,离心 10 min,重复除杂 2~3 次,直至分层的上层液体澄清且分界面处无杂质出现。取上清液,加入等体积预冻的异丙醇,冰浴 30 min,观察沉淀,4℃, 12 000 r·min<sup>-1</sup>,离心 10 min,取沉淀,用 75% 的乙醇 1 mL 洗涤,4℃, 10 000 r·min<sup>-1</sup>,离心 10 min,重复洗涤 2~3 次,取沉淀。放入干燥器中干燥。用 50 μL 双蒸水溶解 DNA 沉淀,-20℃冰箱保存。改良 CTAB 法 A(加入冷藏提取缓冲液 3 mL)和改良 CTAB 法 B(不加入冷藏提取缓冲液)。

**2.2 SDS 法** 根据参考文献<sup>[12]</sup>调整:取山茱萸新鲜果肉 3 g,用滤纸将果肉中的水分尽可能的吸取,加入 10% 的 PVP 粉末,与液氮共研,细粉转移至

5 mL 离心管中,加入 65℃预热的提取缓冲液 2 mL, 10% SDS 0.5 mL,混匀,65℃保温 2 h,期间间隔晃动 3~4 次。向离心管中加入 5 mol·L<sup>-1</sup> KAc 1 mL,混匀,置冰上 30 min。4℃, 10 000 r·min<sup>-1</sup>,离心 10 min,上清液转移到另一离心管中。加入三氯甲烷-异戊醇(24:1) 3 mL 除杂 2~3 次,直至分层的上层液体澄清且分界面处无杂质出现。取上清液,加入等体积预冻的异丙醇,冰浴 30 min,观察沉淀。4℃, 12 000 r·min<sup>-1</sup>,离心 10 min,取沉淀,用 75% 乙醇 1 mL 洗涤,4℃, 10 000 r·min<sup>-1</sup>,离心 10 min,重复洗涤 2~3 次,取沉淀。放入干燥器中干燥。用 50 μL 双蒸水溶解 DNA 沉淀,-20℃冰箱保存。

**2.3 山茱萸干果肉基因组总 DNA 提取** 取山茱萸干果肉 2 g,加双蒸水低温浸泡 4 h,洗去杂质。其余提取方法同 2.1, 2.2 项。

**2.4 DNA 质量浓度测定** 取 DNA 原液 20 μL,加入无菌水 980 μL 稀释 50 倍后,用紫外-可见分光光度计检测 DNA 在 260 nm 和 280 nm 的吸光度(A),计算 DNA 样品质量浓度(mg·L<sup>-1</sup>)  $C = A_{260} \times 50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \times$  样品稀释倍数来进行测算。

**2.5 DNA 质量的测定** 取 DNA 原液 20 μL,稀释 50 倍,以  $A_{260}/A_{280}$  进行比较,见表 1。

表 1 不同方法提取总 DNA 质量(以  $A_{260}/A_{280}$  值表示)及质量浓度  
Table 1 Different methods of extracting total genomic DNA quality and content

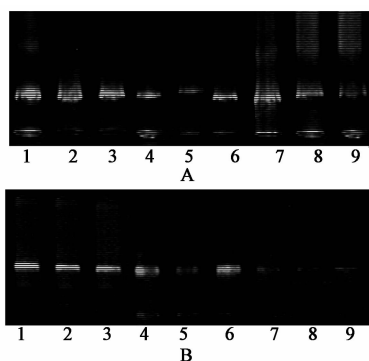
方法	总 DNA 质量		总 DNA 质量浓度/mg·L <sup>-1</sup>	
	鲜品	干品	鲜品	干品
改良 CTAB 法 A	1.84	1.76	498	305
改良 CTAB 法 B	1.59	1.61	358	286
SDS 法	1.42	1.43	224	231

结果显示,改良 CTAB 法提取的 DNA 质量总体高于 SDS 法,其中改良 CTAB 法 A 提取 DNA 质量最优;而在鲜品与干品样品中,鲜品样品提取的 DNA 质量要高于干品样品。山茱萸药材中含有大量的多酚及多糖类物质,给 DNA 提取造成很大的影响,如果提取前不用冷藏提取缓冲液,冰浴 10 min,则提取出的 DNA 质量很低。

不同方法提取的 DNA 含量也有明显的差别。改良 CTAB 法提取的 DNA 质量浓度鲜品要高于干品,总体高于 SDS 法,SDS 法提取的 DNA 含量鲜品与干品无明显差别,但总体质量浓度较低。

**2.6 凝胶电泳图谱检测** 取 DNA 提取物在 1.0% 的琼脂糖凝胶上点样 10  $\mu$ L, 用 1  $\times$  TAE 电泳缓冲液电泳, 待溴酚蓝迁移至琼脂糖一多半处时, 取出胶, 溴化乙啶染色, 紫外检测拍照。

改良 CTAB 法 A 电泳图显示条带清晰, 无拖尾现象, 但干品条带要暗于鲜品, 说明干品要低于鲜品提取的 DNA 含量。用改良 CTAB 法 B 对干、鲜品样品提取的 DNA 质量有所下降, 有明显的拖尾, 这也同紫外分光光度计测定的结果相符。SDS 法的电泳图显示提取的 DNA 质量要低于改良 CTAB 法, 结果见图 1。



A. 鲜品; B. 干品; 1~3 号. CTAB 法 A; 4~6 号. CTAB 法 B; 7~9 号. SDS 法

图 1 山茱萸药材总 DNA 琼脂糖凝胶电泳  
Fig.1 Total Genomic DNA Extraction from Herbs of Corni Fructus

### 3 讨论

山茱萸鲜、干药材中均含多酚、多糖等次生代谢物。其中多酚易于氧化成褐色, 导致 DNA 降解; 多糖与 DNA 结合形成黏稠的胶状物, 使 DNA 难以溶解<sup>[13-15]</sup>。本实验在 DNA 溶出前, 先加入冷提缓冲液, 使除去部分色素和多糖, 在加入  $\beta$ -巯基乙醇可防止多元酚类物质氧化。

CTAB 是一种去污剂, 可溶解细胞膜, 能与核酸形成复合物, 在高浓度盐溶液中 ( $> 0.7 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NaCl}$ ) 可以溶解并且稳定存在。当降低溶液盐浓度到一定程度 ( $< 0.3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NaCl}$ ) 时, 复合物从溶液中沉淀, 通过离心就可将 CTAB 与核酸的复合物同蛋白质、多糖类物质分开。利用高浓度的 SDS 法, 在较高温度 ( $55 \sim 65 \text{ }^\circ\text{C}$ ) 条件下裂解细胞, 使染色体离析, 蛋白质变性, 释放出核酸, 然后采用提高盐浓度及降低温度的方法使蛋白质及多糖杂质沉淀, 离心除去沉淀后, 上清液中的 DNA 反复用酚-三氯甲烷抽提, 得到 DNA。

本文采用改良 CTAB 法和 SDS 法, 从山茱萸药

材鲜品与干品中提取高质量基因组总 DNA 的方法高效、简便, 实验结果表明, 改良 CTAB 法 A 提取较高质量基因组 DNA, 所提取基因组 DNA 可用于 PCR 扩展等相关分子生物学后续实验, 为开展深入研究奠定基础。

#### [参考文献]

- [1] 陈随清, 魏雅磊, 王静. 多指标成分分析确定山茱萸最佳采收期[J]. 中国现代中药, 2011, 13(1): 29-43.
- [2] 陈随清, 杨晋, 王利丽. 山茱萸果实成熟前后熊果酸和马钱素的含量变化[J]. 中国现代应用药学杂志, 2005, 22(1): 38-40.
- [3] 王利丽, 张涛, 陈随清, 等. 土壤中无机元素与山茱萸药材质量的相关性分析[J]. 中药材, 2011, 34(8): 1167-1172.
- [4] 陈士林, 宋经元, 姚辉, 等. 药用植物 DNA 条形码鉴定策略及关键技术分析[J]. 中国天然药物, 2009, 7(5): 322-327.
- [5] 陈士林, 姚辉, 宋经元, 等. 基于 DNA barcoding(条形码)技术的中药材鉴定[J]. 世界科学技术——中医药现代化, 2007, 9(3): 7-12.
- [6] 陈士林, 庞晓慧, 姚辉, 等. 中药 DNA 条形码鉴定体系及研究方向[J]. 世界科学技术——中医药现代化, 2011, 13(6): 747-754.
- [7] 徐纲, 于超, 赵华. 牡丹皮基因组 DNA 提取的影响因素研究[J]. 中国药房, 2008, 19(27): 2084.
- [8] 徐虹, 章军, 郑敏, 等. 中药肉桂基因组 DNA 的提取[J]. 中药材, 2004, 27(5): 326.
- [9] 邹枚伶, 夏志强, 吉家敏, 等. 白木香 SRAP-PCR 反应体系的建立[J]. 基因组学与应用生物学, 2009, 28(1): 137-140.
- [10] 余晓丽, 范喜梅, 刘实. 木香基因组 DNA 的提取方法[J]. 东北林业大学学报, 2007, 35(8): 10-11.
- [11] 陈随清, 王利丽, 段亮亮. 山茱萸叶脱氧核糖核酸(DNA)提取方法的研究[J]. 河南中医学院学报, 2005, 20(117): 23-24.
- [12] 周延清. DNA 分子标记技术在植物研究中的应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 15.
- [13] 张宁, 王凤山. DNA 提取方法进展[J]. 中国海洋药物, 2004(2): 40-46.
- [14] 陈大霞, 李隆云, 钱敏, 等. 黄连药材 DNA 提取及 RAPD 反应体系的优化[J]. 中草药, 2006, 37(8): 1233-1237.
- [15] 郝岗平, 边高鹏, 张媛英. 泰山白花丹参干叶片高质量 DNA 的提取[J]. 中草药, 2006, 37(6): 855-857.

[责任编辑 顾雪竹]