

# 改良 CTAB 法提取新疆一枝蒿干叶基因组 DNA

王桂娥, 晁群芳\*, 梁建芳, 杨杨, 殷亚兰  
(新疆大学 生命科学与技术学院, 乌鲁木齐 830046)

**[摘要]** **目的:**从自然干燥的新疆一枝蒿中提取高质量的基因组 DNA,为该药材的分子生物学研究提供参考。**方法:**采用2种改良十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)法与常规CTAB法提取新疆一枝蒿中基因组DNA,通过加适量聚乙烯吡咯烷酮(PVP)研磨样本,在核裂解前用细胞核裂解液(STE)洗涤多酚类和多糖类物质,利用95%乙醇室温沉淀DNA等措施。改良CTAB法2与1相比不用液氮研磨样本。通过琼脂糖凝胶电泳、紫外分光光度法和相关序列扩增多态性(SRAP)检测提取DNA的质量。**结果:**2种改良CTAB法所得DNA质量均优于常规CTAB法,DNA完整性较好, $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ 在1.8~2.0,多糖类杂质去除较为干净。SRAP检验条带清晰、多态性良好。**结论:**2种改良CTAB法均适用于高质量新疆一枝蒿干叶基因组DNA的提取,得到的DNA纯度和完整性均较理想,可为后续分子生物学研究提供良好模版。

**[关键词]** 新疆一枝蒿;干叶;DNA提取;改良CTAB法;琼脂糖凝胶电泳

**[中图分类号]** R282.5;R282.6;R931.5;R931.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)12-0019-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2015120019

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20150428.1003.001.html>

**[网络出版时间]** 2015-04-28 10:03

## Extraction of Genomic DNA from Dry Leaves of *Artemisia rupestris* by Modified CTAB Methods

WANG Gui-e, CHAO Qun-fang\*, LIANG Jian-fang, YANG Yang, YIN Ya-lan (College of Life Science and Technology, Xinjiang University, Urumqi 830046, China)

**[Abstract]** **Objective:** To extract high quality genomic DNA from dry leaves of *Artemisia rupestris* dried naturally and lie a foundation for further molecular experiments. **Method:** Three different methods, conventional hexadecyl trimethyl ammonium bromide (CTAB) method and modified CTAB methods were applied to isolate genomic DNA from dry leaves of *A. rupestris*. Two modified CTAB methods were different from conventional CTAB method in three ways, nucleus lysate (STE) was used for removal of impurities, polyvinyl pyrrolidone (PVP) was added when grinding samples and 95% ethanol for precipitation of DNA in room temperature. These two modified CTAB methods were different from whether liquid nitrogen was added while grinding samples. Purity and integrality of DNA were detected by UV spectrophotometry, agarose gel electrophoresis and sequence-related amplified polymorphism (SRAP). **Result:** Higher purity DNA was obtained by improved CTAB methods by compared with conventional CTAB method, value of  $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$  was between 1.8-2.0, polysaccharides was removed relatively clear. SRAP produced clear polymorphic patterns. **Conclusion:** These two modified CTAB methods are suitable for DNA extraction from dry leaves of *A. rupestris*, purity and integrality of isolated DNA can be used in further molecular biology research.

**[Key words]** *Artemisia rupestris*; dry leaves; DNA extraction; modified CTAB method; agarose gel electrophoresis

新疆一枝蒿是维吾尔族和哈萨克族的常用中药,具有抗肿瘤、抗氧化、解毒等药理作用<sup>[1]</sup>。中药

**[收稿日期]** 20140825(001)

**[基金项目]** 新疆维吾尔自治区科技支疆项目(200991119)

**[第一作者]** 王桂娥,在读硕士,从事环境微生物学研究,Tel:13639905972,E-mail:1051778385@qq.com

**[通讯作者]** \*晁群芳,硕士,副教授,从事环境微生物学研究,Tel:13209956756,E-mail:xjqhf@sina.com

材鉴定方法除了传统的形态学鉴定、色谱分析等,相关序列扩增多态性(sequence-related amplified polymorphism, SRAP),随机扩增多态性DNA标记(random amplified polymorphic DNA, RAPD)等分子标记技术在中药鉴定<sup>[2-3]</sup>及其分子指纹图谱构建等方面<sup>[4-5]</sup>亦得到了广泛应用。中药材基因组DNA多选用新鲜幼嫩叶片<sup>[6]</sup>或者硅胶干燥的幼嫩叶片<sup>[7]</sup>加液氮研磨提取,利用液氮研磨样本,加大了实验成本和操作难度。而且市场上流通的中药材大多为干品,要用分子生物学手段对其进行真伪鉴定、道地性判别等研究,高质量基因组DNA的获取是实验成功的前提。中药材干品常含有大量的酚类及其他次生代谢物质,严重影响了高质量基因组DNA的提取。由于不同植物生物化学成分和结构不同<sup>[8]</sup>,在具体操作中存在较大差异,需根据不同实验材料探索适用的DNA提取方法。目前关于新疆一枝蒿干材料基因组DNA的提取尚未见报道。本实验在进行新疆一枝蒿种质评价的SRAP分析时,选择自然干燥的、不同储存年限的新疆一枝蒿干叶为材料,考察适合该材料基因组DNA的提取方法,为新疆一枝蒿的分子生物学研究提供参考。

## 1 材料

UV-1102型紫外分光光度计,WD-9403C紫外分析仪,DYY-2C型电泳槽和电泳仪均购自北京六一仪器厂;Heal Force Neofuge13R型台式高速冷冻离心机(力康生物医疗科技控股有限公司),EC3 System型凝胶成像系统(美国UVP公司),C1000型聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)仪(美国Bio-Rad公司)。3份新疆一枝蒿分别于2013年7月,2011年7月,2010年7月采自乌鲁木齐县托里乡、新疆富蕴、天山支脉-天格尔山北路,经新疆维吾尔自治区人民医院药剂科于鲁海主任药师鉴定为菊科植物新疆一枝蒿*Artemisia rupestris*的全草,室温自然干燥备用;取3份样品的干叶作为供试品材料,编号依次为1,2,4,另取2011年7月样品的干茎为供试品材料,编号3。十六烷基三甲基溴化铵(hexadecyl trimethyl ammonium bromide, CTAB)、聚乙烯吡咯烷酮40(polyvinyl pyrrolidone 40, PVP40)等试剂均为国产分析纯,细胞核裂解液(STE)[700 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl, 100 mmol·L<sup>-1</sup>三(羟甲基)氨基甲烷盐酸盐(Tris-HCl, pH 8.0), 50 mmol·L<sup>-1</sup>乙二胺四乙酸(EDTA, pH 8.0), 2% PVP, 2% β-巯基乙醇], 2×CTAB核裂解液(100 mmol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl, 50 mmol·L<sup>-1</sup> EDTA, 1.4 mol·L<sup>-1</sup> NaCl, 2% CTAB,

2% PVP, 2.5% β-巯基乙醇), TE缓冲液[10 mmol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl(pH 8.0), 1.0 mmol·L<sup>-1</sup> EDTA]; RNA酶A(RNaseA), 三磷酸脱氧核糖核苷酸(dNTPs)和DNA聚合酶等均购自宝生物工程有限公司,引物由上海生物工程有限公司合成。

## 2 方法与结果

### 2.1 基因组DNA的提取

2.1.1 传统CTAB法 参考文献[9]。

2.1.2 改良CTAB法1<sup>[7]</sup> 称取样本0.05 g,加入适量PVP40,在液氮中迅速研磨成粉,转入2 mL离心管中,迅速加入STE核分离液1.5 mL,用灭菌牙签混匀,低温离心(6 000 r·min<sup>-1</sup>, 10 min,下同),弃去上清液。重复1~2次。加入65℃预热的2×CTAB提取缓冲溶液1.5 mL,混匀,65℃水浴40 min,每15 min上下颠倒混匀1次,冷却至室温,离心,取上清液,加入等体积Tris平衡苯酚-三氯甲烷-异戊醇(25:24:1)抽提,轻轻上下颠倒混匀,低温静置10 min,于4℃离心(12 000 r·min<sup>-1</sup>, 10 min,下同),小心吸取上清液,转入新的1.5 mL离心管中,加入等体积三氯甲烷-异戊醇(24:1)抽提1次,离心,取上清液。加入2倍体积95%乙醇和1/2倍体积5 mol·L<sup>-1</sup>氯化钠,立即轻轻上下颠倒混匀,可见白色絮状沉淀析出,立即常温离心,弃去上清液。沉淀用70%乙醇清洗2次,在超净台中室温风干,用适量TE缓冲液溶解,加入10 g·L<sup>-1</sup> RNaseA 6 μL, 37℃水浴30 min,加入等体积三氯甲烷-异戊醇(24:1),混匀,于4℃离心,小心吸取上清液,加入1/10倍量3 mol·L<sup>-1</sup>乙酸钠(pH 5.2)混匀,加2倍量无水乙醇(室温),立即轻轻上下颠倒混匀,离心,弃上清液。用70%乙醇清洗沉淀2~3次,室温风干后加入TE缓冲液100 μL使溶解, -20℃保存备用。

2.1.3 改良CTAB法2 材料研磨时不加液氮,其他步骤同改良CTAB法1。

### 2.2 DNA样品的检测

2.2.1 紫外光谱分析 将以上3种方法所得DNA样品稀释100倍,采用紫外分光光度计测定260 nm和280 nm处的吸光度A,依据A<sub>260 nm</sub>/A<sub>280 nm</sub>判断DNA样品的纯度,结果见表1。从外观看,常规CTAB法所得干叶DNA沉淀为黄色至棕褐色,TE较难溶解,产率由于酚类等杂质污染无法精确计算。改良CTAB法2所提DNA稍有黄色,进一步纯化后呈无色透明。改良CTAB法1所得DNA沉淀为白色, DNA产率最高。表明改良的2种CTAB法得到

的 DNA 纯度和产率均高于常规 CTAB 法。2 种改良 CTAB 法所提茎(材料 3) DNA 的  $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$  1.8 ~ 1.9, 但产率较低。

表 1 不同提取方法和材料所得新疆一枝蒿基因组 DNA 的质量及产率

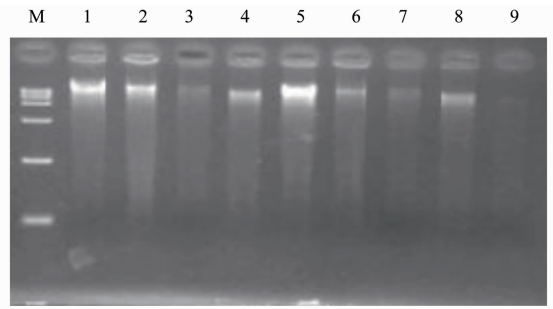
Table 1 Quality and yield of genomic DNA from *Artemisia rupestris* by different extraction methods and materials

CTAB 提取方法	材料	$A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$	DNA 产率 / $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	颜色
常规	1	1.57	-	棕褐色
	2	1.53	-	棕褐色
	3	1.67	-	黄褐色
	4	1.46	-	棕褐色
改良 1	1	1.81	147	白色
	2	1.84	140	白色
	3	1.82	60	白色
	4	1.87	137	白色
改良 2	1	1.84	120	白色
	2	1.88	100	白色
	3	1.83	40	白色
	4	1.92	80	白色

注：“-”表示无法计算。

**2.2.2 电泳分析** 将改良与常规 CTAB 法提取的干叶与茎的基因组 DNA 于 1% 琼脂糖凝胶中进行电泳,在凝胶成像系统下观察、拍照。结果显示常规 CTAB 法 DNA 提取率低,所得 DNA 样品条带十分微弱;2 种改良 CTAB 法条带整齐,无明显拖尾现象,点样孔周围无明显荧光,说明所提 DNA 样品纯度和完整性较好。2 种改良方法提取的茎的基因组 DNA 泳道带型较窄,亮度较低,可能与茎提取的 DNA 量少,浓度较低有关。2 种改良 CTAB 法提取的 DNA 质量均优于常规 CTAB 法,但 2 种改良 CTAB 法所提 DNA 亮度和纯度无明显差异,说明 2 种改良 CTAB 法均适用于新疆一枝蒿茎与干叶的基因组 DNA 的提取。采用改良 CTAB 法 1,2 提取不同储存年限的新疆一枝蒿基因组 DNA,于 1% 琼脂糖凝胶中进行电泳,在凝胶成像系统下观察、拍照,见图 1。结果显示 2 种方法所得 DNA 电泳条带无明显差异,均为整齐明亮的条带,DNA 均较为纯净。改良 CTAB 法 1 所提 DNA 带型更宽,可能与 DNA 浓度较高有关。材料 1(泳道 1,5)的储存年限最短,电泳条带亮度最高,所提 DNA 含量与纯度可满足 PCR 扩增的要求。说明 2 种改良 CTAB 法均适用于不同

产地、不同储存年限的新疆一枝蒿高质量基因组 DNA 的提取。



M. Marker(DL 15000);泳道 1,2,3,4. 改良 CTAB 法 1 提取材料 1,2,3,4;泳道 5,6,7,8. 改良 CTAB 法 2 提取材料 1,2,3,4;泳道 9. 常规 CTAB 法

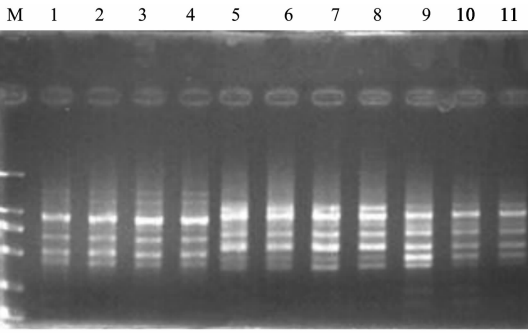
图 1 不同方法提取新疆一枝蒿不同样本的基因组 DNA 琼脂糖凝胶电泳

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of genomic DNA from *Artemisia rupestris* samples by different extraction methods

**2.2.3 改良 CTAB 法提取的 DNA 的 SRAP 检验** 以新疆一枝蒿的基因组 DNA 为模板进行 SRAP 扩增。用 Me1 作为上游引物,Em5 为下游引物,SRAP-PCR 扩增程序为 94 °C 预变性 5 min,94 °C 变性 1 min,35 °C 退火 1 min,72 °C 延伸 1.5 min,5 个循环;94 °C 变性 1 min,57.6 °C 退火 1 min,72 °C 延伸 1 min,35 个循环;72 °C 延伸 8 min,扩增产物 4 °C 保存。扩增产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳进行检测,见图 2。结果显示 2 种 CTAB 法所得不同储存年限新疆一枝蒿干叶与茎(泳道 9,10,11)的基因组 DNA 的 SRAP 扩增图谱都十分清晰,多态性较好。改良 CTAB 法 2 与 1 的区别在于是否用液氮研磨样本。陈燕萍等<sup>[10]</sup>采用加液氮研磨的方法从新鲜因果黄麻叶片中提取了高质量的植物基因组 DNA,结果表明加入液氮研磨可防止新鲜材料中 DNA 酶对 DNA 的降解。而对于干燥材料,加入液氮只是使材料变脆易磨。本文采用不加液氮研磨样本的改良 CTAB 法 2 既简化实验操作又降低实验成本,且适用于储存的干燥材料,更具实践应用价值。

### 3 讨论

CTAB 法能够有效除去材料中蛋白质、多糖类和酚类等物质,是最常用的中药材基因组 DNA 提取方法之一<sup>[6]</sup>。新疆一枝蒿富含多糖类<sup>[11]</sup>、多酚类等次生代谢产物,常规的 DNA 提取方法只针对含次生代谢产物较少的新鲜幼嫩材料,采用此类方法提取新疆一枝蒿干叶片 DNA 时,这些次生物质在 DNA 提取过程中常与核酸形成复合物,形成黏稠的胶状



M. Marker(DL2000);泳道 1,2,5,6,9,10. 采用改良 CTAB 法 1 提取材料 2,4,3;泳道 3,4,7,8,11. 采用改良 CTAB 法 1 提取材料 2,4,3

图 2 2 种改良 CTAB 法提取新疆一枝蒿基因组 DNA 的 SRAP  
Fig. 2 SRAP of genomic DNA from *Artemisia rupestris* by two modified CTAB methods

物质,并产生不同程度的褐化,对酶切及 PCR 扩增等操作产生不良影响,不利于分子生物学研究。

在新疆一枝蒿基因组 DNA 提取时,本文通过加大提取缓冲液中  $\beta$ -巯基乙醇的质量分数,以减少酚类物质的氧化;第 1 次沉淀 DNA 时,采用 95% 乙醇室温沉淀,加入 1/2 倍量  $5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  氯化钠形成高盐条件,且不经过低温静置,而是混匀后立即室温离心<sup>[12]</sup>,可有效减少多糖类成分的沉淀;研磨时加入适量 PVP 结合多酚类物质<sup>[13]</sup>;加入提取缓冲液前,多次用 STE 核分离缓冲液洗涤多酚类和多糖类物质。经过以上改良可有效减少多糖类物质的沉淀量及多酚类物质的污染,是实验成功的关键。同时在研磨过程中,宜尽量加快研磨速度,以减少 DNA 的降解。

[参考文献]

[1] 方美珠,晁群芳,兰雁,等. 新疆一枝蒿的研究进展[J]. 中草药,2009,40(增刊):73-75.

[2] 梅露露,姬可平,牛宪立,等. 分子遗传标记技术在中药材鉴定中的应用[J]. 生物信息学,2011,9(4):335-338.

[3] 李文强,黄士良,牛玉璐,等. DNA 分子标记技术在中草药鉴别中的应用[J]. 河北师范大学学报,2005,29(6):617-622.

[4] Liu L W, Zhao L P, Gong Y Q, et al. DNA fingerprinting and genetic diversity analysis of late-bolting radish cultivars with RAPD, ISSR and SRAP markers[J]. Sci Hort, 2008, 116(3):240-247.

[5] Wu Y G, Guo Q S, He J C, et al. Genetic diversity analysis among and within populations of *Pogostemon cablin* from China with ISSR and SRAP markers[J]. Biochem Syst Ecol, 2010, 38(1):63-72.

[6] 朱田田,晋玲,杜骏,等. 中麻黄基因组 DNA 不同提取方法的比较[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(11):125-128.

[7] 顾蔚,魏南玉,代立娟,等. 华中五味子干燥材料 DNA 提取方法的研究[J]. 生物技术,2007,17(6):25-27.

[8] 巩艳红,刘军. 毛豹皮樟叶片总 DNA 的提取[J]. 四川林业科技,2003,24(2):47-50.

[9] Clark M S. 植物分子生物学实验手册[M]. 北京:高等教育出版社,1998:4-7.

[10] 陈燕萍,陈美霞,徐建堂,等. 圆果黄麻成熟叶片总 DNA 提取及 SRAP 扩增体系的建立与优化[J]. 福建农林大学学报,2011,40(5):461-466.

[11] 徐鑫,晁群芳,方美珠,等. 新疆一枝蒿多糖的体外抗氧化性研究[J]. 食品科技,2011,36(12):202-206.

[12] 谢志亮,何业华. 早食李基因组 DNA 提取方法的改进[J]. 中国南方果树,2013,42(2):18-21.

[13] 卓伟,余茂德,鲁成. PVP 在桑叶总 DNA 提取中的应用[J]. 西南农业大学学报,2001,23(1):61-62.

[责任编辑 刘德文]