

## 开口箭 DNA 提取方法比较

周天华<sup>1\*</sup>, 陈征<sup>1</sup>, 李康<sup>1</sup>, 肖瑛<sup>1</sup>, 吴阳阳<sup>1</sup>, 王新红<sup>2</sup>, 陈雨杰<sup>2</sup>

(1. 陕西理工学院 生物科学与工程学院, 陕西 汉中 723001; 2. 陕西省汉中中学, 陕西 汉中 723000)

**[摘要]** 目的:筛选从开口箭不同类型材料中提取 DNA 的最佳方法。方法:采用十二烷基磺酸钠(SDS)法,改良 SDS 法,十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)法和改良 CTAB 法 4 种方法分别对开口箭的新鲜茎、硅胶干燥茎、烘干茎、新鲜叶片和硅胶干燥叶片这 5 类材料进行 DNA 提取。从 DNA 的完整性、纯度、得率等方面对 DNA 进行比较,确定开口箭不同材料 DNA 提取的最适方法。结果:采用改良 CTAB 法提取的硅胶干燥茎和叶片的  $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$  均在 1.8~1.9,纯度最高,且完整性较高,提取效果较其他方法更佳;其余材料则均有不同程度的污染,新鲜叶片的  $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$  普遍很低。结论:从硅胶干燥叶片和茎的开口箭材料中更容易提取出纯度高、完整度好的 DNA。改良 CTAB 法是适合开口箭 DNA 提取的有效方法,通过改良 CTAB 法从硅胶干燥叶片和茎的开口箭中更容易提取纯度高、完整度好的基因组 DNA。

**[关键词]** 开口箭; DNA 提取; 纯度; 新鲜块茎; 完整性; 改良 CTAB 法

**[中图分类号]** R282.5;R931.5;R284.1;R284.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)19-0010-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2015190010

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20150824.1004.016.html>

**[网络出版时间]** 2015-08-24 10:04

### A Comparative Study on DNA Extraction Methods for *Tupistra chinensis* Tubers and Leaves

ZHOU Tian-hua<sup>1\*</sup>, CHEN Zheng<sup>1</sup>, LI Kang<sup>1</sup>, XIAO Ying<sup>1</sup>, WU Yang-yang<sup>1</sup>, WANG Xin-hong<sup>2</sup>, CHEN Yu-jie<sup>2</sup> (1. School of Biological Science and Engineering, Shaanxi University of Technology, Hanzhong 723001, China; 2. Hanzhong Middle School in Shaanxi Province, Hanzhong 723000, China)

**[Abstract]** **Objective:** To choose the best DNA extraction method for different kind of *Tupistra chinensis* materials. **Method:** Sodium dodecyl sulfate (SDS), improved SDS, hexadecyl trimethyl ammonium bromide (CTAB) and improved CTAB methods were used to extract DNA from five different materials of *T. chinensis* tubers and leaves, including fresh tubers, silica gel dried tubers, baked tubers, fresh leaves and silica gel dried leaves. Integrity, purity and yield of extracted DNA was compared in order to determine which method was the best one for different *T. chinensis* materials. **Result:** Extracting DNA from silica gel dried tubers and silica gel dried leaves with improved CTAB method performed the highest purity and good integrity, not only its value of  $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$  was between 1.8-1.9, but also with a better integrity. These remaining materials had different levels of pollution,  $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$  of fresh leaves was generally low. **Conclusion:** Improved CTAB is the most effective method for DNA extraction from silica gel dried leaves and tubers materials. Genomic DNA extracted from silica gel dried leaves and tubers using improved CTAB method performs a better integrity and better purity.

**[Key words]** *Tupistra chinensis*; DNA extraction; purity; fresh tubers; integrity; improved CTAB method

开口箭别称牛尾七、岩七、竹根七,主要分布于 2 000 m 林下荫湿处、溪边或路旁<sup>[1]</sup>,有效成分包括我国湖北、湖南、江西等地,生长在海拔 1 000 ~ 甾体皂苷、甾体皂苷元等,是秦巴山区重要的植物药

**[收稿日期]** 20150526(012)

**[基金项目]** 陕西省教育厅重点实验室科研计划项目(14JS017);陕西理工学院 2014 年大学生创新创业训练计划项目(UIRP14057);陕西省 2014 年春算计划项目

**[通讯作者]** \*周天华,博士,讲师,从事从事植物分子生物学研究,Tel:13488097060,E-mail:zhou3687@126.com

材资源<sup>[2]</sup>。开口箭的根状茎可入药,味甘、微苦,性寒,中医理论认为其具有滋阴泻火、活血调经、散瘀止痛之作用,可用于治疗风湿关节痛、腰腿疼痛、跌打损伤、月经不调、骨蒸劳热等<sup>[3]</sup>。开口箭在彝族药、瑶族药、壮族药等民族药中均有记载<sup>[4]</sup>。

近年来,分子生物学技术在药用植物资源研究、药材药理学研究及药材质量鉴别方面得到了广泛应用,为药材引种栽培、品种改良、品种鉴定及药材质量监控提供了良好的手段,对中药材的理论研究及生产实践具有重要意义<sup>[5]</sup>。目前提取植物基因组 DNA 的方法很多,最常用的有十二烷基磺酸钠(SDS)法与十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)法。这 2 种 DNA 提取方法的原理基本一致,均涉及到细胞裂解破碎,DNA 释放,杂质的去除及 DNA 纯化等步骤<sup>[6]</sup>。CTAB 是一种去污剂,可破碎细胞壁和细胞膜,并能与核酸形成复合物,在高盐溶液中是可溶的,当溶液的盐浓度降低到一定程度时,DNA 从溶液中沉淀,通过离心,可获得含 DNA 的上清液,再用三氯甲烷和异戊醇混合液使蛋白质变性、分层,同时除去脂类,可达到提取和纯化 DNA 的目的<sup>[7]</sup>;SDS 可与蛋白质、多糖等形成复合物,经离心后与 DNA 分开。但植物细胞质中含有的糖类、酚类物质及蛋白质等都会影响 DNA 的提取效果;植物的种类、部位不同所含有的糖类、酚类及蛋白质也有差异<sup>[8]</sup>,但常规的方法并不能将所有植物材料的 DNA 完整而又高效地提取出来。此外,实验材料的不同保存方法对材料中 DNA 的影响很大。例如高温会使材料中 DNA 结构被破坏,而新鲜材料若不及时处理其 DNA 会降解<sup>[9]</sup>。实验过程中常见的开口箭材料有块茎、叶片,保存方法有硅胶干燥等。因此,实际操作中常需要对 DNA 提取方法进行改良和改进,探究不同材料 DNA 提取的最佳方案。

本实验通过 CTAB 法,SDS 法以及在这 2 种方法基础上改良而产生的另外 2 种方法来进行探究,同时根据开口箭不同干燥程度存在的活性差异和不同部位有效成分含量的差异,将材料分为新鲜、阴干和风干 3 种不同的干燥类型和叶片、块茎 2 种不同的部位,寻找适合开口箭 DNA 提取的方法,以构建完整的开口箭基因组 DNA 提取的改良技术体系。

## 1 材料

MM400 型生物组织研磨机(德国 Restch 公司),Biophotomeper plus 6132 型核酸测定仪和 Centrifuge 5415R 型离心机(德国 Eppendor 公司),DYY-6C 型电泳仪(北京六一),UP H-II-40 型超纯

水机(优普),ML204 型电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司),KG-SX-500 型灭菌锅(Chamber 公司),Gel Doc™ XR + 型凝胶成像系统(BIO-RAD 公司)。十六烷基三甲基溴化铵(CTAB,天津科密欧化学试剂有限公司),十二烷基磺酸钠(SDS,天津市光复精细化工研究所),聚乙烯吡咯烷酮(PVP-40T,上海蓝季科技发展有限公司),抗坏血酸(天津市福晨化学试剂厂),乙二胺四乙酸(EDTA,天津市百世化工有限公司),DNA Marker(D2000,北京天根生化科技有限公司)。

开口箭采自陕西省汉中市留坝县火烧店的自然种群,经陕西理工学院杨培君教授鉴定为百合科植物开口箭 *Tupistra chinensis*,在野外采集生长旺盛的开口箭植株,移栽至实验室种植,对材料进行处理。取幼嫩叶片和根茎置干净自封袋中,加入硅胶干燥,常温保存,得硅胶干燥叶片和硅胶干燥茎。取少量茎在烘箱中烘干,使其失水后常温保存,得烘干茎。新鲜叶片和新鲜茎材料在实验前不做任何处理,在提取 DNA 时只需将其从移栽植物上取下并处理干净即可。

## 2 方法与结果

**2.1 DNA 的提取方法** 开口箭材料共有 5 类,分别为新鲜块茎、硅胶干燥块茎、烘干块茎、硅胶干燥叶片和新鲜叶片。每类材料各取 24 份样品,分别称取每份样品的质量,各类样品材料进行组织粉碎和研磨。

**2.1.1 CTAB 法** 取 5 类开口箭样品各 6 份,采用朱威龙等<sup>[10]</sup>的 CTAB 法提取各样品基因组 DNA。

**2.1.2 改良的 CTAB 法** 取 5 类开口箭样品各 6 份,采用吴凯旋等<sup>[8]</sup>的改良 CTAB 法提取各样品基因组 DNA。

**2.1.3 SDS 法** 取 5 类开口箭样品各 6 份,采用王关林等<sup>[11]</sup>的 SDS 法提取各样品基因组 DNA。

**2.1.4 改良 SDS 法** 由于传统 SDS 法步骤繁多、操作时间长且得率较低的问题,拟对传统 SDS 法做相应改良。改良的过程主要包括在加入 SDS 进行裂解之前先用预处理液<sup>[8]</sup>对已经研磨破碎的材料进行预处理,以除去细胞质中的一些杂质;去掉传统 SDS 法中再次溶解、加 RNA 酶和乙酸钠等步骤,可提高得率。具体步骤为 ①取开口箭材料置于 2 mL 离心管中;②加入提取缓冲液[100 mmol·L<sup>-1</sup>三羟甲基氨基甲烷(Tris)-HCl(pH 8.0),50 mmol·L<sup>-1</sup>EDTA(pH 8.0),500 mmol·L<sup>-1</sup>NaCl,10 mmol·L<sup>-1</sup>β-巯基乙醇]1 mL,混匀,静置 10 min,于 8 000 r·min<sup>-1</sup>离心 2~3 min,去上清;③重复步骤②,提取

缓冲液加入 900  $\mu\text{L}$ ;④向离心管中加入 10% SDS 提取液[2% SDS,100  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  Tris-HCl(pH 8.0),50  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  EDTA(pH 8.0),500  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  NaCl,10  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\beta$ -巯基乙醇]100  $\mu\text{L}$ ,充分混匀,于 65  $^{\circ}\text{C}$  水浴中保温 30 min(间隔摇晃 2~3 次);⑤取出离心管凉至室温,加入 5  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  乙酸钾 160  $\mu\text{L}$ ,充分混匀,冰浴中放置 30 min;⑥上清液转入新离心管中,加入等体积的三氯甲烷-异戊醇(24:1),轻轻颠倒离心管数次,放置片刻;⑦于 4  $^{\circ}\text{C}$  下 8 000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 10 min;⑧上清液转入另一离心管中,加入 2 倍量于 -20  $^{\circ}\text{C}$  预冷的无水乙醇,混匀,放置 30 min,观察 DNA 沉淀生成;⑨于 4  $^{\circ}\text{C}$  下 8 000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 10 min,倾去上清液,用 80% 乙醇洗涤沉淀;⑩将离心管倒置于吸水纸上,控干上清液。

采用上述 4 种方法对 5 类实验材料提取出的 DNA 经低温风干,各加入 0.1  $\times$  TE[含有 10  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  Tris-HCl(pH 8.0),1  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  EDTA(pH 8.0)]200  $\mu\text{L}$  溶解 DNA,放入冰箱备用。

## 2.2 基因组 DNA 的检测

### 2.2.1 DNA 纯度及得率

采用紫外分光光度法检测,运用核酸测定仪检测 DNA 浓度和纯度。取 0.1  $\times$  TE 50  $\mu\text{L}$  作为空白对照,依次加入 DNA 样品 100  $\mu\text{L}$ ,置于比色皿中,记录各样品的浓度,计算

DNA 得率。同时记录各样本在 260,280 nm 处的吸光度  $A_{260\text{ nm}}$  与  $A_{280\text{ nm}}$ 。当  $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$  在 1.7~1.9,表示 DNA 较为纯净; $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}} < 1.7$  则有蛋白质污染; $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}} > 1.9$  则有核糖核酸(RNA)污染。计算 DNA 的含量和纯度,见表 1。结果发现采用改良 CTAB 法提取的硅胶干燥茎和叶片的  $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$  均在 1.8~1.9,纯度最高;其余材料则均有不同程度的污染。新鲜叶片的  $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$  普遍很低,原因可能是新鲜材料活性较高,各种代谢产物和后含物含量也高,在提取过程中不易去除干净。

通过对各种方法提取 DNA 的得率进行比较,发现 CTAB 法提取硅胶干燥叶片所得 DNA 得率较高,从叶片提取 DNA 的得率普遍比从茎中提取 DNA 的高,且改良 CTAB 法和改良 SDS 法的得率普遍比未改良的要低。改良 SDS 法是在文献[11]中 SDS 法的基础上,省去一些步骤以减少 DNA 的损耗。在提取前用预处理液处理,可减少杂质等其他物质的干扰,原理是参考改良 CTAB 法加了预处理液,预处理液与提取液成分相似,只是没有加裂解剂,因此是在细胞核中 DNA 释放出来之前预先去除植物组织及细胞质基质中的蛋白质、多糖、酮类等杂质,这样可提高 DNA 纯度,但也会带走一些植物样品组织,影响到提取 DNA 的得率。

表 1 不同方法对开口箭 DNA 提取效率的影响

Table 1 Purity and yield of DNA extracted with four different methods from five kinds of *Tupistra chinensis* materials

提取方法	$A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$					得率/ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$				
	新鲜茎	硅胶干燥茎	烘干茎	硅胶干燥叶片	新鲜叶片	新鲜茎	硅胶干燥茎	烘干茎	硅胶干燥叶片	新鲜叶片
CTAB	1.45	1.42	1.23	1.45	1.21	353.63	1 181.63	623.71	3 491.56	1 518.55
改良 CTAB	1.64	1.86	1.30	1.84	1.32	95.74	690.19	329.29	1 041.63	488.94
SDS	1.66	1.41	1.41	1.37	1.11	120.15	249.41	249.41	793.55	1 806.66
改良 SDS	1.97	2.22	1.54	1.64	1.28	82.10	276.54	710.97	1 055.07	533.60

### 2.2.2 DNA 完整性检测

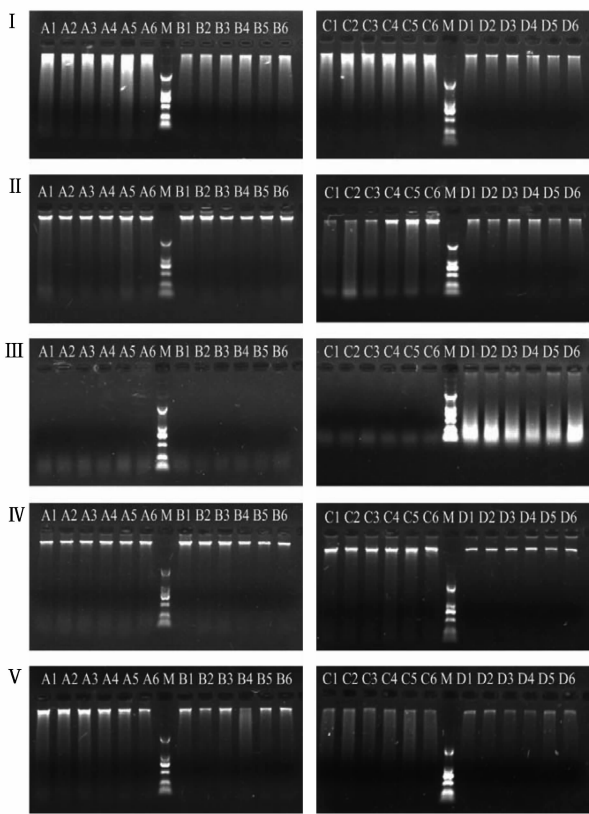
采用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。电泳条件为电压 90 V,电泳时间 50 min,DNA marker 为 D2000,分析 DNA 的完整性,见图 1。结果显示新鲜茎、硅胶干燥茎、硅胶干燥叶片和新鲜叶片均有明显大片段的存在,完整性都很高,只有烘干茎的完整性不高,说明烘干材料中 DNA 降解较多。

### 2.3 数据分析

运用改良 CTAB 法提取开口箭硅胶干燥茎和硅胶干燥叶片的 DNA,其  $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$  均在 1.8~1.9,数据集中,且琼脂糖凝胶图像中也有明亮的大片段的条带,完整性较高,说明改良 CTAB 法适合开口箭硅胶干燥茎和叶片 DNA 的提

取。对于开口箭新鲜块茎而言,改良 SDS 法虽适合其 DNA 的提取,但  $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$  略  $> 1.9$ 。4 种方法提取开口箭新鲜叶片的 DNA 时,各方法都能提出大片段 DNA,但 DNA 均含有较多杂质,纯度不高。原因主要是由于提取的 DNA 样品中含有较高的蛋白质,或含有多酚氧化的褐色物等。烘干茎 DNA 降解严重,其  $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$  均  $< 1.7$ ,且完整性较差,不适合提取。

对于 5 种不同类别材料,从 DNA 纯度的角度看,用改良 CTAB 法提取的硅胶干燥茎和干燥叶片的  $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$  均在 1.8~1.9,纯度较其他方法要高,适合其 DNA 的提取;从 DNA 完整性角度来看,



A. CTAB 法; B. 改良 CTAB 法; C. SDS 法; D. 改良 SDS 法; 1~6. 样品编号; I. 新鲜茎; II. 硅胶干燥茎; III. 烘干茎; IV. 硅胶干燥叶片; V. 新鲜叶片

图 1 开口箭 DNA 的琼脂糖凝胶电泳效果  
Fig. 1 Electrophoretic effect on agarose gel for DNA from *Tupistra chinensis*

硅胶干燥茎和干燥叶片的完整性最高,烘干茎的完整性最低;从 DNA 得率的角度来看,CTAB 法提取的干燥叶片和新鲜叶片的得率都很高;另由于茎不易完全研碎,因此其得率误差较大。

### 3 讨论

本文结果表明相对于其他方式保存的开口箭材料,用硅胶干燥的茎和叶中提取出的 DNA 完整性好、纯度高。从开口箭新鲜材料提取的 DNA 纯度比硅胶干燥材料的 DNA 纯度低,原因可能是新鲜材料活性较高,各种代谢产物和后含物含量也高,在提取过程中不易去除干净;而烘干茎由于烘干过程时间长、温度高,造成 DNA 大量降解,因此得率低,完整性差。因此,在分子生物学操作中应避免选用此类材料提取 DNA。由于植物组织如叶片中含有较高的多酚、蛋白质、脂类、糖类等不利于 DNA 提取的干扰物质,利用常规的 CTAB 方法等难以获得高质量 DNA<sup>[12]</sup>,而改良 CTAB 法是在 CTAB 法的基础上加了预处理,有利于杂质的清除,可得到更纯的 DNA。

本文中改良 CTAB 法是 4 种方法中最适合用于开口箭 DNA 提取的方法。

CTAB 法和改良 CTAB 法相比,CTAB 法所提取的 DNA 得率普遍较高,但其 DNA 纯度并不如改良 CTAB 法;SDS 法和改良 SDS 法相比较,改良 SDS 法提取的 DNA 的纯度较高,说明对传统方法的改良是有一定效果的。综合分析,利用硅胶干燥的材料或通过改良 CTAB 法均可得到降解少、杂质少、高质量的 DNA,并且可以将其用于分子生物学实验研究。随着分子生物学技术的不断发展,将植物的总基因组 DNA 提取出来进行 DNA 杂交或基因组克隆的实验需求越来越多。本文通过对开口箭基因组 DNA 的提取方法进行探究,建立了适合于开口箭 DNA 提取的方法体系,为该药材的进一步研究工作提供了实验依据。

### [参考文献]

- [1] Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences. Flora of China. volume 24 [M]. Beijing: Science Press, 2000:166.
- [2] 李玥. 秦巴山区三种开口箭植物的遗传多样性分析[D]. 汉中: 陕西理工学院, 2014.
- [3] 乔明, 梁忠, 龚业莉, 等. 百合科开口箭属植物化学成分、活性作用研究进展[J]. 湖北中医学院学报, 2009, 11(3): 59-62.
- [4] 贾敏如, 李星炜. 中国民族药志要[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2005: 622.
- [5] 李玥, 周天华, 赵桦. 开口箭 ISSR-PCR 实验反应体系条件的优化[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(13): 149-153.
- [6] 单志, 吴宏亮, 李成磊, 等. 改良 SDS 法提取多种植物基因组 DNA 研究[J]. 广东农业科学, 2011(8): 113-115.
- [7] 李登科, 黄丛林, 田建保, 等. 高质量枣树基因组 DNA 提取方法的研究[J]. 分子植物育种, 2005, 3(4): 579-583.
- [8] 吴凯旋, 屈亚娟, 周天华, 等. 独尾草 DNA 提取方法改良及 ISSR 反应体系的建立[J]. 陕西农业科学, 2012, 56(6): 111-115.
- [9] 张涛, 李新生, 路宏朝, 等. 中药材附子基因组 DNA 提取方法研究[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(18): 7575-7576, 7585.
- [10] 朱威龙, 闫硕, 石冀哲, 等. 棉花不同组织 DNA 的不同提取方法比较[J]. 安徽农业科学, 2015, 43(2): 16-18, 22.
- [11] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程[M]. 2 版. 北京: 科学出版社, 2002: 742-743.
- [12] 李荣华, 夏岩石, 刘顺枝, 等. 改进的 CTAB 提取植物 DNA 方法[J]. 实验室研究与探索, 2009, 28(9): 14-16.

[责任编辑 刘德文]