

中麻黄基因组 DNA 不同提取方法的比较

朱田田^{1,2}, 晋玲^{1,2*}, 杜致^{1,2}, 陈红刚^{1,2}, 张延红^{1,2}, 王惠珍^{1,2}, 王艳^{1,2}

(1. 甘肃中医学院, 兰州 730000; 2. 甘肃省高校中(藏)药化学质量研究省级重点实验室, 兰州 730000)

[摘要] **目的:**比较不同 DNA 提取方法,选择最适于中麻黄基因组的方法。**方法:**采用改良 CTAB, SDS 法、试剂盒法提取中麻黄基因组 DNA;用琼脂糖凝胶电泳法和紫外分光光度法检测所得总 DNA 的得率和纯度,并进行 ISSR-PCR 扩增检测。**结果:**3 种方法均可从新鲜中麻黄中提取出产量较高的基因组 DNA,但其中改良 CTAB 法提取的总 DNA 纯度高,质量好,扩增产物的电泳条带也较明显;SDS 法和试剂盒法提取的总 DNA 质量差,不适用于下游分子生物学实验。**结论:**改良十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)法为中麻黄基因组 DNA 提取的最佳方法,该方法提取的基因组 DNA 适用于中麻黄基因组 PCR 扩增和其他分子生物学研究。

[关键词] 中麻黄; DNA 提取; 十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)法

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)11-0125-04

[DOI] CNKI:11-3495/R.20120327.2700.019 **[网络出版时间]** 2012-03-27 17:06

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20120327.1706.019.html>

Comparison of Different Methods for Extraction of Genomic DNA from *Ephedra intermedia*

ZHU Tian-tian^{1,2}, JIN Ling^{1,2*}, DU Tao^{1,2}, CHEN Hong-gang^{1,2},
ZHANG Yan-hong^{1,2}, WANG Hui-zhen^{1,2}, WANG Yan^{1,2}

(1. Gansu College of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China; 2. Key Laboratory of Chemistry and Quality for Traditional Chinese Medicines of the College of Gansu Province, Lanzhou 730000, China)

[Abstract] **Objective:** By comparing different extraction methods of genomic DNA, the best extraction method of *Ephedra intermedia* genomic DNA was selected. **Method:** Improved cetyltrimethyl ammonium bromide

[收稿日期] 20111202(014)

[基金项目] 科技基础性工作专项重点项目子课题(SB2007FY020);甘肃教育厅科研项目(1106B-07);甘肃中医学院中青年科研基金项目(ZQ2011-12)

[第一作者] 朱田田, 硕士, 讲师, 从事中药资源开发与利用研究, Tel:13088731903, E-mail: ztt0935@163.com

[通讯作者] * 晋玲, 博士, 副教授, 从事药用植物资源可持续利用研究, Tel:0931-8765335, E-mail: jinl@gszy.edu.cn

- [13] 兰瑞芳, 冯珊. 闽产罗勒油化学成分的研究[J]. 海峡药学, 2001, 13(1): 51.
- [14] 卢汝梅, 李耀华. 桂产罗勒挥发油化学成分的分析[J]. 广西植物, 2006, 26(4): 456.
- [15] 徐洪霞, 潘见, 杨毅, 等. 疏毛罗勒挥发油化学成分的研究[J]. 香料香精化妆品, 2004(3): 5.
- [16] 何道航, 庞义, 李广宏, 等. 粤产紫罗勒精油的化学成分研究[J]. 广西植物, 2005, 25(1): 90.
- [17] 宋述芹, 谷茂, 陈飞鹏, 等. 固相微萃取气质联用分析罗勒花和叶的挥发性成分[J]. 质谱学报, 2008, 29(2): 110.
- [18] 张文成, 宋宗庆, 李春保. 疏毛罗勒挥发油超临界流体萃取的研究[J]. 农产品加工, 2006(10): 81.
- [19] 张帅, 徐云辉, 张建斌, 等. 不同来源罗勒挥发油成分的 GC-MS 分析及体外抗菌活性[J]. 中国医药工业杂志, 2011, 42(6): 419.
- [20] 胡西旦·格拉吉丁. 气相色谱-质谱法分析罗勒中挥发油的化学成分[J]. 光谱实验室, 2008, 25(2): 127.
- [21] 汪涛, 崔书亚, 胡晓黎, 等. 罗勒挥发油成分研究[J]. 中国中药杂志, 2003, 28(8): 740.

[责任编辑 邹晓翠]

(CTAB) method, SDS method, kit method were used for the extraction of genomic DNA from *E. intermedia*. The yield and purity of total genomic DNA were examined by agarose gel electrophoresis, UV-spectrophotometry and ISSR-PCR. **Result:** Three extraction methods could extracted the high amount genomic DNA from fresh tissue of *E. intermedia*. Improved CTAB method could yield highest purity total DNA, and the electrophoretic bands of amplified products were obvious. On the other hand, SDS method and kit method indicated low purity of the yielded DNA and could not be used in downstream application directly. **Conclusion:** The improved CTAB method is the best of the three compared methods for extracting the genomic DNA from *E. intermedia*, which is suitable for PCR reaction and other molecular research in *E. intermedia* genomic DNA.

[**Key words**] *Ephedra intermedia*; DNA extraction; CTAB method

麻黄是中医临床常用中药^[1-2],具有发汗解表,宣肺平喘等功效。被《中国药典》收录的麻黄属植物有 3 个种,其中的中麻黄在甘肃省分布最广,品质优良。因近年来国内外对麻黄碱需求量的猛增,导致人们对甘肃省中麻黄进行掠夺式采挖,使其天然资源遭受严重破坏,因此甘肃省中麻黄资源可持续性利用和保护工作势在必行^[3-6]。目前,分子生物技术已在药用植物资源利用与保护方面得到广泛应用^[7-9],而进行任何分子生物学研究的首要环节都是提取高质量的基因组 DNA。本试验以中麻黄新鲜草质茎为材料,比较 3 种不同方法提取效果,以期得到中麻黄基因组 DNA 的最佳提取方法,为下游分子生物学研究提供参考。

1 材料

1.1 植物 中麻黄 *Ephedra intermedia* Schrenk et C. A. Mey 采自甘肃省兰州市仁寿山,选取无病虫害的幼嫩地上茎,剪成小段置于液氮罐中带回实验室,于 -20 °C 冰箱中保存备用。全部样品由甘肃中医药大学中药资源教研室晋玲博士鉴定。

1.2 仪器设备 TGL16M 型台式高速冷冻离心机, HH-S₂₄ 型数显恒温水浴锅, DYY-7 型电泳仪,电泳槽(北京六一仪器厂), PCR 扩增仪 (Biometra), UV-1102 型紫外分光光度计,凝胶成像系统 (Bio-Rad) 等。

1.3 试剂 CTAB, EDTA, SDS, Tris, PVP, β -巯基乙醇购于西安科昊生物工程有限责任公司。RNaseA、琼脂糖 (Agarose), EB, PCR 相关试剂为北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司产品;柱式植物基因组 DNAout(北京天恩泽基因科技有限公司);其余试剂均为国产分析纯。

2 方法

2.1 基因组 DNA 的提取

2.1.1 改良的十六烷基三甲基溴化铵法(改良 CTAB 法) 根据试验材料特点并参照文献[13-

15],在常规 CTAB 法^[10-12]基础上加以改进:称取 0.1 g 左右植物组织(2 个重复)置于洁净干燥研钵中,加入适量 PVP,与液氮共研成细粉后迅速转入 2 mL 离心管中;加入 800 μ L 65 °C 预热的 CTAB 提取缓冲液(2% CTAB, 20 mmol·L⁻¹ EDTA (pH 8.0), 100 mmol·L⁻¹ Tris-HCl (pH 8.0), 1.4 mol·L⁻¹ NaCl, 2% β -巯基乙醇),充分混匀,放入 65 °C 水浴保温 50 min,期间每隔 15 min 颠倒混匀 1 次;冷却至室温后加入等体积氯仿/异戊醇的(24:1),轻轻颠倒混匀后静置 5 min, 12 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,用切尖枪头仔细吸取上层水相于新离心管中,重复此步骤 2~3 次,直到分界层无白色沉淀为止;吸取上层水相于新的离心管中,加入 4 μ L RNaseA (10 g·L⁻¹), 37 °C 温浴 1 h;加入 2/3 体积的异丙醇,1/10 体积的 5 mol·L⁻¹ 乙酸钠轻轻混匀,于 -20 °C 放置 30 min 沉淀 DNA;12 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,小心倒掉上清液,保留 DNA 沉淀于管底,加入 70% 乙醇 700 μ L 洗涤沉淀 2~3 次;室温干燥后加入 130 μ L TE 缓冲液溶解 DNA 沉淀并保存于 4 °C 冰箱中备用(-20 °C 长期保存)。

2.1.2 十二烷基苯磺酸钠法(SDS 法) 参照参考文献[11]方法:称取 0.1 g 左右植物组织(2 个重复)置于洁净干燥研钵中并加入适量 PVP,与液氮共研成细粉后迅速转入 2 mL 离心管中;加入 800 μ L 65 °C 预热的 SDS 提取缓冲液[10% SDS, 100 mmol·L⁻¹ EDTA (pH 8.0), 50 mmol·L⁻¹ Tris-HCl (pH 8.0), 100 mmol·L⁻¹ NaCl, 2% β -巯基乙醇]和 4 μ L RNaseA (10 g·L⁻¹),充分混匀后放于 65 °C 水浴保温 20 min,其间颠倒混匀样品 2~3 次;加入 250 μ L 5 mol·L⁻¹ KAc,混匀后置冰上 30 min;4 °C, 12 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,用切尖枪头小心转移上清液于新的离心管中,加入等体积氯仿/异戊醇(24:1),轻轻混匀,12 000 r·min⁻¹ 离心 5 min,重复此步骤 1~2 次;取上清液,加入 0.7 倍体积预冷异

丙醇,混匀, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 沉淀 30 min, $12\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min,在管底可以见到白色的 DNA 沉淀块,倒弃上清液;加 1 mL 70% 乙醇洗涤 DNA 沉淀 2~3 次,室温干燥 DNA 后加入 130 μL TE 缓冲液溶解 DNA,保存于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中备用 ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 长期保存)。

2.1.3 柱式植物基因组 DNAout 试剂盒法 首先将样本称取量调整至与前 2 种方法相同,在与液氮研磨时加入适量 PVP,其他步骤按试剂盒说明书进行。

2.2 电泳检测 DNA 的完整性 取 5 μL DNA 样品与 1 μL 上样缓冲液混匀后点样于 0.8% 琼脂糖凝胶孔,电泳缓冲液为 $1\times\text{TBE}$ 溶液,电压 80 V 下电泳 1 h 左右,EB(溴化乙锭)染色,用凝胶成像系统照相,保存。

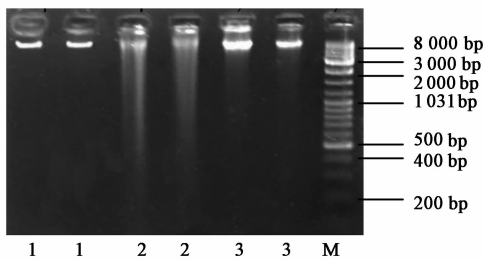
2.3 紫外分光光度法检测 DNA 的纯度和浓度 取 20 μL DNA 样品用 TE 缓冲液稀释 20 倍,混合均匀后加入石英比色皿中,测定 260,280 nm 波长处的紫外吸光度(A)。根据 A_{260}/A_{280} 的比值判断总 DNA 纯度,并计算浓度。

$$\text{DNA 质量浓度} = A_{260} \times \text{稀释倍数} \times 50。$$

2.4 PCR 扩增检测 以提取的基因组 DNA 为模板,选取 ISSR 引物 810 进行 PCR 扩增。反应体系经优化后确定为 20 μL ,内含 $10\times\text{PCR Buffer}(\text{Mg}^{2+}\text{ Plus})$ 2.0 μL , *TaqDNA* 聚合酶 0.75 U,引物 0.4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, dNTP 0.25 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 以及 DNA 模板 20 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,加灭菌双蒸水至 20 μL 。扩增程序为 $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 4 min, $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 45 s, $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 45 s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 2 min,40 个循环, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存结束反应。扩增产物在 1.2% 的琼脂糖凝胶上电泳,在凝胶成像系统下观察、拍照。

3 结果与分析

3.1 基因组 DNA 电泳检测结果 3 种方法提取的基因组 DNA 琼脂糖凝胶电泳检测结果如图 1 所示。



1. 改良 CTAB 法;2. SDS 法;3. 试剂盒法;M. DNA 相对分子质量标准

图 1 3 种不同提取方法所得基因组 DNA 琼脂糖电泳

结果表明,改良 CTAB 法、SDS 法和试剂盒法提取的中麻黄样品基因组 DNA 电泳谱带均较明亮,说

明 3 种方法都能提取出较多的基因组 DNA;改良 CTAB 法的电泳条带整齐、明亮且无拖尾,点样孔无多糖、蛋白质等杂质污染,说明此方法提取的基因组 DNA 质量较好;而 SDS 法和试剂盒法的电泳条带整齐度差,有拖尾,点样孔发亮,且 SDS 法尤其严重,说明这两种方法提取的基因 DNA 杂质较多,有降解现象。

3.2 基因组 DNA 紫外分光光度计检测结果 由表 1 可知,3 种方法得到的基因组 DNA 的 A_{260}/A_{280} 和 A_{260}/A_{230} 值均未达到 1.8 和 2.0,说明 3 种方法提取的 DNA 在不同程度上都含有一些杂质,如蛋白质、多酚及其他小分子物质等。但改良 CTAB 法较其他 2 种方法,其 A_{260}/A_{280} 值在 1.75 以上, A_{260}/A_{230} 值更接近 2.0,说明此方法提取的基因组 DNA 相对较纯净,而试剂盒法得到的 DNA 纯度次之,SDS 法较差。3 种方法提取的基因组 DNA 浓度在 $106\sim 362\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$,按每次 PCR 的 DNA 用量为 20 ng 计算,从数量上可以满足大量 PCR 扩增的需要。

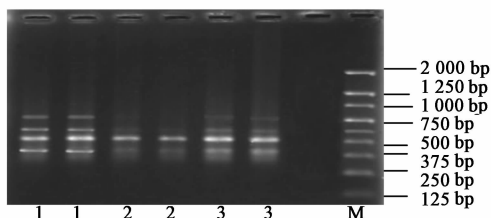
3.3 ISSR-PCR 扩增检测结果 检测结果表明(图 2),改良 CTAB 法提取的基因组 DNA 作模板时,PCR 条带清晰明亮,条带数多;SDS 法提取的基因组 DNA 作模板时,PCR 条带数少;试剂盒法提取的基因组 DNA 作模板时,PCR 条带较 SDS 法清晰度略高,但有拖尾现象,会对 PCR 结果造成干扰。由此可见,改良 CTAB 法提取的基因组 DNA 纯度较高,适宜用作 PCR 反应,这与紫外分光光度计和琼脂糖凝胶电泳检测结果一致。

表 1 不同方法提取的基因组 DNA 的纯度及质量浓度

No.	A_{260}	A_{280}	A_{230}	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}	质量浓度 $/\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$
1.1	0.172	0.097	0.089	1.77	1.93	172
1.2	0.156	0.087	0.087	1.79	1.79	156
2.1	0.362	0.261	0.225	1.37	1.61	362
2.2	0.282	0.225	0.194	1.25	1.45	282
3.1	0.155	0.102	0.129	1.50	1.20	155
3.2	0.106	0.069	0.091	1.54	1.16	106

4 讨论

目前,提取植物基因组 DNA 的方法很多,如 CTAB,SDS 法、高盐低 pH 法、酚/氯仿法、碱裂解法等^[11,18]。CTAB 法是最常用的植物基因组 DNA 提取方法之一,能够有效除去材料中蛋白、多糖和酚类等物质,改良后效果更佳,但由于步骤多、试剂组成复杂、易污染等缺点,在使用上受到了一定的限制;



1. 改良 CTAB 法; 2. SDS 法; 3. 试剂盒法;
M. DNA 相对分子质量标准

图 2 3 种方法提取基因组 DNA 的 ISSR-PCR 扩增图谱

SDS 法操作简单、温和,同时能提取到较高相对分子质量 DNA,也被广泛应用,但对于次生代谢物、多糖等含量较高的植物,提取出的基因组 DNA 质量往往不高;试剂盒法提取基因组 DNA 因其操作简单、快速,得到的总 DNA 纯度高,近年来已被广泛采用,但成本较 CTAB 法和 SDS 法高很多,不适用于经费有限, DNA 提取量大的群体遗传学研究。

由于生长环境较特殊,使得中麻黄体内富含酚类等次生代谢物,氧化后易与 DNA 结合而引起 DNA 的降解,在裂解液中加入一定量的 β -巯基乙醇和 PVP 可以有效的防止酚氧化和去除酚类杂质^[16-17]。中麻黄多生长在干旱少雨的荒滩沙漠,叶片已退化,而能够提取基因组 DNA 的地上草质茎木质化严重,导致与 DNA 结合的蛋白质不易解离,降低了提取效果。本实验使用改良 CTAB 法提取出质量较高的中麻黄植物基因组 DNA。而另一种提取植物基因组 DNA 常用的方法 SDS 法却不能从中麻黄中提取高质量的 DNA,可能与其不能很好地去除酚类等杂质有关。由于药用植物种类繁多,所含次生代谢物各不相同,植物基因组 DNA 提取试剂盒并不适用于所有植物,从而给试验过程中试剂质量浓度、组分和步骤的调整增加了难度,反而得不到纯度较高的基因组 DNA,但试剂盒法对于快速有效地获得植物基因组 DNA 还是适用的。

植物基因组 DNA 提取质量不仅与提取方法有关,还与植物组织新鲜度,采样方法与保存时间以及操作过程相关。因此,在植物基因组 DNA 提取过程中要综合考虑上述因素,从而得到高质量的基因组 DNA。

[参考文献]

- [1] 张帆,葛亮,哈木拉提·吾甫尔,等. 麻黄附子甘草汤的不同配伍方式对其毒性成分的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(6):83.
- [2] 王维赋,谭晓梅,梁少瑜,等. 麻黄附子细辛汤和小青龙汤对过敏性鼻炎豚鼠作用的研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(7):176.
- [3] 中国药典. 一部[S]. 2005:173.
- [4] 中科院《中国植物志》编委会. 中国植物志[M]. 北京:科学出版社,1978:468.
- [5] 查丽杭,苏志国,张国政,等. 麻黄资源的利用与研究开发进展[J]. 植物学通报,2002,19(4):396.
- [6] 魏建和,李先恩. 甘肃甘草麻黄资源状况调查[J]. 中药研究与信息,2000,2(11):11.
- [7] 李贝宁,南博,刘春生,等. 道地产区甘草遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(12):90.
- [8] 肖哲丽,柳金凤. 分子标记技术在药用植物研究中的应用[J]. 中国农学通报,2011,27(5):300.
- [9] 周涛,吴钰,金艳蕾,等. 头花蓼重复片段多态性分析-多聚酶链式反应体系建立与正交优化[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(6):50.
- [10] 顾红雅,瞿礼佳. 植物基因与分子操作[M]. 北京:北京大学出版社,2005.
- [11] 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.
- [12] 刘杰,高连明. 红豆杉属植物 3 种不同总 DNA 提取方法的分析比较[J]. 广西植物,2011,31(2):244.
- [13] 吉日木图,李军乔. 不同方法提取青藏高原蕨麻总 DNA 的比较研究[J]. 北方园艺,2011(6):152.
- [14] 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.
- [15] 潘和平,晋玲,高天鹏,等. 沙拐枣 DNA 提取方法改进及 PCR 扩增检测[J]. 草业科学,2006,23(10):28.
- [16] 刘敏,严萍,詹若挺,等. 黄芪干燥根 DNA 提取方法的研究[J]. 药物生物技术,2010,17(5):393.
- [17] 童巧珍,盛孝邦,周日宝,等. 药用百合 DNA 提取和 RAPD 条件的优化[J]. 湖南中医药大学学报,2008,28(2):33.
- [18] 刘塔斯,林丽关,龚力民,等. 分子标记中植物 DNA 提取方法的研究进展[J]. 中南药学,2005,3(6):370.

[责任编辑 邹晓翠]