

# 中药材附子基因组 DNA 提取方法研究

张涛 李新生 路宏朝 冯自立 (陕西理工学院生物科学与工程学院, 陕西汉中 723001)

**摘要** [目的] 为研究附子的遗传多样性、种质鉴定和指纹图谱的构建提供基本保证。[方法] 以中药材附子药源植物的幼嫩叶片和块根为试材, 分别采用 SDS 法、CTAB 法和改良 CTAB 法从中药材附子药源植物中提取基因组 DNA, 比较不同方法的提取效果。[结果] 对于新鲜叶子, 采用 SDS 法提取 DNA 的  $A_{260}/A_{280}$  值最接近 1.80, 其次为改良 CTAB。采用改良 CTAB 法从新鲜附子提取 DNA 的  $A_{260}/A_{280}$  值最接近 1.80, 表明改良 CTAB 法的除杂效果优于 SDS 法。SDS 法适于杂质含量较低的试材。采用 SDS 法提取的 DNA 浓度最高, 改良 CTAB 法次之, CTAB 法最低; 从鲜材料提取基因组 DNA 浓度比干材料高。[结论] 3 种方法均能提取到中药材附子药源植物的基因组 DNA, SDS 法对新鲜叶子提取的基因组 DNA 效果最佳, 改良 CTAB 法对新鲜附子进行 DNA 提取的效果最好。

**关键词** 附子; DNA 提取; SDS 法; CTAB 法; 改良 CTAB 法

中图分类号 S567 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)18-07575-02

## Study on the Extraction Methods of the Genomic DNA from *Radix aconiti Praeparata*

ZHANG Tao et al (College of Biological Science and Engineering, Shaanxi University of Technology, Hanzhong, Shaanxi 723000)

**Abstract** [Objective] The research aimed to provide the basic guarantee for studying the genetic diversity of *Radix aconiti Praeparata*, the germplasm identification and the construction of fingerprint and so on. [Method] With tender leaves and root tuber of medicine source plant of *R. aconiti* as tested materials, the genomic DNA was extracted from medicine source plant of *R. aconiti* by using SDS method, CTAB method and the modified CTAB method resp. The extraction effects of different methods were compared. [Result] For fresh leaves,  $A_{260}/A_{280}$  value of the extracted DNA by using SDS method was closest to 1.8, followed by that by the modified CTAB method.  $A_{260}/A_{280}$  value of the extracted DNA from fresh *R. aconiti* by using the modified CTAB method was closest to 1.8, which indicated that the impurity-clearing effect of the improved CTAB method was better than that of SDS method. SDS method was suitable for the materials with low content of impurity. The concn. of the extracted DNA by SDS method was highest, followed by the modified CTAB method and that by CTAB method was lowest. The density of the genomic DNA from fresh materials was higher than that from dry materials. [Conclusion] The genomic DNA could be extracted from medicine source plant of Chinese medicine materials *R. aconiti* by 3 kinds of methods. The extraction effect of the genomic DNA from fresh leaves by SDS method was the best and the extraction effect of DNA from fresh *R. aconiti* was the best.

**Key words** *Radix aconiti Praeparata*; DNA extraction; SDS method; CTAB method; Modified CTAB method

自 20 世纪 80 年代初, 分子生物学不仅在农业上对作物的选种、育种和改良等方面有很大的促进作用, 而且在中药资源鉴定、栽培等方面也有很好的发展前景<sup>[1]</sup>。而 DNA 的分离纯化是分子生物学操作中的重要步骤, 同样也是药用植物分子诊断技术中的关键环节。但中药材中的小分子次生物质, 如萜类、黄酮、香豆素、有机酸、鞣质等含有酚羟基的化合物, 氧化后易与 DNA 结合, 引起 DNA 降解或抑制酶的活性, 而其中存在的多糖类由于与 DNA 同属大分子化合物, 一般提取过程很难完全去除。所以, 中药材基因组 DNA 提取的方法既有其普遍性又有其特殊性<sup>[2-3]</sup>。为此, 笔者以中药材附子药源植物的幼嫩叶片和附子为试验材料, 采用 SDS 法、CTAB 法、改良 CTAB 法对中药材附子药源植物基因组 DNA 提取方法进行了比较研究, 建立了简单、快捷、高纯度的中药材附子基因组 DNA 提取方法, 为中药材附子的遗传多样性、种质鉴定和指纹图谱的构建等分子水平的研究提供基本保证, 也为其他中药材分子生物学水平的研究提供参考。

## 1 材料与试验方法

**1.1 材料** 试验材料为陕西省汉中市南郑县农场栽种的中药材附子药源植物的嫩叶、块根和药店购买的附子饮片。

**1.2 仪器和试剂** 仪器。SANYO 超低温冰箱, SIGMA 低温高速离心机, 恒温水浴锅, AMERSHAM 水平电泳仪, BIO RAD 凝胶成像系统。试剂。SDS 法提取缓冲液, 20% SDS (pH=7.2), 5 mol/L 乙酸钾, 50 × TE 缓冲液, 3 mol/L 乙酸钠, 异丙醇, 氯仿, 无水乙醇, 2 × CTAB 提取缓冲液, 1 × CTAB 沉

淀缓冲液, CTAB 提取液, 1 mol/L NaCl, 1 mol/L 乙酸钠, 10 ng/ml RNaseA, TE 缓冲液。

## 1.3 试验方法

**1.3.1 SDS 法。** 将供试材料充分研磨, 加入提取缓冲液和 SDS, 混匀, 65 °C 水浴 30 min; 后加入乙酸钠混匀, 冰浴 30 min, 4 ~ 12 000 r/min 离心 10 min, 将上清液转移至另一 Eppendorf 管中; 加入等体积氯仿混匀, 4 ~ 12 000 r/min 离心 5 min, 重复 2 次; 加入 2/3 上清液体积 - 20 °C 预冷的异丙醇, 沉淀 DNA; 加入 70% 乙醇洗沉淀, 真空干燥后加入 TE 缓冲液, 充分溶解沉淀; 加入 RNaseA 除去 RNA, 然后再除去 RNaseA, 4 °C 贮存备用。

**1.3.2 CTAB 法。** 将供试材料充分研磨, 加入提取缓冲液, 65 °C 水浴中保温 30 min; 室温下 12 000 r/min 离心 10 min, 将上清液转移至另一 Eppendorf 管中; 加入等体积的氯仿, 混匀, 室温下 12 000 r/min 离心 5 min, 重复 1 次; 取上清液, 加入 4 倍上清液体积的 1 × CTAB 沉淀缓冲液混匀, 室温下静置 30 min; 然后 12 000 r/min 离心 5 min, 弃上清液, 加入 1 mol/L NaCl 溶液, 溶解沉淀; 加入 2.5 倍体积的 - 20 °C 的无水乙醇, - 20 °C 静置 20 min 使沉淀生成, 12 000 r/min 离心 5 min, 弃上清液; 用 70% 乙醇漂洗沉淀, 以下步骤同“1.3.1”。

**1.3.3 改良 CTAB 法。** 将供试材料充分研磨, 加入提取缓冲液, 在 65 °C 水浴中保温 30 min; 室温下 12 000 r/min 离心 10 min, 将上清液转移至另一 Eppendorf 管中; 加入等体积的氯仿混匀, 室温下 12 000 r/min 离心 5 min; 取上清液, 加入 1 倍体积的预冷异丙醇, 混匀, - 20 °C 静置 20 min 使沉淀生成; 12 000 r/min 离心 5 min, 弃上清液, 加入 400 μl 1 mol/L NaCl 溶液溶解沉淀; 加入等体积的氯仿, 混匀, 室温下 12 000 r/min 离心 5 min, 取上清液; 加入 1/10 上清液体积的乙酸钠和 2.0

基金项目 陕西省教育厅科研项目(05JK163)。

作者简介 张涛(1978-), 男, 陕西大荔人, 讲师, 从事分子遗传学研究。

收稿日期 2008-04-07

~2.5 倍体积的无水乙醇混匀, -20 ℃ 静置 20 min 使沉淀生成; 12 000 r/min 离心 5 min, 弃上清液, 用 70% 乙醇洗涤沉淀, 以下步骤同“1.3.1”。

## 2 结果与分析

**2.1 3 种提取方法的凝胶检测比较** 从图 1 可以看出, 基因组 DNA 浓度较高, 呈现一条亮带, 且无降解, 说明对附子鲜叶采用 SDS 法提取效果较好。图 2 中, 1、2 泳道较基因组量少且存在降解; 3、4 泳道上有少量完整基因组 DNA, 并有杂质存在; 5、6、7 泳道的 DNA 完全降解, 说明不同材料采用 SDS 法的提取效果存在很大差异。从图 3 可以看出, 3、4 泳道效果较好, 但存在部分降解; 5、6 泳道存在完整基因组 DNA, 但降解严重; 7、8 泳道降解更严重。采用改良 CTAB 法对不同材料提取基因组 DNA 的效果比较(图 4) 表明, 7、8 泳道效果最好, 是从鲜叶中提取的; 其次为 3、4 泳道, 是从新鲜的子根中提取; 饮片和干叶提取的效果最差。通过以上比较分析得出, 采用 SDS 法和改良 CTAB 法均能提取到完整纯净的基因组 DNA, 且改良 CTAB 法除杂的效果较 SDS 法好。

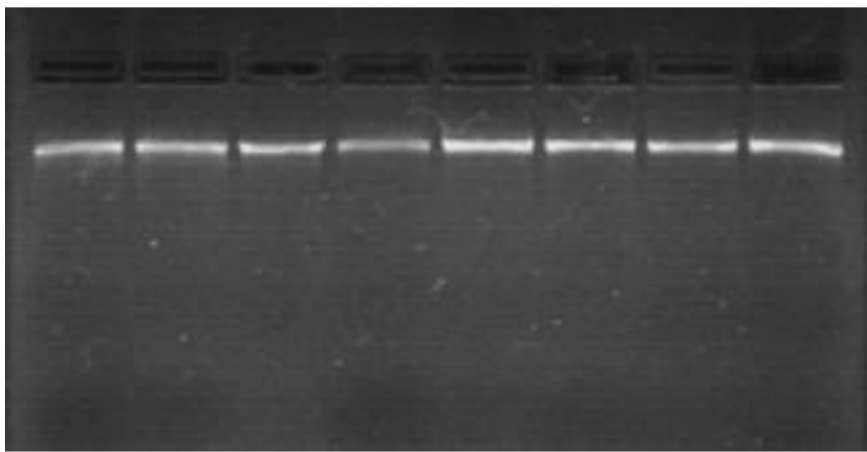
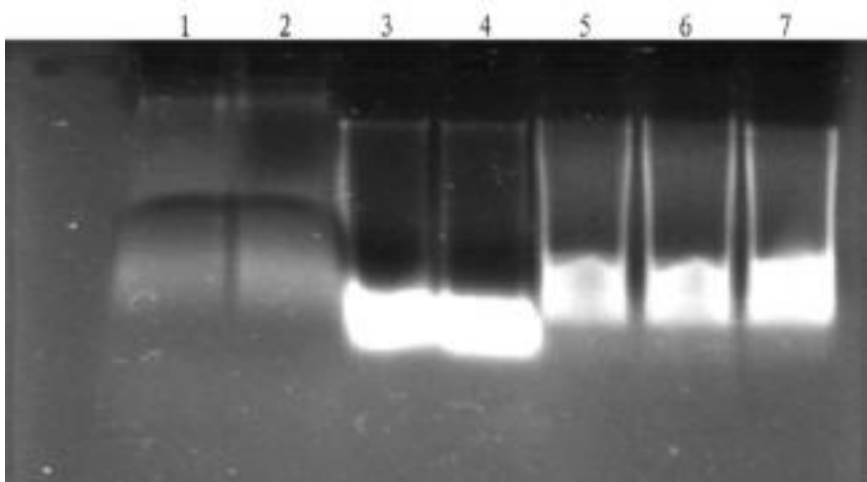


图 1 SDS 法从附子鲜叶提取 DNA 的电泳图谱

Fig.1 Electrophoretogram of DNA extracted from fresh leaves in *Radix Aconiti Praeparata*



注: 1、2 为饮片; 3、4 为鲜根; 5、6、7 为干叶。

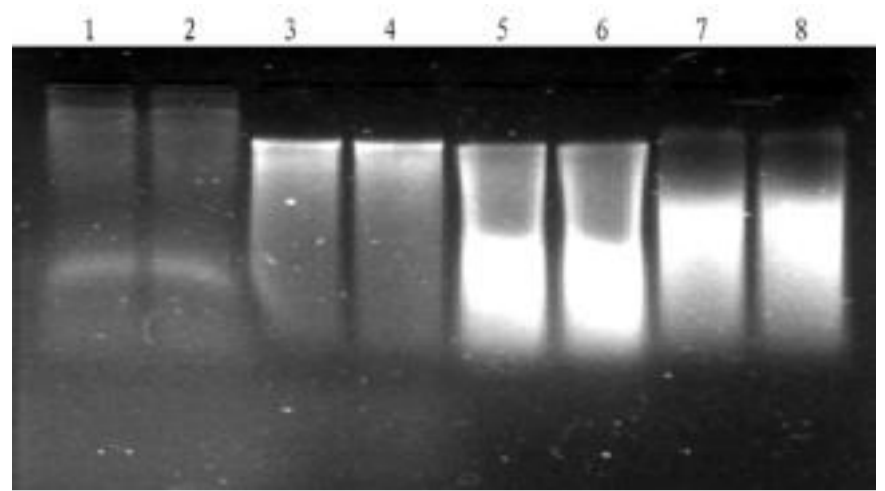
Note: 1 and 2 stand for decoction pieces; 3 and 4 stand for fresh roots; 5, 6 and 7 stand for dry leaves.

图 2 SDS 法从饮片、鲜根、干叶提取 DNA 的电泳图谱

Fig.2 Electrophoretogram of DNA extracted from decoction pieces, fresh roots and dry leaves by SDS method

**2.2 紫外分光光度计检测** 由表 1 可见, 对于新鲜叶子采用 SDS 法  $A_{260}/A_{280}$  值最接近 1.80, 其次为改良 CTAB 法。而对于新鲜的附子(鲜根)来说采用改良 CTAB 法  $A_{260}/A_{280}$  值最接近 1.80。表明改良 CTAB 法的除杂效果优于 SDS 法, 而对于杂质含量较低的试材, 采用 SDS 法最佳。对于干叶和附子饮片来说, 任何一种方法都不能提取完整的高质量 DNA。

由表 2 可以看出, SDS 法提取的基因组 DNA 浓度最高,

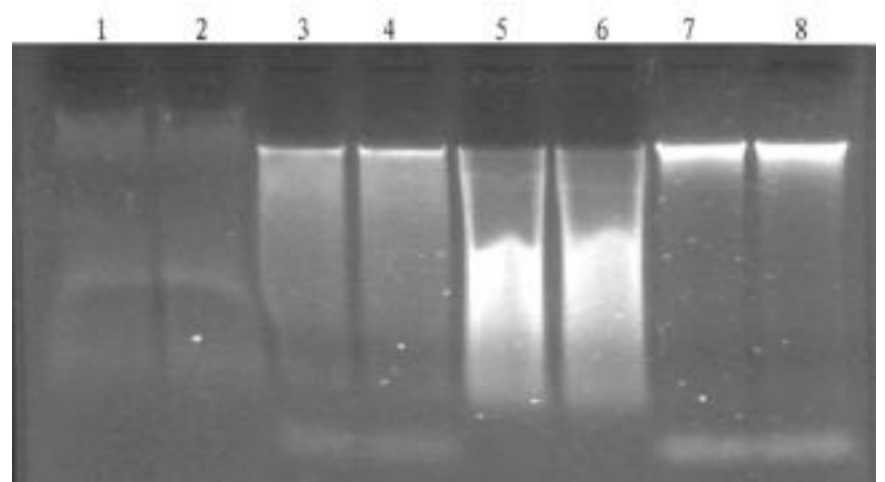


注: 1、2 为饮片; 3、4 为鲜叶; 5、6 为干叶; 7、8 为鲜根。

Note: 1 and 2 stand for decoction pieces; 3 and 4 stand for fresh leaves; 5 and 6 stand for dry leaves; 7 and 8 stand for fresh roots.

图 3 CTAB 法从不同材料中提取 DNA 的电泳图谱

Fig.3 Electrophoretogram of DNA extracted from different materials by CTAB method



注: 1、2 为饮片; 3、4 为鲜根; 5、6 为干叶; 7、8 为鲜叶。

Note: 1 and 2 stand for decoction pieces; 3 and 4 stand for fresh roots; 5 and 6 stand for dry leaves; 7 and 8 stand for fresh leaves.

图 4 改良 CTAB 法从不同材料中提取 DNA 的电泳图谱

Fig.4 Electrophoretogram of DNA extracted from different materials by modified CTAB method

表 1 紫外分光光度计纯度检测

Table 1 Purity detection by ultraviolet spectrophotometer

方法 Method	鲜叶 Fresh leaf	干叶 Dry leaf	鲜根 Fresh root	饮片 Decoction piece
SDS 法 SDS method	1.796	1.522	1.926	1.333
CTAB 法 CTAB method	1.679	1.333	1.389	1.333
改良 CTAB 法 Modified CTAB method	1.736	1.333	1.714	1.333

表 2 紫外分光光度计浓度检测

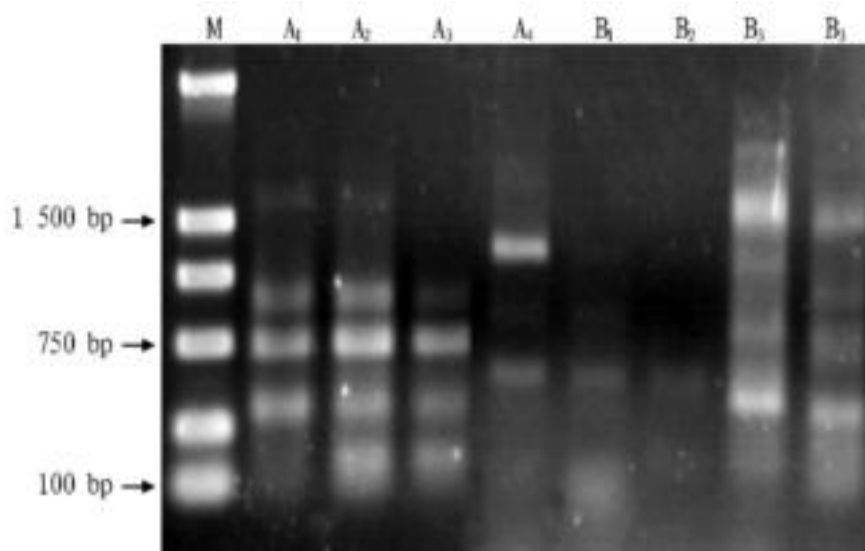
Table 2 Concentration detection by ultraviolet spectrophotometer

方法 Method	鲜叶 Fresh leaf	干叶 Dry leaf	鲜根 Fresh root	饮片 Decoction piece
SDS 法 SDS method	3 215	350	520	40
CTAB 法 CTAB method	235	40	125	20
改良 CTAB 法 Modified CTAB method	460	120	260	20

改良 CTAB 法次之, CTAB 法最低; 鲜材料比干材料提取基因组 DNA 浓度高, 这与琼脂糖凝胶电泳检测的结果一致。

**2.3 不同提取方法对后续试验的影响** 由 3 种提取方法制备中药材附子基因组 DNA 均能用于随机扩增多态性 DNA

(下转第 7585 页)



注:M为DL2000 marker; A、B分别为引物组合 M4/ En4、M5/ En8; 1, 2, 3, 4 分别代表翠绿、白玉、夏丰、大顶苦瓜。

Note: M, DL 2000 marker; A, B represent for primer combination M4/ En4 and M5/ En8; 1, 2, 3 and 4 represent for Culu, Baiyu, Xi-feng and Dading bitter melon.

图2 苦瓜SRAP 优化体系的检测结果

Fig. 2 Testing result of optimized SRAP system of bitter melon

### 3 讨论

作为一种新型的分子标记,SRAP 具有操作简单、稳定和高效等特点,适用于不同作物上的各种研究,包括图谱构建、基因定位和基因克隆等。目前,已在马铃薯、水稻、小麦、油菜、棉花、苹果、西瓜、柑橘、樱桃、柿、梅子、大蒜、莴苣、芹菜、黄瓜、辣椒等植物中应用<sup>[5]</sup>。但是,在不同作物的研究中,所采用的PCR 体系、程序不同<sup>[6-8]</sup>。影响SRAP 扩增效果的技术环节主要包括DNA 的提取以及扩增体系、扩增产物的检测。一般,扩增程序较大地影响扩增效果。例如,SSR 等分子标记技术由于不同的作物有不同的SSR 引物组合,所以对退火温度进行调整。但是由于SRAP 引物具有通用性,不同作物采用的引物组合往往相同,所以扩增程序对结果的影响不大,在此不作考虑。

SRAP 分子标记的特点是多态性高,产率中等,重复性好,操作简单,在基因组中分布均匀,较易对扩增得到的目标片段进行测序;引物具有通用性,而且其正向引物可以与反向引物两两搭配组合。因此,用少量的引物可以组配得到多

个引物对,提高了引物的使用效率,降低成本。对于遗传资源狭窄的作物,如苦瓜等葫芦科作物必须选择一种多态性高的分子标记方法才能有效进行种质鉴别。前人的研究表明,无论是利用蛋白质还是同工酶都很难进行鉴别,而利用分子标记中RAPD 技术需要经过大量引物的筛选,多态性较低。利用多态性较高的AFLP 技术可以建立指纹图谱,有效区分不同品种。但是,AFLP 需要酶切、连接、扩增杂交等繁琐的技术步骤。该试验用SRAP 进行标记显示了较高的多态性。SRAP 上游引物和下游引物可以通用,两两搭配组合,省去了引物开发的困难,在种质资源鉴定、遗传图谱的构建乃至种子纯度检测方面具有广泛的应用前景<sup>[9]</sup>。

试验表明,苦瓜SRAP-PCR 扩增的最佳反应体系是1.0 ng/  $\mu$  模板DNA,1.5 mmol/L  $Mg^{2+}$ ,0.3 mmol/L dNTPs,0.5  $\mu$ mol/L 引物,0.075 U  $\mu$  Taq DNA 聚合酶,1  $\times$ buffer,体系总体积20  $\mu$ 。该体系对苦瓜材料进行SRAP-PCR 扩增,能够扩增出较清晰的条带,且稳定性较好,说明该反应体系适合苦瓜SRAP-PCR 反应。

### 参考文献

- [1] 张长远,孙妮,胡开林. 苦瓜品种亲缘关系的RAPD 分析[J]. 分子植物育种,2005,3(4):515-519.
- [2] DEY S S, SINGH A K, CHANDEL D, et al. Genetic diversity of bitter melon (*Morinda charantia* L.) genotypes revealed by RAPD markers and agronomic traits[J]. *Scientia Horticulturae*, 2006, 109: 21-28.
- [3] LI G, QURCOO C F. Squence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in Brassica[J]. *Theor Appl Genet*, 2001, 103: 455-461.
- [4] FERRIOLI M, HICO B, NUEZ F. Genetic diversity of a germplasm collection of *Cucurbita pepo* using SRAP and AFLP markers[J]. *Theor Appl Genet*, 2003, 107: 271-282.
- [5] 柳李旺, 龚义勤, 黄浩, 等. 新型分子标记-SRAP 与TRAP 及其应用[J]. 遗传, 2004, 26(5): 777-781.
- [6] 郭大龙, 罗正荣. 部分柿属植物SRAP-PCR 反应体系的优化[J]. 果树学报, 2006, 23(1): 138-141.
- [7] 王振国, 张海英, 于广建, 等. 黄瓜SRAP 反应体系的正交设计优化[J]. 华北农学报, 2007, 22(4): 112-115.
- [8] 尚明照, 何宁, 殷冬梅, 等. 花生基因组SRAP-PCR 体系的优化[J]. 中国农学通报, 2007, 23(5): 99-103.
- [9] 李严, 张春庆. 新型分子标记-SRAP 技术体系优化及应用前景分析[J]. 中国农学通报, 2005(5): 108-112.

(上接第7576 页)

(random amplified polymorphic DNA, RAPD) 的研究,这可能是由于RAPD 对DNA 的要求不高的原因,但是采用新鲜材料制备的DNA 进行PCR 扩增的效果明显优于放干的材料。

### 3 结论与讨论

由于同一植物不同组织的结构及生化成分各不相同,而这些结构和成分上的差异对DNA 的不同提取方法往往会造成不同程度的影响,导致了不同提取方法所得DNA 在纯度和产量上的差异。因此,在实际工作中,应根据试材的生化成分和材料保存时间来筛选或建立适当的提取方法<sup>[4]</sup>。附子的不同部位提取基因组DNA 质量有差异,叶片比块根得率高、纯度高,这可能与块根中含有较多的多糖、蛋白质和酚类等杂质有关<sup>[5]</sup>。从附子新鲜材料和放干材料提取的基因组DNA 质量也有差异,鲜材料比干材料纯度高、得率高,这与干材料贮存时间过久,导致DNA 大部分降解有关<sup>[6]</sup>。

该试验所采用的3 种方法均能提取到中药材附子药源植物的基因组DNA,但综合分析发现,采用SDS 法对新鲜叶子提取的基因组DNA 效果最佳,能够稳定性制备高质量附子基因组DNA,而采用改良CTAB 法对新鲜附子(鲜根)进行DNA 提取的效果最好,说明改良CTAB 法的除杂效果最佳。

### 参考文献

- [1] 蒋细旺,包满珠,李智崎,等. 菊花DNA 提纯方法的优化[J]. 汉江大学学报, 2002, 19(3): 42.
- [2] 黄建安,黄意欢. 茶树基因组DNA 的高效提取方法[J]. 湖南农业大学学报, 2003, 29(5): 402.
- [3] 王孝安,肖娅萍,胡雅琴. 太白红杉3 种不同材料总DNA 的提取[J]. 西北植物学报, 2003, 23(4): 641.
- [4] 叶冰莹,陈由强,庄振宏,等. 阔叶榉总DNA 的提取及其RAPD 反应条件的研究[J]. 厦门大学学报, 2002, 41(5): 683.
- [5] 张娟,张道远,尹林克. 刚毛柃柳基因组DNA 提取和RAPD 反应条件探索[J]. 西北植物学报, 2003, 23(2): 253.
- [6] SCOTT O R, BENJICH A J. Extraction of DNA from plant tissue[J]. *Rat Bd Mnd*, 1998(6): 1.