

几种中药 DNA 提取方法的比较研究

陈莉, 魏莉*, 周童*, 李敏瑜*, 覃玉斌*, 吴耀生**

(广西医科大学 生物化学与分子生物学教研室, 南宁 530021)

摘要: 以丹参、绞股蓝、三七为材料, 分别采取 CTAB 法和 SDS 法提取基因组 DNA, 并通过紫外分光光度法和琼脂糖凝胶电泳对所提取的 DNA 样品进行检测, 将它们在 DNA 产量、质量等方面的优缺点进行总结。结果表明, CTAB 法能从丹参、绞股蓝中提取高质量的 DNA, 而三七的 DNA 更适合用 SDS 法提取。

关键词: 丹参; 绞股蓝; 三七; 基因组 DNA; DNA 提取

中图分类号: Q946.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2007)01-0137-03

Study on isolation methods of genomic DNA in several Chinese herbal medicines

CHEN Li, WEI Li*, ZHOU Tong*, LI Min-Yu*,
QIN Yu-Bin*, WU Yao-Sheng**

(Department of Biochemistry and Molecular Biology, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China)

Abstract: CTAB method and SDS method were used to extract genomic DNA from *Salvia miltiorrhiza* Bunge, *Gynostemma pentaphyllum* and *Panax notoginseng*. The DNA samples obtained by the above methods were tested by ultraviolet spectrophotometry and agarose gel electrophoresis. Based on the comparative analysis of yield and quality of the DNA samples by different methods, CTAB method was found to be optimal to produce high quality DNA from *Salvia miltiorrhiza* Bunge and *Gynostemma pentaphyllum*, SDS method was more effective to *Panax notoginseng*.

Key words: *Salvia miltiorrhiza* Bunge; *Gynostemma pentaphyllum*; *Panax notoginseng*; genomic DNA; DNA extraction

获取高质量的 DNA 样品是进行分子生物学研究的必要前提, 同时也是中药分子诊断技术中的关键环节。由于不同植物代谢产物尤其是多糖、多酚及其他未知次级代谢产物种类及含量的不同, 基于植物化学组分的特异性, 难以找到一种适合于所有植物 DNA 提取的方法, 即不同化学组分的植物需要相应的 DNA 提取方法。绞股蓝、丹参、三七为临床常用中药, 所含成分与药性都不相同。本研究采用 CTAB 法和 SDS 法提取这三种中药 DNA, 探讨这两种方法的提取效果, 确定了分别适合于它们的经济有效的 DNA 提取方法, 为进一步深入研究奠定了基础。

1 实验材料与设备

1.1 实验材料

丹参 (*Salvia miltiorrhiza* Bunge)、绞股蓝 (*Gynostemma pentaphyllum*) 采自广西药用植物园药圃, 实验时采其新鲜嫩叶和根。三七 (*Panax notoginseng*) 采自广西靖西县。分离根叶, 分装后于液氮中保存。

1.2 主要试剂和仪器

CTAB、SDS、EDTA、PVP、Tris、KAc 均购自上

收稿日期: 2005-03-10 修回日期: 2005-11-13

基金项目: 广西科学基金(桂科基 0342003-3, 0575065) [Supported by the Science Foundation of Guangxi (0342003-3, 0575065)]

作者简介: 陈莉(1979-), 女, 广西柳州人, 在读硕士, 从事中药基因工程研究, (E-mail) flowerhua_623@163.com.

* 广西医科大学 2001 级本科学士

** 通讯作者 (Author for correspondence, E-mail: wuyaosheng03@sina.com)

海生工生物工程技术服务有限公司。其他试剂为国产分析纯。TGLL-18K 台式高速冷冻离心机;UV-100-40 日立分光光度计;DYY-III型电泳槽;Bio-Rad PCR 仪;el DOC 2000 凝胶呈像系统。

2 方法

2.1 植物 DNA 提取方法

(1)CTAB 法(王珍等,2003):取嫩叶或根 2.5 g,置于液氮研磨成粉。加入 7 mL 预热的 1.5×CTAB 提取缓冲液(1.5% CTAB,75 mmol/L Tris-HCl (pH8.0),15 mmol/L EDTA (pH8.0),1.05 mol/L NaCl),混匀后,置于 65 °C 水浴 30 min。冷却至室温,加入等体积氯仿/异戊醇(24/1),充分混匀。5 000 r/min 离心 20 min。取上清,加 1/10 体积 10% CTAB 和等体积的氯仿/异戊醇(24/1),充分混匀,放置片刻。5 000 r/min 离心 20 min。取上清,加等体积 1% CTAB 沉淀缓冲液(1.0% CTAB,50 mmol/L Tris-HCl(pH8.0),10 mmol/L EDTA (pH8.0)),轻轻颠倒离心管至形成 DNA 絮状沉淀,5 000 r/min 离心 10 min 使 DNA 沉淀于管底。加 1.5~2 mL 1 mol/L NaCl 56 °C 水浴溶解 DNA,再加入 2~3 mL 预冷的 95% 乙醇沉淀 DNA,挑出 DNA 置于 1.5 mL 离心管中。用 70% 乙醇洗涤沉淀两次,挥干后加适量 TE 缓冲液溶解。

(2)SDS 法(王关林等,2002,参照文献略加改进):嫩叶和根各取 0.5 g,分别置于液氮研磨成粉,加入提取缓冲液(100 mmol/L Tris-HCl (pH8.0),50 mmol/L EDTA (pH8.0),0.5 mol/L NaCl,用前加 β-巯基乙醇至终浓度为 2%)7 mL,混匀后加入 1 mL 10%

SDS,65 °C 水浴 10~15 min(间隔晃动 2~3 次)。加入 1.85 ml 5 mol/L KAc,混匀后冰浴 30 min。12 000 r/min 离心 15 min。取上清,加入等体积的氯仿/异戊醇(24/1),充分混匀,放置片刻。8 000 r/min 离心 10 min。取上清,加入 2/3 体积预冷异丙醇,混匀,室温放置 30 min。8 000 r/min 离心 10 min,弃上清。用 70% 乙醇洗涤沉淀两次,挥干后加适量 TE 缓冲液溶解。

2.2 DNA 纯度、收率检测

(1)纯度测定:将 DNA 提取液适当稀释后,用紫外分光光度计观测在紫外光 260 nm 和 280 nm 的吸收值 A_{260} 和 A_{280} ,并以 A_{260}/A_{280} 的比值鉴定纯度。采用 1% 琼脂糖电泳,溴化乙锭染色,凝胶成像系统观察并拍照。

(2)收率计算:DNA 收取量(μg)= $A_{260} \times 50 \times$ 稀释倍数 \times 原液体积;DNA 收率($\mu\text{g}/\text{g}$)=DNA 收取量(μg)/提取样品量(g)。

3 结果与分析

3.1 紫外分光光度法检测不同的提取方法对提纯 DNA 效果的影响

表 1 所示,CTAB 法提取的丹参根、叶、绞股蓝叶以及 SDS 法提取的三七根 DNA A_{260}/A_{280} 在 1.6~1.9 之间,表明得到的 DNA 较纯。而 CTAB 法提取的三七根以及 SDS 法提取的丹参根、叶 DNA $A_{260}/A_{280} < 1.6$,说明样品中有蛋白质和酚等污染。SDS 法提取的绞股蓝叶 DNA $A_{260}/A_{280} > 1.9$,表明有 RNA 污染(王关林等,2002)。从收率上看,CTAB 法提取的绞股蓝叶最高,SDS 法提取的三七根和绞股蓝叶其次,其余的均在 3~11 之间。

表 1 CTAB 法和 SDS 法提取不同中药 DNA 效果

Table 1 The effect of several Chinese herbal medicine DNA extracted by CTAB method and SDS method

提取方法 Method	提取材料 Material	A_{260}	A_{280}	A_{260}/A_{280}	收率 Yield ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)
CTAB 法	丹参根	0.088	0.047	1.872	3.52
CTAB method	丹参叶	0.184	0.110	1.672	7.36
	绞股蓝叶	1.892	1.213	1.600	75.68
	三七根	0.206	0.137	1.500	8.24
SDS 法	丹参根	0.105	0.104	1.009	10.5
SDS method	丹参叶	0.082	0.066	1.242	8.2
	绞股蓝叶	0.316	0.152	2.079	31.6
	三七根	0.387	0.242	1.600	38.7

3.2 琼脂糖电泳检测不同提取方法对提纯 DNA 效果的影响

电泳检测结果与紫外分光光度法检测结果基本

一致。如图 1 所示,除 SDS 法提取的丹参根、叶和绞股蓝叶外,其他的 DNA 样品在电泳凝胶上都呈现出清晰、迁移率很低的条带,溴酚蓝前无光亮区且

点样孔内无荧光出现。由此可见, 这些方法已基本将蛋白质、多糖及一些带正电荷的杂质去除, 得到了较纯的 DNA。SDS 法提取的丹参根、叶和绞股蓝叶点样孔亮且 DNA 电泳速度较慢, 说明样品所含糖类较多, 特别是 SDS 法提取的绞股蓝叶, 拖尾现象明显。SDS 法提取的丹参根、叶在溴酚蓝附近有光亮区, 特别是根 DNA 可看到两条较清晰的条带, 且后一条亮度约为前一条的 2 倍, 应为 rRNA (图 2)。说明此种方法在提取 DNA 的同时获得了较完整的 RNA。由此可见, 无需对试剂和耗材进行特别处理, 将 SDS 法略加改进可用于提取丹参根的 RNA。

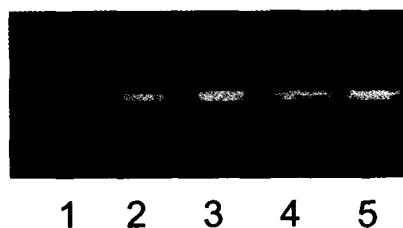


图 1 两种不同方法提取不同中药 DNA 电泳图
Fig. 1 The agarose gel electrophoresis of several Chinese herbal medicines DNA extracted by different methods

CTAB 法: 泳道 1, 丹参根; 泳道 2, 丹参叶; 泳道 3, 绞股蓝叶; 泳道 4, 三七根。SDS 法: 泳道 5, 三七根。
CTAB method: lane 1, root of *Salvia miltiorrhiza*; lane 2, leaf of *Salvia miltiorrhiza*; lane 3, leaf of *Gynostemma pentaphyllum*; lane 4, root of *Panax notoginseng*; SDS method: lane 5, root of *Panax notoginseng*.

4 讨论

提取植物基因组 DNA 的方法很多, 最常见的提取方法是 CTAB 法和 SDS 法。这两种方法对多数植物基因组 DNA 的提取均比较有效。但对某些特定植物, 或不同的器官部位, 提取效果有明显差异。有的植物适于用 SDS 法 (Haymes, 1996; Oard, 1992), 有的植物适于用 CTAB 法 (Cheng, 1997; Collins, 1992; Luro, 1995)。SDS 和 CTAB 都是一类去污剂, 其作用是破坏细胞膜释放 DNA。CTAB 法通过改变盐浓度选择性地沉淀 DNA, 可早期去除色素、多糖类杂质, 避免 DNA 与它们共沉淀后再难分离而得到较纯的 DNA。但由于使用盐浓度改变沉淀 DNA 会使 DNA 沉淀不完全, 收率会较低。因而, 对于丹参、绞股蓝等这些富含多糖、酚类、酮类等

次生代谢物的中药, 应采用 CTAB 法。而 SDS 能较好地使蛋白质变性沉淀, 对于三七这类次生代谢产物较易去除的中药, 可采用 SDS 法以提高收率。

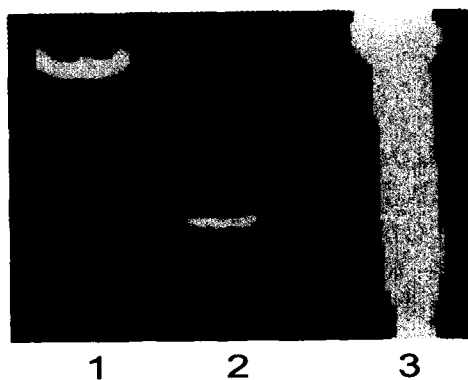


图 2 SDS 法提取的丹参根、叶和绞股蓝叶 DNA 电泳图
Fig. 2 The agarose gel electrophoresis of root and leaf of *Salvia miltiorrhiza* and leaf of *Salvia miltiorrhiza* DNA extracted by SDS method
泳道 1: 丹参叶; 泳道 2: 丹参根; 泳道 3: 绞股蓝叶。
lane 1: leaf of *Salvia miltiorrhiza*; lane 2: root of *Salvia miltiorrhiza*; lane 3: leaf of *Gynostemma pentaphyllum*.

绞股蓝叶富含酚类及多糖 (郭锡勇, 1999), SDS 法提取的 DNA 呈深褐色且电泳拖尾现象严重, 我们对传统的 SDS 法进行了改进。(1) 提高提取缓冲液中 β -巯基乙醇的浓度至 6%, 并在研磨样品时加入 2% PVP。PVP 有很强的结合多酚化物的能力, 可与多酚结合形成复合物, 可以在抽提液中加入 PVP 以去除多酚的影响 (Kim, 1997)。丁晓东等 (2000) 在细胞裂解液中加入 PVP, 解决了酚类、色素和蛋白质等对荔枝 DNA 质量的影响。 β -巯基乙醇作为强还原剂也能防止多酚的氧化, 还可以打断多酚氧化酶的二硫键使之失活。二者协同作用, 有效地抑制酚类物质对 DNA 的影响。(2) 增加 KAC 选择性沉淀多糖的次数。多糖对总 DNA 样品的纯度影响较大, 若提取的样品中含多糖较多, DNA 溶解于 TE 缓冲液后会形成粘稠的溶液。此外, 多糖可以抑制多种酶如限制性酶、Taq 酶的活性 (Fang, 1992)。增加 KAC 选择性沉淀多糖的次数可有效地去除多糖。(3) 异丙醇沉淀后, 改离心得到 DNA 为挑取絮状 DNA。通过离心得到的 DNA 沉淀, 常常会使溶液中的其它细小杂质沉淀下来而降低 DNA 纯度。挑取絮状的 DNA 大分子, 既可排除杂质, 又可弃去部分小分子的 DNA, 使得到的 DNA 较完整。经过处理后得到的 DNA 呈半透明状, 电 (下转第 136 页 Continue on page 136)

杆菌仅将左右边界序列 RB 和 LB 之间的 DNA 序列整合到植物染色体中。pGreen0029 载体在 pSoup 质粒的协助下,在农杆菌 GV3101 内的复制速度快,转化植物的范围广,多克隆位点多,操作方便(Hellens 等,2000)。因此,整个含 VP1 基因的表达调控元件(启动子、增强子、外源基因和 DHA)通过酶切连接,构建在植物双元载体 pGreen0029 的左右边界序列之间,由于构建的 VP1 表达为独立的表达单元,因此不需要鉴别其方向,左右边界序列之间还包含一个 NPTII 基因,也是一个独立的表达单元,其表达产物能够磷酸化卡那霉素及其衍生物,作为筛选转基因植株的抗性基因。

本研究所构建的 pGreen0029-VP1-DHA 植物表达载体,可用于烟草、马铃薯、玉米、番茄等植物的转化,从而为用植物作为生物反应器生产口服疫苗提供依据。

参考文献:

- 萨姆布鲁克 J,拉塞尔 DW. 黄培堂,等(译). 2002. 分子克隆实验指南[M]. 北京:科学出版社:27-29
- Carrillo C, Wigdorovitz A, Olieros JC, et al. 1998. Protective immune response to foot-mouth disease virus with VP1 expressed in transgenic plants[J]. *J Virol*, **72**(2):1 688-1 690
- Dus Santos MJ, Wigdorovitz A, Trono K, et al. 2002. A novel methodology to develop a foot and mouth disease virus(FMDV) peptide-based vaccine in transgenic plants[J]. *Vaccin*, **20**:1 141-1 147
- Guo HC(郭慧琛), Liu ZX(刘在新), Sun SQ(孙世珞), et al. 2003. The latest progress of genetics vaccines against foot-mouth disease (口蹄疫基因疫苗研究进展)[J]. *Progress in Veterinary Medicine*(动物医学进展), **24**(4):1-5
- Hellens RP, Edwards EA, Leyland NR, et al. 2000. pGreen; a versatile and flexible binary Ti vector for *Agrobacterium*-mediated plant transformation[J]. *Plant Mol Biol*, **42**(6):819-832
- Li C(李昌), Jin NY(金宁一), Wang G(王罡), et al. 2003. On constructing expressing vectors for genetics engineering vaccine(植物基因工程疫苗高效表达载体的构建)[J]. *J Jilin Agric Univ*(吉林农业大学学报), **25**(3):253-256
- Liu Y(刘铀), Bi YZ(毕英佐), Ma JY(马静云), et al. 2004. Construction of VP1 plant expression vector of foot-mouth disease virus(口蹄疫病毒 VP1 植物表达载体的构建)[J]. *J Zhanjiang Ocean Univ*(湛江海洋大学学报), **24**(4):59-62
- Mason HS. 1992. Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic plants[J]. *Pro Natl Acad Sci USA*, **89**,11 745-11 749
- Mason PW, Grubman MJ. 2001. Controlling foot and mouth disease with vaccine[J]. *Australian Veterinary Journal*, **79**(5):342-343
- Peng ZQ(彭志强), Yu SY(俞守义), Yu DQ(余迪求), et al. 2002. Construction of plant expression vector containing the gene encoding cholera toxin B subunit(编码霍乱毒素 B 亚单位基因植物表达载体的构建)[J]. *J First Military Medical Univ*(第一军医大学学报), **22**(8):736-738
- Samuel AR, Knowles NJ. 2001. Foot and mouth disease sevirus; Cause of the recent crisis for the UK livestock industry[J]. *Trends in genetics*, **17**(8):421-424.
- Wang J(王捷), Guo Y(郭勇). 1999. Vaccine production in transgenic plant(疫苗生产的新途径——转基因植物)[J]. *Guhaia*(广西植物), **19**(3):260-262
- Wigdorovitz A, Carrillo C, Dus Santos MJ, et al. 1999. Induction of a protective antibody response to foot and mouth disease virus in mice following oral or parenteral immunization with alfalfa transgenic plants expressing the viral structure protein VP1[J]. *Virology*, **255**(2):347-353

(上接第 139 页 Continue from page 139)

泳拖尾现象消失。

参考文献:

- 王关林,方宏筠. 2002. 植物基因工程[M]. 北京:科学出版社:742-744,755
- 郭锡勇,曹宇浩. 1999. 黔产绞股蓝中多糖的含量测定[J]. 贵阳中医学院学报, **21**(3):59-60
- Cheng FS, Broun SK, Weeden NF. 1997. A DNA extraction protocol from various tissues in woody species[J]. *Hortscience*, **32**(5):921-922
- Collins GG, Symon SRH. 1992. Extraction of nuclear DNA from grape vine leaves by a modified procedure[J]. *Plant Mol Rep*, **10**:233-235
- Ding XD(丁晓东), Lu LX(吕柳新). 2000. Study on genomic DNA extraction from recalcitrant litchi(从顽拗植物荔枝中提取基因组 DNA 技术的研究)[J]. *Chin J Appl Environ Biol*(应用与环境生物学报), **6**(2):142-145
- Fang G, Hammar S, Grumet R. 1992. A quick and inexpensive method for removing polysaccharides from plant genomic DNA[J]. *Biotechniques*, **13**(1):52-56
- Haymes KM. 1996. Mini-prep method suitable for a plant breeding program[J]. *Plant Mol Biol Rep*, **14**(3):280-284
- Kim C S, Lee C H, Shin J S, et al. 1997. A simple and rapid method for isolation of high quality genomic DNA from fruit tree and conifers using PVP[J]. *Nucleic Acid Res*, **25**,1 085-1 086
- Luro F, Laigret F. 1995. Preparation of high molecular weight genomic DNA from nucleoli of woody plants[J]. *Biotechniques*, **19**:388-392
- Oard J H, Dronavall S. 1992. Rapid isolation of rice and maize DNA for analysis by random-primer PCR[J]. *Plant Mol Biol Rep*, **10**:236-241
- Wang Z(王珍), Fang XJ(方宜钧). 2003. Plant DNA isolation(植物 DNA 分离)[J]. *Mol Plant Breeding*(分子植物育种), **1**(2):281-288