

药用植物珠子参新鲜块根 DNA 提取方法研究*

杨维泽¹, 史云东², 许宗亮¹, 杨绍兵¹, 张金渝^{1△}

(1. 云南省农业科学院药用植物研究所, 云南昆明 650231; 2. 玉溪师范学院化学与环境科学系, 云南玉溪 653100)

摘要: 目的 为获取珠子参高质量、高产量的总 DNA, 满足 SSR-PCR 标记实验。方法 采用经典 CTAB 法、改良 CTAB 法、高盐低 PH 法和 SDS 法对珠子参总 DNA 提取方法进行比较研究, 用紫外分光光度法和琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量。结果 4 种方法中产量最高的为经典 CTAB 法, 产率为 149.533ng/g, 纯度最高的为改良 CTAB 法, OD260/OD280 为 1.796。结论 4 种方法提取的 DNA 质量均满足 SSR-PCR 标记实验, 扩增效果改良 CTAB 法和 SDS 法效果最佳。

关键词: 珠子参; DNA 提取; SSR 扩增

中图分类号: R284.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-2723(2014)04-0025-04

珠子参 (*Panax japonicus* C. A. Mey. var. major (Burk.) C. Y. Wu et K. M. Feng) 为五加科 (Araliaceae) 人参属 (*Panax*) 植物, 是名贵中药材珠子参的基源植物之一, 具有补肺养阴, 祛瘀止痛, 止血等功效, 用于气阴两虚, 烦热口渴, 虚劳咳嗽, 跌扑损伤, 关节痹痛, 咳血, 吐血, 衄血, 崩漏, 外伤出血等症^[1]。主产于云南、贵州、四川、陕西、湖北和甘肃等地, 属于名贵且常用的中药材之一, 是白族、纳西族、傈僳族、藏族、彝族等少数民族的传统用药^[2]。研究表明, 珠子参药材中主要含有较高的皂苷类成分^[3-8], 挥发油^[9], 脂溶性化学成分^[10], 微量元素^[11-13], 糖蛋白^[14], 氨基酸^[13, 15]等化学成分; 随着科学研究的深入, 人们对珠子参确切疗效的发现, 珠子参药材的用量在逐年增加, 价格也在快速上涨, 而珠子参药材来源仅限于野生采挖, 赵仁^[2]等的研究认为珠子参野生资源已经处于高度濒危状态, 开展人工栽培是保护珠子参野生资源的有效途径, 开展分子标记实验有助于掌握珠子参的遗传基础, 有助于开展人工育种工作。

提取高质量的基因组 DNA 是有效开展分子生物学研究的前提^[16], 珠子参块根中富含皂苷类成分、挥发油、脂溶性化学成分、糖蛋白等, 较难获得高质量的总 DNA。为了提取到高质量的珠子参 DNA, 本研究采用经典 CTAB 法、改良 CTAB 法、高盐低 PH

法和 SDS 法对珠子参总 DNA 的提取进行比较, 确定高质量高产率的珠子参 DNA, 为今后珠子参遗传多样性分析、遗传图谱的构建及基因定位等研究奠定基础。

1 实验材料和方法

1.1 实验材料

供试材料于 2010 年 7 月, 来自于取自大理州鹤庆县草海镇马厂自然村的野生植株的块根, 材料选取时选取植株较大, 植株完整的材料, 以保证所用实验材料均来自同一植株, 消除不同植株间的差异, 选定植株, 挖出块根、洗净、水气晾干后, 放入冰壶中带回实验室, 放入 -70℃ 冰箱保存备用。

1.2 所需试剂及仪器

所需试剂为 2%CTAB (十六烷基三甲基溴化铵)、3%SDS (十二烷基苯磺酸钠)、EDAT-Na₂ (乙二胺四乙酸二钠)、Tris 碱 (三羟甲基氨基甲烷)、HCl (盐酸)、KAc (醋酸钾)、异戊醇和氯仿溶液 (24:1) 等。所需仪器为 Eppendorf 台式高速冷冻离心机 (5430R)、水浴锅、冰箱、摇床、凝胶电泳仪、西盟凝胶成像仪 (Bio-Best 200E)、Eppendorf 移液器和 Bio-Rad iCycler PCR 仪、灭菌锅等。

1.3 方法

查阅文献, 根据珠子参块根富含皂苷类成分、

* 基金项目: 国家自然科学基金项目 (81260610); 国家农业部公益性行业专项 (201303117)

收稿日期: 2014-04-17

作者简介: 杨维泽 (1982-), 男, 云南禄劝人, 助理研究员, 主要从事药用植物资源研究。

△通信作者: 张金渝, E-mail: jy Zhang2008@163.com

挥发油、脂溶性化学成分、糖蛋白等特点,确定了 4 种提取方法,每种方法 3 个重复。

1.3.1 经典 CTAB 法^[17]

每个重复取 0.5g 珠子参块根放入研钵充分研磨,加入 1 200 μ L 65℃预热的 2%CTAB 提取缓冲液混匀,转移至另 1.5mL 的 Eppendorf 离心管后置于 65℃的水浴锅水浴 30min,每个 10min 轻轻颠倒混匀;取出放入离心机 12 000rpm 离心 10min,转移上清液至另一个 1.5mL Eppendorf 离心管,加入等体积氯仿/异戊醇(24:1)溶液,轻轻反复多次混合,使管内溶液呈乳浊状,12 000rpm 离心 10min;转移上清液至另 1.5mL 的 Eppendorf 离心管,加入等体积的无水乙醇,轻轻混匀,-20℃下放置至有白色絮状沉淀出现,取出离心管放入离心机,10 000rpm 离心 10min,弃上清液,用 400 μ L 75%的乙醇洗 2 次,7 000rpm 离心 3min 弃上清液,然后再用 400 μ L 无水乙醇洗,7 000rpm 离心 3min 弃上清液,然后置于空气中干燥;待沉淀物干燥后溶于 100 μ L 的 TE 溶解,待溶解后放入-20℃的冰箱保存备用。

1.3.2 改良 CTAB 法

每个重复取新鲜珠子参 0.5g 分别放入研磨中加入少许石英砂和 PVP,加入 1.2mL 的 Buffer 去多糖和 24 μ L β -巯基乙醇充分研磨成粉末,迅速将研磨好的珠子参粉末装入 1.5mL Eppendorf 离心管中;10 000rpm 离心 10min 弃上清液;1.5mL 离心管中加入 600 μ L 65℃预热的 CTAB 提取缓冲液同时加入 24 μ L β -巯基乙醇,用毛细玻璃管搅拌充分;迅速将 1.5mL 离心管置于 65℃水浴中保温 60min,每隔 15min 轻轻颠倒混匀;待冷至室温后,取出 1.5mL 离心管,每管加入 240 μ L KAc,放入-20℃冰箱 1h;然后 10 000rpm 离心 10min;小心将上清液相转移至另一只干净的 1.5mL 离心管中,加入等体积的氯仿/异戊醇(24:1)溶液,放入垂直振荡器中充分混匀 10min,放入离心机 10 000rpm 离心 10min;转移上清液至另一 1.5mL 离心管中,加入-20℃冰箱预冷的异丙醇 640 μ L,放入-20℃冰箱冷冻 1h;取出后在 10 000rpm 离心 10min 沉淀 DNA,清洗方法和保存方法同经典 CTAB 法。

1.3.3 SDS 法^[17](略有改动)

每个重复取新鲜珠子参 0.5g 放入研磨中加入 1 200 μ L 3%SDS 提取缓冲液,并加入 240 μ L β -巯基乙醇充分研磨成粉末,迅速将研磨好的珠子参粉

末装入 1.5mL 离心管中;65℃水浴保温 60min,每 15min 轻摇一次;待冷却后加入 230 μ L 5mol/L KAc,混合后冰浴 60min;取出后 10 000rpm 离心 10min,将上清液转移至另一只 1.5mL 离心管中,加入等体积的氯仿/异戊醇(24:1)溶液,然后放入垂直振荡器中充分混匀 10min;取出后 10 000rpm 离心 10min;转移上清液至另一干净的 1.5mL 离心管中,加入-20℃冰箱预冷的异丙醇 600 μ L 溶液混匀,放入-20℃冰箱冷冻 60min;取出后在 10 000rpm 离心 10min 沉淀 DNA;清洗方法和保存方法同经典 CTAB 法。

1.3.4 高盐低 pH 法^[18](略有改动)

每个重复取新鲜珠子参 0.5g 放入研磨中加入 1200 μ L 高盐低 PH 值提取缓冲液,充分研磨成粉末,迅速将研磨好的珠子参粉末装入 1.5mL 离心管中;65℃水浴保温 60min,每 15min 轻摇一次;取出后放入离心机 10 000rpm 离心 10min,将上清液转移至另一只 1.5mL 离心管中,加入 600 μ L KAc 溶液,然后混匀,放入-20℃冰箱冷冻 60min;取出 10 000rpm 离心 10min;转移上清液至另一干净的 1.5mL 离心管中,加入 600 μ L 预冷的异丙醇溶液混匀,放入-20℃冰箱冷冻 60min;取出后在 10 000rpm 离心 10min 沉淀 DNA;弃上清液,用 75%的乙醇洗 2 次,离心机 7 000rpm 离心 3min 沉淀 DNA,清洗方法和保存方法同经典 CTAB 法。

1.4 DNA 质量检测

取 5 μ L DNA 溶液用蒸馏水稀释 200 倍后,在 UV-759 紫外分光光度计上测量 DNA 浓度以及 OD260/OD280 的比值。取 2 μ L DNA 样品在 3%的琼脂糖凝胶上电泳,核酸染料染色,西盟凝胶成像仪(Bio-Best 200E)观察、拍照。

1.5 SSR 标记分析

为验证 4 种提取方法提取的 DNA 样品在 SSR 标记实验中的适应性,将上述提取的 DNA 样品,由上海生工合成,自于西洋参前引物为 5' ATTG-GAAGGCAGGCAGCCCC 3' 和后引物为 3' GGTGCGGCCGAGGTACTTT 5',PCR 反应体系(25 μ L)包括 PCR 缓冲液 10 $\times$ 的 buffer 缓冲液 2.5 μ L,25mmol $\cdot$ L⁻¹ 的 MgCl₂(2 μ L),0.1U 的 TaqDNA 聚合酶(2 μ L),0.1Umol $\cdot$ L⁻¹ 的 dNTPs(2 μ L),上下游引物各 0.1Umol $\cdot$ L⁻¹ 的 1 μ L,20ng 左右的珠子参 DNA 模板 1 μ L,无菌扩增水 13.5 μ L,在 Bio-Rad

iCycler PCR 仪,扩增体系为:94℃预变性 5min,94℃变性 45 s,55℃退火 30s,72℃延伸 90s,36 个循环,72℃延伸 7min,扩增 36 个循环。扩增后产物 25μL 加 2μL 溴酚蓝上样缓冲液混匀,用 6.0% 的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳,分离扩增产物,检测所设计引物可用性和多态性。电泳液为 1× 的 TBE 缓冲液,电压 200 V,电泳时间 2.5 h,参照李晓辉^[9]等硝酸银法显色,检测扩增产物,用扫描仪扫描图板、拍照、保存图片。

2 结果与分析

2.1 DNA 的纯度与质量

2.1.1 紫外分光光度检测

4 种提取方法提取的 DNA 在 UV-759 紫外分光光度计下,在 OD260、OD280 检测的结果见表 1。高纯度的 DNA 的 OD260/OD280 应 1.8,高于 1.8 则可能有 RNA 污染,低于 1.8 可能有蛋白质污染^[20],由表 1 可以看出,改良 CTAB 法提取的 DNA 质量最好,其 OD260/OD280 在 1.796,最为接近纯的 DNA 的 1.8,其次为高盐低 PH 值法,最差的为 SDS 法,说明在提取过程中改良 CTAB 法在提取过程中蛋白质和多糖去除得最彻底,SDS 法杂质最多;从 DNA 的产量来看,CTAB 法提取 DNA 产量最高,其次为改良 CTAB 法,最低的为 SDS 法。

表 1 4 种方法提取总 DNA 的纯度和产量

方法	OD260	OD280	OD260/OD280	DNA产量/(ng/g)
CTAB	0.075	0.042	1.762	149.533
改良 CTAB	0.070	0.039	1.796	140.600
SDS	0.062	0.036	1.730	123.733
高盐低 PH 值	0.068	0.038	1.778	136.467

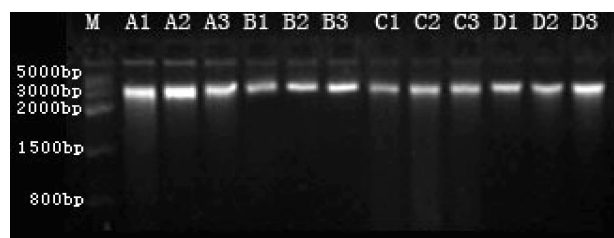
2.1.2 琼脂糖凝胶检测

3% 的琼脂糖凝胶电泳结果见图 1。从 DNA 电泳结果显示,采用 CTAB 法提取的基因组 DNA 条带最明亮,但有拖尾现象,SDS 法提取的条带最不清晰,效果最好的为改良 CTAB 和高盐低 PH 值法。说明改良 CTAB 法和高盐低 PH 值法适合提取富含多糖和蛋白质的珠子参块根材料。

2.2 SSR 标记分析

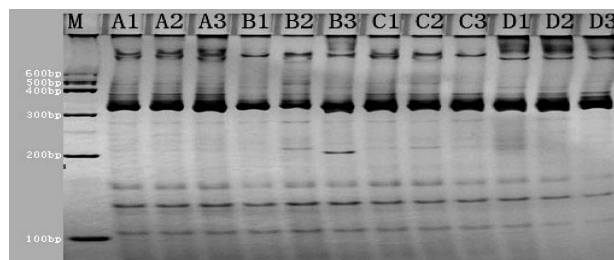
SSR-PCR 扩增产物在 6% 的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳结果见图 2,由图 2 可以看出,4 种提取方法所提取的新鲜珠子参材料的 DNA 均能满足 SSR 标记实验,从效果来看改良 CTAB 法、SDS 法 2 种提

取方法所提取的材料的扩增条带清晰,且杂带较少,其次为 CTAB 法提取的材料目标条带清晰,但杂带相对较多,高盐低 PH 值法扩增的效果也较好,说明,4 种提取方法所提取的珠子参 DNA 质量都能满足 SSR 标记实验,也同时说明了 SSR 标记实验对植物 DNA 的质量要求不是很高。



注:M 为 Marker,A、B、C、D 分别为经典 CTAB 法、改良 CTAB 法、SDS 法和高盐低 PH 法。

图 1 4 种提取方法总 DNA 的凝胶电泳图



注:M 为 Marker,A、B、C、D 分别为经典 CTAB 法、改良 CTAB 法、SDS 法和高盐低 PH 法。

图 2 4 种提取方法 PCR 产物聚丙烯酰胺电泳图

3 讨论

分子标记实验能否成功,前提是 DNA 质量的好坏,因此制备 DNA 是非常重要的一个基础环节。DNA 中多糖、多酚、色素,都会严重影响 DNA 聚合酶的活性,导致 DNA 的不可溶解,不利于 PCR 扩增^[21]。4 种提取方法中,CTAB 法提取的产量最高,但质量相较于改良 CTAB 法和高盐低 PH 值法的纯度较低,改良的 CTAB 法中加入了 PVP 和 β-巯基乙醇,王卓伟^[22]等曾经报道 PVP 在桑叶 DNA 提取过程中有去除多糖的作用,是一种吸附剂和澄清剂,能有效吸附多糖;β-巯基乙醇是一种还原剂和抗氧化剂,能除去色素,防止酚类氧化,保证了 DNA 质量,从而使 SSR 标记实验能顺利进行。

根据实验材料珠子参的特性,富含皂苷类成分、挥发油、脂溶性化学成分、糖蛋白,设计 DNA 提取方法时要选择能有效去除多糖、蛋白和固醇类的

方法,本次实验所选用的 4 种方法,均具有较好的取多糖、去蛋白等的作用,从实验结果来看,改良后的 CTAB 法的提取质量最高,产率也较高,CTAB 法的产量次之,但质量相对较差,因此在选择提取方法时可以根据自己的实验目的进行选择,选择产率高的提取方法,还是质量高的方法,在珠子参 DNA 提取上,建议要求高质量的 DNA 选择改良 CTAB 法,要求高产率但质量要求不高,则选择经典 CTAB 法。

参考文献:

- [1] 国家药典编委会. 中华人民共和国药典[M]. 北京:中国医药出版社,2010:254.
- [2] 赵仁,赵毅,李东明,等. 珠子参研究进展[J]. 中国现代中药,2008,10(7):3-6.
- [3] 杨崇仁,伍明珠,周俊,等. 珠子参叶的三萜皂苷成分[J]. 云南植物研究,1984,6(1):118-120.
- [4] 彭树林,肖蓉,肖悼殷. 川产珠子参化学成分的研究[J]. 华西药理学杂志,1986,1(3):1.
- [5] 冯宝树,汪夕彬,王答祺,等. 秦岭产珠子参叶的达玛烷型皂苷研究(1)[J]. 云南植物研究,1987,9(4):477-484.
- [6] 王答祺,冯宝树,汪夕彬,等. 秦岭珠子参叶的达玛烷型皂苷的进一步研究[J]. 药学学报,1989,24(8):633-636.
- [7] 王答祺,樊娟,冯宝树,等. 羽叶三七叶中的苷类成分的研究[J]. 药学学报,1989,24(8):593-599.
- [8] 邹坤,刘朝霞,朱秣,等. 扣子七中人参皂苷的 HPLC-MS-MS 方法研究[J]. 药学学报,2004,39(5):385-388.
- [9] 施丽娜,詹尔益,张玉珠. 珠子参挥发油的化学成分[J]. 昆明医学院学报,1992,13(1):46-48.
- [10] 包旭,詹常森,黄静,等. 大叶珠子参脂溶性化学成分的研究[J]. 华西药理学杂志,1991,6(4):220-222.
- [11] 迟群,郭建文. 珠子参的微量元素分析比较[J]. 西北药理学杂志,1993,8(2):61-64.
- [12] 赵恒,谢成科,岳松健. 珠子参及其炮制品中 16 元素的含量测定[J]. 中国中药杂志,1994,19(7):411-412.
- [13] 李映丽,吕居娴,冯变玲,等. 参叶-大叶三七叶中氨基酸及微量元素分析[J]. 西北药理学杂志,1996,16(s):11-13.
- [14] 杜良成,王世林,李英,等. 珠子参抗真菌糖蛋白的研究[J]. 云南植物研究,1992,14(4):430-436.
- [15] 杨芳,杨万林,陈锦玉,等. 珠子参地上部分氨基酸测定及营养评价[J]. 氨基酸和生物资源,2013,35(2):1-4.
- [16] 姜静. 分子生物学实验原理与技术[M]. 哈尔滨:东北林业大学出版社,2003.
- [17] 顾红雅. 植物分子生物学实验手册[M]. 北京:高等教育出版社,1998:4-11.
- [18] 邹喻萍,汪小全,雷一丁,等. 几种濒危植物及其近缘类群总 DNA 的提取与鉴定[J]. 植物学报,1994,36(7):528-533.
- [19] 李晓辉,李新海,李文华,等. SSR 标记技术在玉米杂交种种子纯度测定中的应用[J]. 作物学报,2003,29(1):63-68.
- [20] 张继红,陶能国,张小云,等. 三种豆科植物总 DNA 提取方法的比较[J]. 湖南农业科学,2007(2):31-33.
- [21] P. Uta, S. Zngo. Minipreparation method for isolation of DNA from plant with a high content of polyphenolics [J]. Nucleic Acid Res., 1993, 21(4):3328-3330.
- [22] 王卓伟,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):61-62,65.

(编辑:杨阳)

Comparision among Four Methods of DNA Extraction from Chinese Herbal Medicine which *Panacis majoris*

YANG Wei-ze¹, SHI Yun-dong², XU Zong-liang¹, YANG Shao-bing¹, ZHANG Jin-yu¹

(1. Institute of Medicinal Plant, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Kunming 650231, China;

2. College of resources and Environment which Yuxi Nomal School, Yuxi 653100, China)

ABSTRACT: **Objective** To get the high quality and high yield of total DNA from *Panacis majoris*. **Methods** Used the methods CTAB, improved CTAB, SDS and high salt low PH extraction the total DNA, The quality of the DNA was examined with spectrophotometer and agarose gel electrophoresis. **Results** The results showed that the highest yield was CTAB, productive rate is 149. 533ng/g, the best quality is improved CTAB, OD260/OD280 IS 1. 796. **Conclusion** The total DNA from the four extraction methods, all can used the SSR marker, the best effect was improved CTAB and the SDS.

KEY WORDS: *Panacis majoris*; DNA extraction; SSR amplification