

白雪嵩,赵昶灵,陈中坚,等. 5 种提取三七基因组 DNA 方法的比较[J]. 江苏农业科学,2014,42(5):54-56.

5 种提取三七基因组 DNA 方法的比较

白雪嵩¹, 赵昶灵¹, 陈中坚², 翁晨¹, 王文亚¹

(1. 云南农业大学农学与生物技术学院, 云南昆明 650201; 2. 云南省文山州苗乡三七实业有限公司, 云南文山 663000)

摘要:用高盐低 pH 值法、尿素法、CTAB(十六烷基三甲基溴化铵)法、SDS(十二烷基磺酸钠)法、PVP(聚乙烯吡咯烷酮)法提取一年生三七叶的基因组 DNA,用紫外分光光度法测定提取的 DNA 浓度,用琼脂糖凝胶电泳法测定提取的 DNA 质量。结果表明:用 CTAB 法提取的基因组 DNA 含量、得率最高,分别为 41.434 3 ~ 43.233 6 $\mu\text{g/mL}$ 、114.829 5 ~ 127.282 4 $\mu\text{g/g}$,且 $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 均在标准值范围内, $D_{260\text{ nm}}/D_{230\text{ nm}}$ 小于 1.9,有 RNA 污染;SDS 法、PVP 法、尿素法也可以提取基因组 DNA,但含量较低;高盐低 pH 值法提取的 DNA 浓度最低,电泳图基本看不到明显条带。将这 5 种方法进行对比,最终确定 CTAB 法为三七基因组 DNA 的最佳提取方法。

关键词:三七;基因组 DNA;提取方法;比较

中图分类号: S567.23⁺6.01 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)05-0054-03

三七(*Panax notoginseng*)别称田七、金不换,为五加科人参属植物,《本草纲目拾遗》中记载:“人参补气第一,三七补血第一,味同而功亦等,故称人参三七,为中药之最珍贵者”,可见三七是一种重要而名贵的药材^[1],扬名中外的中成药“云南白药”和“片仔癀”即以三七为主要原料制成。三七味甘、微苦,性温,归肝、肾经,具有止血、散瘀、消肿、止痛等功效。三七的分布范围狭窄,仅分布于 23°30'N 附近的中、高海拔地区^[2],中国的三七主产于云南西南的山区,云南省文山州现在被定为三七的原产地和主产地。三七的栽培条件甚为苛刻,性喜温凉,一般多栽培于年相对湿度较大的半山区缓坡地上,忌阳光直射,需透光率为 15% 的人工阴棚才可正常生长,宜在海拔 1 500 m 左右的地区种植^[3]。

植物基因组 DNA 的提取方法具有特殊性,提取难易程度各不相同,主要影响因素有以下几点:(1)取材种类。不同植物 DNA 的最佳提取方法不同,如棉花的最佳提取方法是 CTAB(十六烷基三甲基溴化铵)法^[4],茴香的最佳提取方法是 SDS(十二烷基磺酸钠)法^[5]。(2)取材部位。已有研究表明,果树基因组 DNA 提取所需的材料可以是嫩叶、成熟叶、幼嫩果实、韧皮部及形成层组织等^[6];郭金英等对桃基因组 DNA 的提取方法及部位进行比较研究发现,从嫩叶和幼嫩果实中提取的 DNA 产率较高^[7],因此用一般植物的嫩叶可以提取出较高含量的基因组 DNA。(3)取材时间。吴少华等在对木奈基因组 DNA 的提取研究中发现,老叶提取的 DNA 含量和质量都不如幼叶^[8];沈向等认为,3 月采集的植物幼叶中提取的 DNA 质量比 9 月的高^[9];彭建营等提出,取样时间对所提基因组 DNA 的质量无影响^[10],但与产量有关,以旺盛生长期的幼叶或嫩梢尖最佳^[6]。

作为子遗植物,三七中含有大量的酚类和黄酮类物质,因此提取三七的基因组 DNA 具有一定难度,然而在三七的生理生化、分子生物学研究中均需要提取基因组 DNA,因此开展三七基因组 DNA 的提取研究具有重要意义。目前,尚无三七基因组 DNA 提取方法的研究报道,本试验研究了 5 种提取三七基因组 DNA 的方法,以期对三七的科学贮藏及其基因组 DNA 的快速、有效提取提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验所用的三七叶均采自云南省砚山县苗乡三七实业有限公司科技园的苗圃(104.322 5°E,23.530 2°N)。于 2013 年 7 月 13 日 16:35 从株高(10.475 ± 2.008)cm、株间距(5.670 ± 1.382)cm、种植密度(423.200 ± 15.296)m² 的三七试验地中按“1 株 1 叶”的原则均匀采集一年生的三七叶,小心装入纱布采样袋中直至装满。系好标签牌并标注采集的编号、样品名称和时间,然后小心放入液氮中保存。

将液氮中保存的三七叶样品于实验室中进行后续处理。以“后放入先取出”的顺序取出纱布采样袋,先将采样袋拉至液氮罐口,等采样袋不再往下滴落大量液氮时迅速转移至试验台上,在台上垫上 1 层厚纸板,用硬物将袋中的三七幼叶迅速趁脆打碎至粉状,然后将采样袋中的碎样转移入 50 mL 离心管中,标记好样品名称和时间,置于 -80 °C 超低温冰箱保存备用。重复上述步骤,处理全部样品。试验时所需的叶片再用液氮进行更细致的研磨。

1.2 试验试剂

高盐低 pH 值法提取缓冲液:100 mmol/L NaAc,50 mmol/L EDTA(乙二胺四乙酸),500 mmol/L NaCl,2.5% PVP(聚乙烯吡咯烷酮),10 mmol/L β -ME(β -巯基乙醇),调节 pH 值至 5.5。

尿素法提取缓冲液:8 mmol/L CO(NH₂)₂(脲),0.5 mol/L NaCl,50 mmol/L Tris(pH 值 8.0),20 mmol/L EDTA,10 mmol/L β -ME,2% PVP。

CTAB 法提取缓冲液:50 mmol/L Tris(pH 值 8.0),

收稿日期:2013-09-16

基金项目:国家自然科学基金(编号:31060045,31260091)。

作者简介:白雪嵩(1989—),女,黑龙江鸡西人,硕士研究生,从事植物生理生化和分子生物学研究。E-mail:baobeiyiyi1225@126.com。

通信作者:赵昶灵,男,博士,教授,从事植物生理生化和分子生物学研究工作。E-mail:zhaoplumblossom7@163.com。

0.7 mol/L NaCl, 10 mmol/L EDTA (pH 值 8.0), 20 mmol/L β -ME, 1% CTAB。

SDS 法提取缓冲液: 500 mmol/L NaCl, 500 mmol/L Tris (pH 值 8.0), 50 mmol/L EDTA (pH 值 8.0), 10 mmol/L β -ME。

PVP 法提取缓冲液: 250 mmol/L NaCl, 25 mmol/L EDTA, 0.5% SDS, 20 mmol/L Tris (pH 值 8.0)。

其他试剂: 50 \times TAE 缓冲液; 2.5 mol/L KAc, 7.5 mol/L NH_4Ac , 10% SDS, CHCl_3 : $\text{C}_5\text{H}_{12}\text{O}$ (24:1), 无水 $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, $(\text{CH}_3)_2\text{CHOH}$, 70% $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, 无菌水。

1.3 试验仪器

UV-1601 紫外-可见分光光度计, DHG-9070A 型电热恒温鼓风干燥箱, THERMO 冷冻高速离心机, BIO-RAD 核酸蛋白仪, 电热式压力蒸汽灭菌器, SANYO 制冰机, MILLIPORE 反渗透纯水系统, DYY-12 型电泳仪, SYNGENE 凝胶成像分析系统, 电子天平, 微波炉, 多头磁力加热搅拌器, 数显恒温水浴锅, 中科美菱-80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱, 伊莱克斯-20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱。

1.4 试验方法

1.4.1 基因组 DNA 的提取 在进行试验前, 先将试验用的研钵、烧杯、玻璃棒、溶液进行高压灭菌。用高盐低 pH 值法、尿素法、CTAB 法、SDS 法和 PVP 法提取三七叶基因组 DNA^[5]: 取 0.2 g 样品, 加入液氮并将样品研磨成粉末, 再加入 900 μL 相应的提取缓冲液; 抽提用 CHCl_3 : $\text{C}_5\text{H}_{12}\text{O}$ (24:1); 省去了 RNase。

1.4.2 浓度、纯度及得率检测 取 50 μL 原液, 加无菌水至 3 mL 以稀释 60 倍, 混匀后用分光光度计在波长 230、260、

280 nm 处测定 DNA 的吸光度, 计算 DNA 浓度:

$$\text{DNA 浓度} (\mu\text{g/mL}) = D_{260\text{ nm}} / 0.02 \times L \times \text{稀释倍数} = D_{260\text{ nm}} \times 50 \mu\text{g/mL} \times \text{稀释倍数}。$$

式中: L 为比色皿光径, 1 cm; $D_{260\text{ nm}}$ 为 260 nm 波长处的吸光度; 0.02 为 1 mL 溶液内含 1 μg DNA 钠盐时的吸光度,

$$\text{DNA 得率} (\mu\text{g/g}) = \text{DNA 浓度} (\mu\text{g/mL}) \times \text{提取的 DNA 体积} (\text{mL}) / \text{材料质量} (\text{g})^{[11]}。$$

1.4.3 琼脂糖凝胶电泳 称取 0.6 g 琼脂糖于 100 mL 锥形瓶中, 加入 100 mL 1 \times TAE 稀释缓冲液, 用保鲜膜封口以避免水蒸气过度散失, 在保鲜膜上用枪头扎个小孔, 使得加热过程中可以放出少量水汽, 以免瓶内压力过大; 放入微波炉里加热约 1~2 min 至琼脂糖全部熔化, 液体变透明, 取出摇匀即得 0.6% 琼脂糖凝胶液。待胶冷却到 60 $^{\circ}\text{C}$ 左右, 加入 5 μL DNA 染料 Goldview 混匀, 倒入 14 cm \times 6 cm 的胶板中, 插入梳子, 凝固成胶 (胶厚度不超过 0.5 cm), 将制好的胶放入电泳槽中点样。

分别取 6 μL DNA 样品、4 μL 6 \times Loading Buffer 混匀, 在 0.6% 琼脂糖凝胶上上样, 在 1 \times TAE 电泳缓冲液中, 8 V/cm 电压下电泳 1 h, 电泳结束后, 在凝胶成像系统上观察并拍照。

2 结果与分析

2.1 浓度、纯度及得率

由表 1 可以看出, CTAB 法提取的 DNA 浓度、得率最高, DNA 得率在 114.829 5~127.282 4 $\mu\text{g/g}$; 其次依次是 SDS 法、PVP 法、尿素法、高盐低 pH 值法, 其中最低的 DNA 得率在 20 $\mu\text{g/g}$ 左右。

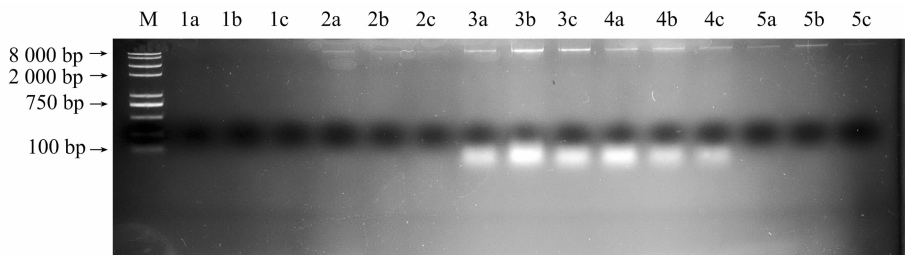
表 1 紫外分光光度法检测提取三七基因组 DNA 纯度比较

方法	重复	叶粉鲜质量 (g)	$D_{230\text{ nm}}$	$D_{260\text{ nm}}$	$D_{280\text{ nm}}$	$D_{260\text{ nm}}/D_{230\text{ nm}}$	$D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$	DNA 浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	DNA 得率 ($\mu\text{g/g}$)
高盐低 pH 值法	1	0.218 8	0.082	0.151	0.085	1.841 4	1.776 5	7.536 3	20.666 3
	2	0.203 9	0.078	0.148	0.089	1.897 4	1.662 9	7.386 5	21.735 7
	3	0.217 2	0.086	0.156	0.094	1.813 9	1.659 5	7.785 8	21.507 7
$\bar{x} \pm s$									21.303 2 \pm 0.459 9
尿素法	1	0.200 9	0.314	0.596	0.368	1.898 1	1.619 4	29.779 7	88.938 9
	2	0.215 3	0.233	0.393	0.235	1.686 7	1.672 5	19.627 2	54.697 3
	3	0.220 2	0.177	0.325	0.183	1.836 2	1.776 0	16.265 5	44.320 2
$\bar{x} \pm s$									62.652 1 \pm 19.064 2
CTAB 法	1	0.216 5	0.466	0.829	0.484	1.779 0	1.712 8	41.434 3	114.829 5
	2	0.203 8	0.473	0.865	0.493	1.828 8	1.754 6	43.233 6	127.282 4
	3	0.209 4	0.481	0.847	0.498	1.760 9	1.700 8	42.333 9	121.300 6
$\bar{x} \pm s$									121.137 5 \pm 5.085 2
SDS 法	1	0.211 7	0.407	0.782	0.451	1.921 4	1.733 9	39.085 2	110.775 2
	2	0.208 1	0.421	0.779	0.456	1.850 4	1.708 3	38.935 2	112.259 1
	3	0.206 0	0.397	0.711	0.392	1.790 9	1.813 8	35.536 5	103.504 4
$\bar{x} \pm s$									108.846 2 \pm 3.825 5
PVP 法	1	0.202 9	0.329	0.593	0.344	1.802 4	1.778 3	29.673 0	87.746 7
	2	0.209 1	0.388	0.788	0.465	2.030 9	1.694 6	39.385 1	113.013 2
	3	0.210 7	0.348	0.577	0.322	1.658 0	1.791 9	28.837 7	82.119 7
$\bar{x} \pm s$									94.293 2 \pm 13.534 9

因为 DNA 在紫外区有强吸收, 最大吸收波长为 260 nm, 而蛋白质在 280 nm 波长处有强吸收, 因此可以根据 $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 大致判断出 DNA 的纯度。纯 DNA 样品的 $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 应为 1.8 或在 1.7~1.9 之间; 如果 $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 值大于 1.9,

表明有 RNA 污染; $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 小于 1.6, 表明样品中存在蛋白质或酚污染; 如果 DNA 中含有蛋白质, 则 $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 小于 1.7; 如果含有 RNA, 则 $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 大于 2.0^[11]。由表 1 可以看出, CTAB 法、SDS 法和 PVP 法提取的三七基因组 DNA

的 $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 均在 1.7~1.9 之间或十分接近,属于标准范围,表明提取所得的 DNA 较纯;高盐低 pH 值法、尿素法提取的三七基因组 DNA 中分别只有 1 个重复在 1.7~1.9 之间,其余的均在 1.6 左右,说明所提取的 DNA 不是很纯。 $D_{260\text{ nm}}/D_{230\text{ nm}}$ 应大于 2.0,如果 $D_{260\text{ nm}}/D_{230\text{ nm}}$ 值小于 2.0,表明溶液中有残存的盐和小分子杂质,如核苷酸、氨基酸、酚等。5 种方法提取的 DNA 的 $D_{260\text{ nm}}/D_{230\text{ nm}}$ 几乎均小于 2.0 (除 PVP 法的重复 2),说明有残存盐和小分子杂质污染,如核苷酸、氨基酸、酚等。



M—marker; 1—高盐低pH值法; 2—尿素法; 3—CTAB法; 4—SDS法; 5—PVP法 (a、b、c为3组重复)

图1 一年生三七叶基因组DNA 琼脂糖凝胶电泳图示

3 结论与讨论

用5种不同提取方法均能提取出基因组DNA,但浓度和得率有些差别,从高到低依次是CTAB法>SDS法>PVP法>尿素法>高盐低pH值法。5种方法的 $D_{260\text{ nm}}/D_{230\text{ nm}}$ (除PVP法的处理2)均小于2.0,说明有残存盐和小分子杂质污染,如核苷酸、氨基酸、酚等。高盐低pH值法的重复2、重复3,尿素法的重复1、重复2,PVP法的重复2的 $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 均不在1.7~1.9之间,但也不小于1.6,说明只是略有杂质污染。本试验较陈莉等用CTAB法和SDS法提取的三七DNA的浓度和得率^[12]高,可能是由采摘地点和时间差异造成的。

获得高质量的DNA样品是对相应的试验材料进行分子生物学研究的关键性步骤,也对探索适合某种特定研究材料的DNA提取途径具有重要意义。影响DNA提取质量的因素很多,主要是多糖、酚类、蛋白质、RNA等,因此提取纯化植物DNA的关键就在于如何高效简便地去除多糖、多酚、蛋白质、RNA等物质。目前,国内外已有一些相关的报道,如多糖的污染是提取植物DNA时常遇到的一个棘手问题^[13~15],可采用的方法有:加入高浓度的KAc;在1.0~2.5 mol/L NaCl的高盐TE缓冲液中用无水乙醇沉淀DNA;沉淀DNA时,将NaCl的浓度提高至2.5 mol/L;将DNA沉淀重悬于30%乙醇中,于4℃放置过夜,离心后取上清液,加无水乙醇至乙醇浓度为80%,重新沉淀DNA;在裂解细胞前用不含CTAB的提取缓冲液去除细胞质中大多数生化成分,排除多酚类等杂质干扰;先用水饱和乙醚及1.2~1.5 mol/L NaCl溶液去除大部分多糖,再用2倍乙醇沉淀DNA,去除沉淀^[16]。

本研究对三七幼叶DNA的提取方法进行了探索和改进,采用常用的提取植物基因组DNA的CTAB法和SDS法,以及高盐低pH值法、尿素法和PVP法提取三七幼叶基因组DNA,这5种方法对核苷酸、氨基酸、酚等小分子杂质及蛋白质的去除效果都较好,但CTAB法提取的DNA质量和产量更佳,各项指标明显好于其他4种方法。

2.2 琼脂糖凝胶电泳检测结果

电泳检测结果与紫外分光光度法检测结果基本一致。由图1可以看出,除了高盐低pH值法提取的DNA浓度无明显特征带外,其余4种方法均呈现出或明或暗的条带,其中CTAB法提取的DNA条带最亮,其次是SDS法,尿素法和PVP法提取的DNA条带较暗。但是CTAB法和SDS法提取DNA的 $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 没有达到标准的1.8,表明有RNA污染,最可能的原因是没有进行RNase处理。

参考文献:

- [1] 黄福量. 三七的正伪品鉴别[J]. 医药前沿, 2012, 2(17): 321.
- [2] 李晓琳, 邵爱娟, 陈敏, 等. 三七种子研究进展[J]. 种子, 2011, 30(7): 63-65.
- [3] 王振峰, 高云涛, 张文斌, 等. 不同生长年限三七中总皂苷含量的变化特征[J]. 安徽农业科学, 2012, 40(15): 8458-8459, 8463.
- [4] 曲延英, 张强, 孔祥祯, 等. 4种快速提取棉花总DNA方法的比较[J]. 新疆农业大学学报, 1999, 22(4): 320-322.
- [5] 李海勃. 茴香总DNA提取方法的比较研究[J]. 北方园艺, 2008(3): 189-192.
- [6] 卢华英, 刘和. 影响枣基因组DNA提取因素的探讨[J]. 北方园艺, 2007(7): 65-67.
- [7] 郭金英, 范崇辉, 王力荣, 等. 桃基因组DNA提取方法及部位的比较研究[J]. 果树学报, 2002, 19(3): 205-207.
- [8] 吴少华, 张大生, 潘东明, 等. 木奈基因组DNA的提取及RAPD条件优化[J]. 福建农林大学学报: 自然科学版, 2002, 31(1): 51-54.
- [9] 沈向, 郑学勤, 任小林, 等. 核果类基因组DNA提取和RAPD条件优选[J]. 山东农业大学学报, 1999, 30(2): 58-64.
- [10] 彭建营, 束怀瑞, 彭士琪. 一种适合枣和酸枣基因组DNA的提取方法[J]. 河北农业大学学报, 2000, 23(4): 46-48, 52.
- [11] 吉日本图, 李军乔. 不同方法提取青藏高原原麻总DNA的比较研究[J]. 北方园艺, 2011(6): 152-154.
- [12] 陈莉, 魏莉, 周童, 等. 几种中药DNA提取方法的比较研究[J]. 广西植物, 2007, 27(1): 137-139, 136.
- [13] 徐志祥, 程度, 李宝健. 灰树花总DNA的制备及基因组文库的构建[J]. 遗传, 2004, 26(5): 711-713.
- [14] 陈大明, 张上隆, 金勇丰. 一种木本果树基因组DNA提取方法研究[J]. 浙江农业大学学报, 1997, 23(6): 13-16.
- [15] 程运江, 伊华林, 庞晓明, 等. 几种木本果树DNA的有效提取[J]. 华中农业大学学报, 2001, 20(5): 481-483.
- [16] 罗应怡, 李良波, 卢家仕, 等. 4种提取牛大力基因组DNA方法的比较研究[J]. 湖南农业科学, 2013(5): 4-6.