

刘丽华,杜建梅,冯宝珍. 中药材景天三七 DNA 提取方法的比较分析[J]. 江苏农业科学,2014,42(12):47-49.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2014.12.013

# 中药材景天三七 DNA 提取方法的比较分析

刘丽华<sup>1</sup>,杜建梅<sup>2</sup>,冯宝珍<sup>1</sup>

(1. 运城学院生命科学系,山西运城,044000; 2. 南京师范大学生命科学学院,江苏南京 210023)

**摘要:**以景天三七药材为材料,分别采用改良 CTAB 法、SDS 法、高盐低 pH 法对其 DNA 进行提取并检测,旨在建立一种适合中药材景天三七的 DNA 提取方法。结果表明,改良 CTAB 法提取的 DNA 浓度为 290  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,电泳条带最亮,无拖尾现象,在浓度和纯度方面均优于其他 2 种方法,并可用于 ISSR-PCR 扩增,改良 CTAB 法是中药材景天三七 DNA 提取的最佳方法。

**关键词:**中药材;景天三七;DNA 提取;改良 CTAB 法;SDS 法;高盐低 pH 法

**中图分类号:** S567.23<sup>+</sup>6.01 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)12-0047-03

目前,分子生物学技术在中药材研究中广泛应用,如药用植物的亲缘与进化关系、种质鉴定、分类和提取<sup>[1-3]</sup>等,而 DNA 的分离纯化是中药材分子生物学研究的基础。但商品药材经过干燥、加工、贮藏等过程,DNA 会出现不同程度的降解;同时,由于中药材中的小分子次生物质,如有机酸、萜类、香豆素、鞣质、黄酮等含酚羟基化合物,氧化后容易与 DNA 结合,引起 DNA 降解,而其中存在的多糖由于与 DNA 同属于大分子化合物,在一般提取过程中很难完全去除,因此,针对不同药材进行 DNA 提取方法的探索是有必要的。所以,本研究以市售景天三七(*Sedum aizoon* L.)干品药材和新鲜嫩叶为材料,采用改良 CTAB 法、SDS 法、高盐低 pH 法提取干品景天三七 DNA,并对 3 种提取结果进行比较分析,选出适合中药材景天三七的简便、快速、高纯度的 DNA 提取方法,为中药材景天三七的遗传多样性、种质鉴定等分子水平的研究提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

中药材景天三七购自同仁堂药店,嫩叶取自运城学院栽种的中草药景天三七。

### 1.2 试剂

CTAB、SDS、PVP、NaCl、Tris-HCl (pH 值 8.0)、EDTA、KAc、Tris 饱和酚、 $\beta$ -巯基乙醇、异戊醇、异丙醇购自北京拜耳迪生物技术有限公司,RNase、Primer UBC891、*Taq* 聚合酶等试剂均购自上海生工生物工程有限公司。

### 1.3 DNA 提取方法

**1.3.1 改良 CTAB 法** 材料加入液氮充分研磨后转入离心管,加入 65  $^{\circ}\text{C}$  预热的 CTAB 缓冲液,2  $\mu\text{L}$   $\beta$ -巯基乙醇,充分混匀;65  $^{\circ}\text{C}$  温浴 30~45 min,12 000 r/min 4  $^{\circ}\text{C}$  离心 10 min;上清液加入等体积酚:三氯甲烷:异戊醇(25:24:1)充分混匀,12 000 r/min 4  $^{\circ}\text{C}$  离心 10 min;取上清液,重复以上步骤

1~2 次,直到界面清晰为止;上清液加入等体积的三氯甲烷:异戊醇(24:1)充分混匀,12 000 r/min 4  $^{\circ}\text{C}$  离心 10 min;上清液加入 2~3 倍体积的 -20  $^{\circ}\text{C}$  预冷无水乙醇,于 -20  $^{\circ}\text{C}$  静置 30 min,沉淀用 70% 乙醇洗 2 次后加入 50  $\mu\text{L}$  TE 溶解,加入 RNase 于 37  $^{\circ}\text{C}$  温浴 1 h,4  $^{\circ}\text{C}$  保存。

**1.3.2 SDS 法** 材料加入液氮充分研磨后转入离心管,加入 65  $^{\circ}\text{C}$  预热的 SDS 缓冲液,2  $\mu\text{L}$   $\beta$ -巯基乙醇,充分混匀,65  $^{\circ}\text{C}$  温浴 30~45 min;取出冷却至室温后加入 500  $\mu\text{L}$  5 mol/L KAc,充分混匀,冰浴 20 min,12 000 r/min 离心 10 min;上清液加入等体积的三氯甲烷:异戊醇(24:1),混匀,12 000 r/min 离心 10 min;重复抽提 1 次,上清液加入 2/3 体积的 -20  $^{\circ}\text{C}$  预冷的异丙醇,混匀, -20  $^{\circ}\text{C}$  沉降 30 min,12 000 r/min 离心 10 min;上清液加入 200  $\mu\text{L}$  的 70% 乙醇和无水乙醇各洗涤沉淀 2 次,沉淀晾干后加入 30  $\mu\text{L}$  TE 溶解,加入 RNase 于 37  $^{\circ}\text{C}$  水浴锅中恒温 45 min,4  $^{\circ}\text{C}$  保存备用。

**1.3.3 高盐低 pH 法** 材料加入液氮充分研磨后转入离心管,加入 56  $^{\circ}\text{C}$  预热的 2% SDS 缓冲液,2  $\mu\text{L}$   $\beta$ -巯基乙醇,充分混匀,56  $^{\circ}\text{C}$  温浴 30 min,12 000 r/min 4  $^{\circ}\text{C}$  离心 10 min;上清液加入等体积的三氯甲烷:异戊醇(24:1),充分混匀,12 000 r/min 4  $^{\circ}\text{C}$  离心 10 min;上清液加入 1 倍体积的异丙醇,12 000 r/min 离心 15 min;沉淀的 DNA 用 70% 乙醇洗 2 次,晾干后加入 50  $\mu\text{L}$  TE,加入 RNase 于 37  $^{\circ}\text{C}$  温浴 1 h,4  $^{\circ}\text{C}$  保存。

### 1.4 DNA 质量检验

**1.4.1 紫外检测** 将所得 DNA 提取液稀释 100 倍后,用 UV1102 紫外分光光度计分别测定 230 nm、260 nm 及 280 nm 处的吸光度。根据  $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$  值判断 DNA 纯度,以  $D_{260\text{ nm}}$  的值计算 DNA 浓度。

**1.4.2 琼脂糖凝胶电泳检测** 将所得 DNA 于 1% 琼脂糖凝胶中进行电泳,在 GelDoc2000 凝胶系统下观察、拍照。

**1.4.3 PCR 扩增检测** 以改良 CTAB 法提取的 DNA 为模板,用 ISSR 引物 UBC891 进行 PCR 扩增。25  $\mu\text{L}$  反应体系中,含 30~50 ng 模板 DNA,1.5 U *Taq* 酶,1  $\times$  PCR 缓冲液,2.5 mmol/L  $\text{MgCl}_2$ ,4 种 dNTPs 各 150  $\mu\text{mol/L}$ ,0.5  $\mu\text{mol/L}$  引物,加水至 25  $\mu\text{L}$ 。扩增产物以 1.2% 琼脂糖凝胶电泳,

收稿日期:2014-03-13

基金项目:运城学院博士科研启动基金(编号:YQ-2012015)。

作者简介:刘丽华(1980—),女,河北沧州人,博士,讲师,研究方向为药用植物分子生物学。E-mail:liulihua0203@163.com。

GelDoc2000 凝胶成像分析系统拍照、分析。

2 结果与分析

2.1 紫外检测

景天三七含有较多的糖类、鞣质、生物碱、黄酮类等化合物,DNA 提取过程中如不能很好地除去这些化合物,会导致分离出的 DNA 因结合了这些化合物而呈棕褐色,而不能用于 PCR 扩增、酶切等分子生物学研究。本试验采用的上述 3 种方法所得 DNA 溶液都为浅黄色,说明这 3 种方法能有效地去除细胞内杂质,抑制次生代谢物与 DNA 结合。

采用 3 种方法提取的景天三七中药全草及新鲜嫩片 DNA 溶液,分别用紫外分光光度计进行纯度及浓度的检测,试验结果见表 1、表 2。

由表 1 可知:改良 CTAB 法和高盐低 pH 法提取的中药材景天三七基因组 DNA  $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$  值分别为 1.75 和 1.76,纯度都较高,而改良 CTAB 法提取的 DNA 浓度更高;SDS 法提取的 DNA 纯度稍低,其  $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$  值为 1.72,也接近 1.8。表明这 3 种方法均可以提取到纯度较好的 DNA,改良 CTAB 法提取的 DNA 浓度最高。

表 1 中药材景天三七基因组 DNA 提取纯度及浓度

提取方法	重复	$D_{260\text{ nm}}$	$D_{280\text{ nm}}$	$D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$	DNA 浓度 ( $\mu\text{g/mL}$ )
CTAB 法	1	0.056	0.032	1.73	280
	2	0.06	0.034	1.78	300
	3	0.058	0.033	1.75	290
	平均	0.058	0.033	1.75	290
SDS 法	1	0.042	0.024	1.72	210
	2	0.039	0.023	1.69	195
	3	0.043	0.025	1.74	215
	平均	0.041	0.024	1.72	207
高盐低 pH 法	1	0.036	0.021	1.70	180
	2	0.038	0.021	1.78	190
	3	0.037	0.020	1.79	185
	平均	0.037	0.021	1.76	185

由表 2 可知:用 3 种方法提取景天三七新鲜叶片总 DNA 效果不同,其中 CTAB 法提取景天三七新鲜叶片基因组 DNA  $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$  在 1.8~2.0 之间,表明 DNA 中蛋白质、酚类、色

表 2 景天三七嫩叶基因组 DNA 提取纯度及浓度

提取方法	重复	$D_{260\text{ nm}}$	$D_{280\text{ nm}}$	$D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$	DNA 浓度 ( $\mu\text{g/mL}$ )
CTAB 法	1	0.064	0.033	1.90	318
	2	0.061	0.031	1.95	306
	3	0.062	0.032	1.89	309
	平均	0.062	0.032	1.91	311
SDS 法	1	0.143	0.080	1.78	716
	2	0.139	0.082	1.70	698
	3	0.142	0.084	1.69	709
	平均	0.141	0.082	1.72	708
高盐低 pH 法	1	0.091	0.054	1.68	458
	2	0.090	0.052	1.72	452
	3	0.095	0.054	1.75	475
	平均	0.092	0.053	1.72	462

素等杂质含量较少,DNA 质量符合分子生物学研究要求。SDS 法和高盐低 pH 法提取景天三七新鲜叶片基因组 DNA  $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$  均小于 1.8。比较 3 种方法提取景天三七新鲜叶片 DNA 的浓度,CTAB 法提取 DNA 平均浓度为 311  $\mu\text{g/mL}$ ,SDS 法为 708  $\mu\text{g/mL}$ ,高盐低 pH 法为 462  $\mu\text{g/mL}$ 。由此可见,3 种方法中,CTAB 法提取 DNA 纯度最高,而 SDS 法提取 DNA 浓度最高。

2.2 电泳检测

采用 3 种方法提取的中药材景天三七 DNA,经琼脂糖凝胶电泳检测所得的结果见图 1。由图 1 可知:3 种方法所提中药材景天三七 DNA 完整性好,电泳条带在溴酚蓝位置均明显发亮,说明所得 DNA 有较严重 RNA 污染;DNA 条带稍有拖尾,说明 DNA 有轻微降解,这是中药材 DNA 提取中普遍存在的问题。3 种提取方法中,CTAB 法提取的 DNA 电泳条带最整齐明亮,说明 DNA 完整,此结果与紫外检测结果一致。

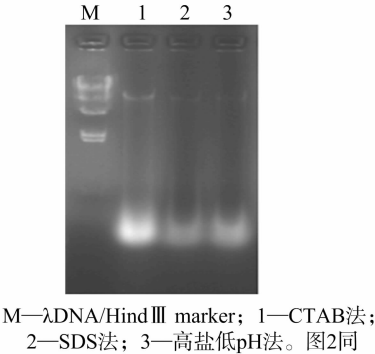


图1 景天三七药材 DNA 电泳图

采用 3 种方法提取景天三七嫩叶 DNA,经琼脂糖凝胶电泳检测所得结果见图 2。由图 2 可知:SDS 法提取 DNA 条带最亮,高盐低 pH 法次之,改良 CTAB 法提取 DNA 条带较高盐低 pH 法稍暗,说明 3 种方法中 SDS 法所提 DNA 浓度最高,高盐低 pH 法次之,CTAB 法最低。SDS 法和高盐低 pH 法提取 DNA 点样孔处明显发亮,说明该 DNA 样品中可能含有未被去除的多糖、蛋白质及一些其他次生代谢产物,由于这些物质具有粘连性,易与 DNA 结合成复合物,致使 DNA 分子电泳速度比较慢,从电泳图谱也可看出,这 2 种方法提取的 DNA 条带电泳距离短于 CTAB 法提取的 DNA 条带。CTAB 法点样孔处仅有微亮出现,说明蛋白质、多糖杂质去除效果较好,所提 DNA 较前 2 种方法纯度高,该结果与紫外检测结果一致。

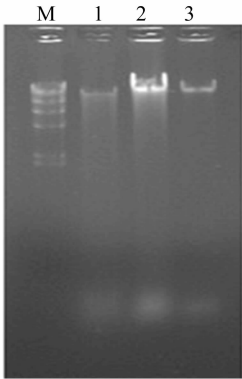
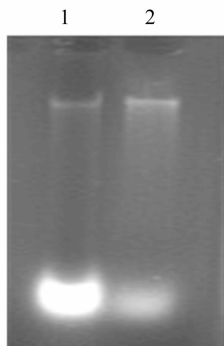


图2 景天三七嫩叶DNA电泳图

### 2.3 CTAB 法提取不同材料 DNA 电泳分析

据以上试验结果,可见 CTAB 法是景天三七药材 DNA 和新鲜嫩叶 DNA 提取的最佳方法,并采用 CTAB 法提取这 2 种材料 DNA 作进一步比较,经琼脂糖凝胶电泳检测,结果见图 3。由图 3 可知:2 种试验材料所得 DNA 条带在亮度上无明显差别,新鲜嫩叶所得 DNA 条带稍亮于中药材;用新鲜叶片提取的 DNA 稍有降解,且在溴酚蓝位置处发亮,说明嫩叶提取 DNA 在操作过程中更易降解,且有 RNA 杂质;用中药材提取的 DNA 也有轻微降解和较多的 RNA 污染。由该图可以看出,采用 CTAB 法提取景天三七中药材和其新鲜嫩叶 DNA 在得率上无明显区别,此结果和紫外检测结果一致,新鲜叶片提取 DNA 平均浓度为 311  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,中药材提取 DNA 平均浓度为 290  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,可进一步说明 CTAB 法适合景天三七中药材和新鲜嫩叶 DNA 的提取。

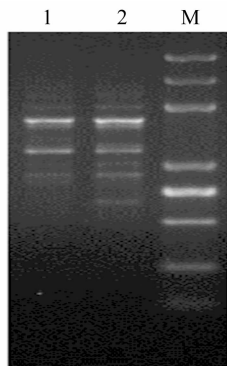


1—中药材; 2—新鲜嫩叶

图3 CTAB法提取不同材料电泳图

### 2.4 景天三七基因组 DNA 的 ISSR 扩增

以改良 CTAB 法提取的景天三七不同材料 DNA 为模板,用引物 UBC891 进行 ISSR 扩增,扩增图谱如图 4 所示。景天三七干燥药材和新鲜嫩叶均可扩增出多条清晰条带,且试验重复性好,表明以改良 CTAB 法所提取的景天三七 DNA 质量完全能够满足后续的 PCR 扩增反应,可用于 ISSR 分子标记。



M—DL5000 DNA marker; 1—中药材; 2—新鲜嫩叶

图4 景天三七基因组 DNA 的 ISSR 扩增图

## 3 讨论与结论

高质量的 DNA 是进行分子生物学研究的基础<sup>[4-6]</sup>,但从

中药材中获取 DNA 存在较大困难。因为中药材的加工炮制、贮藏过程都会对 DNA 造成一定的破坏,而且中药材一般都储存了较长时间,DNA 存在不同程度的降解。此外,中药材含多糖、多酚以及其他次生物质较多,它们会和蛋白质及核酸结合,进而影响后续的分子生物学研究。因此,对不同中药材 DNA 提取方法进行研究很有必要。目前,在一些中药材 DNA 提取中已取得了很好的效果,如柴胡<sup>[7]</sup>、玉竹<sup>[8]</sup>、贝母<sup>[9]</sup>、肉桂<sup>[10]</sup>、陈皮<sup>[11]</sup>、牡丹皮<sup>[12]</sup>、蒲公英<sup>[13]</sup>等。

中药材景天三七为干燥全草,含多糖、色素和多酚类物质比较多,常规提取方法易氧化而使 DNA 呈褐色。本试验在改良 CTAB 法提取过程中参考前人的研究结果,加入 PVP 与景天三七共同研磨,阻止多糖、多酚氧化物等与 DNA 结合。为了能有效防止氧化、褐变,在提取缓冲液中加入 2% PVP 和  $\beta$ -巯基乙醇。此外,对于景天三七药材,液氮研磨比石英砂研磨能更好地破碎细胞,更有利于 DNA 的提取。

本研究中采取了 3 种方法提取景天三七药材 DNA,紫外检测、凝胶电泳检测及 ISSR-PCR 扩增表明,改良 CTAB 法提取的 DNA 质量最好,纯度最高,能满足一般分子生物学操作要求。

### 参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 卫生部药品标准: 中药成方制剂 [S]. 2005:25.
- [2] Cai Z H, Li P, Dong T X, et al. *Fritillaria* identification method in molecular biology research [J]. Pharmaceutical University, 2000, 35 (4): 309-312.
- [3] Cao H, Bi P X, Shao P. Identification of Chinese drug "herbal elephantopus" by DNA fingerprinting using random primer PCR [J]. Herbs, 2005, 20: 643.
- [4] 连晓东, 谭彬, 郑先波, 等. 适于 SSR 分析的不同生长型桃幼叶基因组 DNA 提取方法 [J]. 江苏农业科学, 2013, 41 (5): 30-32.
- [5] 管长娟, 梁维维, 陈全家, 等. 高质提取棉花总 DNA 的方法及引物多态性应用 [J]. 江苏农业科学, 2013, 41 (1): 29-31.
- [6] 陈名红, 李玉, 刘多, 等. 利用改良 CTAB 法提取卷丹百合鳞叶基因组 DNA [J]. 江苏农业科学, 2013, 41 (3): 27-29.
- [7] 南晓洁, 郝媛媛, 赵良贵, 等. 柴胡药材干根 DNA 提取及 RAPD 分析 [J]. 中草药, 2009, 40 (3): 447-451.
- [8] 陈玉秀, 周日宝, 潘清平, 等. 玉竹基因组 DNA 的提取与分析 [J]. 西北药学杂志, 2007, 22 (4): 171-173.
- [9] 王森, 谭莹, 张丽华. 中药材贝母 DNA 不同提取方法的比较 [J]. 北华大学学报: 自然科学版, 2011, 12 (6): 662-665.
- [10] 徐虹, 章军, 郑敏, 等. 中药肉桂基因组 DNA 的提取 [J]. 中药材, 2004, 27 (5): 326-329.
- [11] 严寒静, 高晓霞, 陈晓颖. 陈皮总 DNA 提取方法的研究 [J]. 广东药学院学报, 2004, 20 (6): 592-593.
- [12] 徐纲, 于超, 赵华. 牡丹皮基因组 DNA 提取的影响因素研究 [J]. 中国药房, 2008, 19 (27): 2084-2087.
- [13] 李喜凤, 杜云锋, 张红梅, 等. 蒲公英药材总 DNA 的提取 [J]. 河南科学, 2009, 27 (6): 684-686.