

丹参干叶片的 DNA提取

郭宝林^{1,2}, 林 生^{1*}

(1. 北京中医药大学, 北京 100029; 2. 中国医学科学院 中国协和医科大学药用植物研究所, 北京 100094)

摘要:目的 以丹参干叶片为材料, 优选一种有效去除多酚类杂质的 DNA 提取方法。方法 先用 PVP-40T 与材料共研碎, 加预冷的提取缓冲液冰置, 弃去上清液, 沉淀用加 Vit C 粉末 (调 pH=6~6.5) 的 2×CTAB 抽提缓冲液提取。结果 得到的 DNA 可以很好地用于 PCR 扩增。结论 该方法适用于提取含多酚材料的 DNA。

关键词: DNA 提取法; 多酚; 丹参干叶

中图分类号: R284.2; R282.1 文献标识码: B 文章编号: 0253-2670(2002)05-0418-03

DN A extraction of dried leaves of *Salvia miltiorrhiza*

GUO Bao-lin^{1,2}, LIN Sheng¹

(1. Beijing University of TCM, Beijing 100029, China; 2. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100094, China)

Key words DN A extraction; polyphenol; dried leaves of *Salvia miltiorrhiza* Bge.

DN A 的有效提取是分子生物学研究工作的前提, 植物 DN A 提取大多使用新鲜幼嫩的材料, 野外采集时可将新鲜叶片或芽等用变色硅胶快速干燥, 防止细胞死亡过程中次生物质的释放和 DN A 的原位降解。在中药材研究过程中, 样品来源多样, 其中已经降解的 DN A 无法补救, 但去除材料中特别是老叶、老树皮、木质茎及根中所含的可能影响下一步生化反应 (如限制性酶酶切或 Taq 聚合反应) 的次生物质则是至关重要的。如何去除存在于植物药材中的多酚或多糖两类主要杂质^[1], 到目前为止, 还没有方便实用的通用有效方法。

本课题组在进行丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge. 地道性的 RAPD 研究过程中, 得到的是 40 多个丹参晒干叶片或晾干叶片, 而且许多样本是老叶, 其中的多酚类化合物含量很多, 常规方法提取到的 DN A 无法得到扩增产物, 于是按文献报道的方法进行了提取条件的摸索。

1 材料和试剂

晾干或晒干的丹参叶片, 来源: 8 河南卢氏栽培, 22, 23 山东沂南栽培, 38 河北承德栽培, 43 山西绛县栽培。参照样本: 2 四川中江栽培, 采集幼叶, 变色硅胶快速干燥。

CTAB (Amresco), SDS (Biomol), 尿素 (Amresco), Vit C (Amresco), PV P-40T (Sigma), EDT A (Amresco), β-巯基乙醇 (Merck), Tris 碱 (Gibco),

EB (Sigma), 二硫苏糖醇 (Boehringer), 亚硫酸钠 (Amresco), Taq 酶 (上海生工), 随机引物 S17, S115 (上海生工), dNTP (上海生工), BSA (华美公司), 琼脂糖 (Spanish), 其余试剂为分析纯。

基因扩增仪为 PE9600, 电泳仪为 Bio-Rad Power PAC 300。

2 方法和结果

2.1 一般方法: CTAB 法: 参照文献方法^[2], 其中 β-巯基乙醇含量为 2%。

高盐低 pH 法: 参照文献方法^[3]。

尿素法: 参照文献^[4], 取药材 30 mg, 液氮研磨成粉末, 加入提取液 (8 mol/L 尿素, 250 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 400 mmol/L NaCl, 500 mmol/L EDT A, pH 8.0, 0.5% 巯基乙醇) 600 μL, 混匀, 室温放置 5 min, 纱网过滤, 随即加入 1% SDS, 室温放置 1 h, 不断振摇, 加入 20% PVP 至终浓度为 6%, 然后加入 0.5 体积的醋酸铵, 混匀, 冰上放置 30 min, 15 °C 4 000 r/min 离心 15 min, 然后 12 000 r/min 离心 20 min, 沉淀用 86% 乙醇洗涤 1 次, 风干, 适量水溶解, 再用等体积的苯酚-氯仿-异戊醇 (50: 49: 1) 抽提, 8 000 r/min 15 °C 离心 10 min, 沉淀再用 86% 乙醇洗涤 1 次, 晾干, 适量 TE 溶解, 4 °C 放置备用。

3 种方法得到的总 DN A 都呈浅黄色至深棕色, 除 2 号样扩增良好外, 8, 22 和 23 号样只有弱扩增, 38 号样和 43 号样颜色最深, 无扩增, 提示提取液的

* 收稿日期: 2001-07-03
基金项目: 国家自然科学基金重点资助课题 (39730500)

颜色深度(含有较多多酚)与扩增结果呈明显负相关,文献报道去除多酚效果较好的高盐低 pH法不奏效

2.2 去除多酚初选方法:用 CTAB法作为基本方法,针对样本 38号和 43号,添加一些抗氧化剂,防止多酚转化为醌,与 DNA形成紧密结合,影响 Taq酶的活性

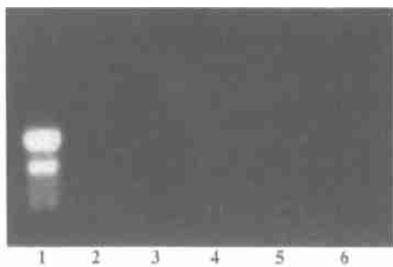
A处理:提取液中将β-巯基乙醇量增加为 4%和 6%。

B处理:提取液中加 Vit C干粉末

C处理:提取液中加亚硫酸钠干粉末

D处理:提取液中加二硫苏糖醇(DTT)干粉末

只有 B处理的 DNA提取液明显变浅,38号样有很好的扩增,43号样 DNA提取液仍呈浅棕色,无扩增,其他提取方法也无扩增(见图 1),提示添加 Vit C是有效的去除多酚的方法,但 DNA的提取量有所下降



1, 3, 5样本 38 2, 4, 6样本 43

1, 2-B处理 3, 4-C处理 5, 6-D处理

图 1 初选方法扩增结果(引物 S17)

2.3 去除多酚优选方法:仍用样本 38和 43,在 B处理的基础上进行方法优选

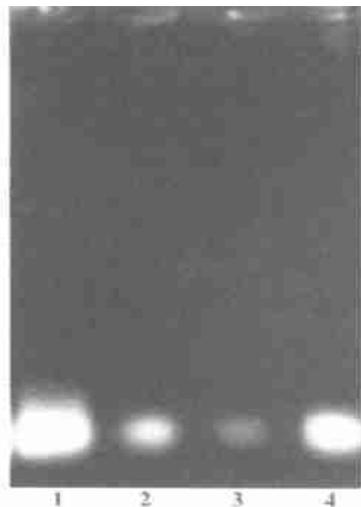
E处理:提取液中加 Vit C干粉末(30 mg, 45 mg/0.03 g干叶)

F处理:提取液中加 Vit C干粉末(30 mg/0.03 g干叶),用 3 mol/L的 NaOH调整 pH值为 6~6.5

G处理:加 PVP-40T粉末(干叶量的 10%),与干叶共同在液氮下研碎。加入 4℃预冷的提取缓冲液 I (0.25 mol/L NaCl, 0.25 mol/L Tris-HCl, 50 mmol/L EDTA, pH= 8.0),冰置 10 min, 7 000 r/min离心,倾去上清液,然后加 Vit C干粉末(30 mg/0.03 g干叶)于 2×CTAB提取液中,调 pH值为 6.0~6.5

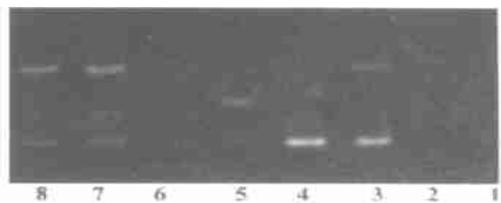
提取液中 Vit C量加大,严重影响 DNA的提取量,加至 45 mg/0.03 g干叶时,提取液检验时只能

见到少量的 RNA,而 DNA几乎没有(见图 2);调整 pH后,避免了 DNA的减少,但 43号样扩增仍不够好(见图 3);综合 PVP预洗法后,43号样品提取液变成浅黄色,扩增良好(见图 4)



1-15 mg 2-22 mg 3-30 mg 4-45 mg(加 Vit C量)

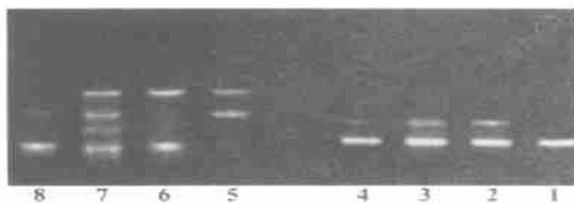
图 2 加 Vit C提取结果(样本 43)



1-4加 Vit C 22.5 mg 5-8加 Vit C 30 mg

1, 2, 5, 6为样本 43 3, 4, 7, 8为样本 38

图 3 加 Vit C扩增结果(引物 S115)



1-4引物 S17 5-8引物 S115

1, 5样本 43 2, 6样本 38 3, 7样本 23 4, 8样本 22

图 4 处理扩增结果

最佳方法用 CTAB法提取了 40多份丹参样品 DNA,有一半以上样品的 DNA溶液无色或呈浅黄色,但除四川中江的硅胶干燥幼叶片外,扩增效果很不稳定,即多数样本用某些引物扩增时表现好,而另外的引物则只有弱扩增或无扩增,或重复性不好,表明 DNA提取液虽然颜色不深,酚类化合物的影响仍存在。全部样本用 G处理提取之后,都得到了清晰的、可重复的扩增条带(见图 4)。

3 讨论

DNA提取过程中多酚类物质的去除大多采取两类手段,一类是加酚类的结合剂,如PVP(聚乙烯吡咯烷酮)、PVPP(聚乙烯聚吡咯烷酮)、PEG(聚乙二醇);另一类是加抗氧化剂,如Vit G亚硫酸钠、二硫苏糖醇、巯基乙醇、半胱氨酸等,防止酚类氧化为醌类。本实验证明将两类方法组合起来可以有效去除多酚类杂质,其中PVP和Vit C组合效果最佳。

作者对G处理去除多酚的有效性和通用性进行了考察,试验提取了厚朴*Magnolia officinalis*药材(含有较多简单酚类)、牛膝*Achyranthes bidentata*药材(含有三萜皂苷、甾酮及多糖)和干叶(含鞣质)及木通科猫儿屎*Decaisnea insignis*干叶(含有大量鞣质),并用随机引物和特异引物(扩增ITS序列)进行扩增,效果均很好,故而该方法可推荐为去除酚类杂质的有效通用方法,而且,用PVP-40T预洗的过程中也可去除多糖类杂质^[5],所以也适用于含糖的材料,但该方法对DNA提取量的影响及更广泛的样本适用性还在考察中。

本实验发现的CTAB法加G处理可推荐为通用提取方法,但使用该方法时应注意:①PVP和Vit C都以固体形式加入最好,不能事先配成储存液,否则会与空气中的氧作用而失去效果。②丹参DNA提取时PVP和Vit C使用量分别为0.1g/g和1g/g(干材料),如果效果不好,二者可加倍量使用。③PVP与样本共研后,要用预冷清洗液,并冰置一段时间,也是防止氧化的手段。④加Vit C后溶液的pH值会下降至4~5,这样的条件下,CTAB提取效果不佳,必须将提取缓冲液的pH值调至近中性6~6.5。

参考文献:

- [1] 郭宝林,李家实,阎玉凝. 中药材DNA分子标记研究的技术问题I. 植物药基因组DNA的提取[J]. 中草药, 2000, 31(12): 951.
- [2] 顾红雅,瞿礼嘉,明小天,等. 植物基因和分子操作[M]. 北京: 北京大学出版社, 1995.
- [3] 邹喻苹,汪小全,雷一丁,等. 几种濒危植物及其近缘类群总DNA的提取和鉴定[J]. 植物学报, 1994, 36(7): 528-532.
- [4] Tan S-L, Dossett M, Katze M G. Extraction of genomic DNA suitable for PCR analysis from dried plant rhizomes/roots[J]. Bio Tech, 1998, 25(5): 796-801.
- [5] 邹喻苹,葛颂,王晓东. 系统与进化植物学中的分子标记[M]. 北京: 科学出版社, 2001.

薄层扫描法测定烟叶中茄呢醇的含量

李烈¹,马振元²,钱秋霞,丛晓东^{2*}

(1. 中国药科大学,江苏 南京 210038; 2. 山东省天然药物工程技术中心,山东 烟台 210405)

茄呢醇(solanescol, 3, 7, 11, 15, 19, 23, 27, 31, 35-九甲基-2, 6, 10, 14, 18, 22, 26, 30, 34-三十六烷九烯-1醇)是茄科植物烟草*Nicotiana tabacum* L中含有的萜类有效成分,具有抗菌、消炎和止血作用,也是合成辅酶Q₁₀和Vit K₂的主要中间体,具有很好的应用价值。关于茄呢醇含量测定方法的文献报道较少,国外报道中主要用气相色谱法测烟叶中茄呢醇的含量^[1,2]。茄呢醇沸点大于300℃,需高温色谱柱,条件较为苛刻,不易推广。国内报道用HPLC示差折光检测仪来测定其含量^[3],示差折光检测仪检测灵敏度较低,对流动相温度变化非常敏感,可控性也差。本实验首次使用薄层扫描法对烟叶中茄呢醇含量进行测定。

1 仪器与试剂

CD-60型薄层扫描仪(德国DESAGA公司),定量毛细管(1μL, 2μL, CAMAG公司),烟草(采集自不同产地),茄呢醇对照品(Sigma公司,纯度>99%),高效薄层板(100mm×200mm,青岛海洋化工厂分厂),所用试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的配制: 取茄呢醇对照品28mg,精密称定,置于50mL容量瓶中,用正己烷定容,配成浓度为0.56mg/mL的对照品溶液。

2.2 供品溶液的配制: 取5g烟叶(30~40目,烘干至恒重,山东临沂),精密称定,置于50mL三角烧瓶中,精密加入40mL正己烷,超声30min,取上清液,过滤,弃去初滤液,取续滤液,作为供品溶液备用。

* 收稿日期: 2001-09-25

作者简介: 李烈(1976-),女,重庆人,中国药科大学生药学专业99届硕士研究生,研究方向为天然药物分析。

Tel 13851470035 E-mail junenow76@sina.com