

泰山白花丹参干叶片高质量 DNA 的提取

郝岗平¹, 边高鹏², 张媛英¹

(1. 泰山医学院 生物技术教研室, 山东 泰安 271000; 2. 长治学院 生化系, 山西 长治 046011)

摘要:目的 为了从富含多酚和多糖的泰山白花丹参干叶片中分离出适用于 AFLP 分析的高质量基因组 DNA。方法 比较了 4 种 DNA 提取方法, 获得了一种以 CTAB 法为基础的分离高质量完整 DNA 的简便、快速方法。CTAB-free Buffer 清洗, 4 倍 CTAB 抽提和固体 PVP 和 VC 防止氧化。结果 使用该方法从泰山白花丹参干叶片中分离的 DNA A_{260}/A_{280} 为 1.86, 由此法所得的 DNA 可直接用于 AFLP 分析。结论 该技术可有效地从富含多酚和多糖的药用植物组织中分离出高质量 DNA。

关键词: 泰山白花丹参; DNA 提取; 改良 CTAB 法

中图分类号: R286.02

文献标识码: B

文章编号: 0253-2670(2006)06-0855-03

Isolation of high quality genomic DNA from dried leaves of Taishan

*Salvia miltiorrhiza f. alba*HAO Gang-ping¹, BIAN Gao-peng², ZHANG Yuan-ying¹

(1. Department of Biotechnology, Taishan Medical College, Taian 271000, China; 2. Department of Biochemistry, Changzhi College, Changzhi 046011, China)

Key words: Taishan *Salvia miltiorrhiza* Bunge f. *alba* C. Y. Wu et H. W. Li; DNA isolation; modified CTAB method

DNA 分子标记的基础是基于高质量 DNA 的提取。能否快速成功提取植物组织 DNA 以及所提取 DNA 质量的高低将直接影响整个实验的成败。高质量 DNA 要求高纯度, 无蛋白、糖类、酚类、盐类等杂质污染, 高相对分子质量, 无降解和有一定的数量。用作 AFLP (amplification fragment length polymorphism) 分子标记模板对 DNA 的要求就更高^[1], 高质量可完全酶切, 连接效率高, 特异性高, 重复性好, 实验结果稳定可靠。如何去除存在于植物药材中的多酚或多糖两类主要杂质, 目前还没有方便实用的有效方法。

丹参是我国传统中药, 具有活血化瘀、通经止痛的功能。其成熟干叶片富含多酚类、多糖物质, DNA 常受到严重的多酚污染, 造成 DNA 沉淀物难以溶解或溶液色深, 也会结合到 DNA 上造成 DNA 的降解; 多糖污染直接影响基因组 DNA 的限制性核酸内切酶的酶切效果^[2]。多酚类、多糖物质的污染会造成 AFLP 酶切连接等后续实验效果差, 甚至后续 PCR 没有扩增产物。因此, 丹参干叶片 DNA 提取的关键是除去多酚类、多糖物质。

白花丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bunge f. *alba* C.

Y. Wu et H. W. Li 为丹参的白花变型, 主要分布于山东境内, 其他地区较为少见, 属珍稀濒危药用植物。白花丹参除具有丹参的生物活性和用途外, 对治疗血栓性脉管炎具有独特疗效^[3]。本实验以泰山白花丹参凉干的成熟干叶片为材料, 以 CTAB 常规方法作对照, 采用高盐低 pH 法和改良 CTAB 法两个处理, 来摸索一种适合大量丹参成熟干叶片 DNA 提取的有效方法, 为后续 AFLP 分析奠定基础, 同时也可很好地保存山东特有的泰山白花丹参种质资源。

1 实验材料

样品为 2004 年 7—9 月在泰山采集白花丹参的成熟叶片, 凉干保存 1 个月。

CTAB(上海生物工程有限公司), VC(北京鼎国), SDS(上海生物工程有限公司), PVP(上海生物工程有限公司), β -mercaptoethanol(上海生物工程有限公司), Taq 酶(Takara), AFLP core reagent kit (Invitrogen, Cat No 1084-016)。

PTC-100 基因扩增仪(MJ 公司), Allegra™ 64R Centrifuge 离心机(Beckman), DNA 离心真空干燥器(Savant), EC-600-90 (E-C Apparatus 公司) 高压电泳仪。

收稿日期: 2005-09-08

基金项目: 山东省中医药管理局资助项目(2005-234); 泰山医学院博士科研启动基金项目(2004 年)

作者简介: 郝岗平(1970—), 男, 山西临县人, 博士, 副教授, 主要从事药用植物分子生物学研究。

Tel: (0538) 6221302 E-mail: haogangping@163.com

2 方法与结果

2.1 DNA 提取方法及检测结果: 采用常规 CTAB^[4] 和高盐低 pH 法^[5]。以常规 CTAB 法作为基本方法, 添加一些抗氧化剂和提高 CTAB 的比例, 作为采用改良 CTAB 法的处理 A 和处理 B 法。其中处理 A 为提取液中加入 VC 干粉 30 mg (1.5 mg/mg 叶片)。处理 B (PVP 预洗法) 为加 PVP 粉末 (干叶量的 10%), 与干叶共同在液氮下研碎。加入 4 °C 预冷的 CTAB-free 缓冲液 (0.2 mol/L Tris-Cl pH 8.0, 0.05 mol/L EDTA, 0.25 mol/L NaCl, 内含 4% β -mercaptoethanol), 冰上放置 10 min, 7 000 r/min (不能太高, 否则膜破, DNA 损失), 4 °C、离心 10 min, 弃上清。然后加 VC 干粉 (1 mg/mg 干叶片) 于 4 $\times$ CTAB 提取液中, 调 pH 值为 6.0~6.5。

用 0.8% 琼脂糖电泳和紫外分光光度计测定 A_{260}/A_{280} 的方法判定 DNA 的质量。

分别采用常规 CTAB 法、高盐低 pH 法和改良的 CTAB 法提取白花丹参成熟干叶片 DNA。结果表明, 常规 CTAB 法、高盐低 pH 法, 改良 CTAB 中的处理 A 得到的总 DNA 都呈浅黄色至浅棕色, 其余处理颜色较好 (表 1)。高盐低 pH 法, 改良 CTAB 得到的 DNA A_{260}/A_{280} 比值正常, 为 1.7~2.0, 其余的方法比值较低 (表 1)。

表 1 4 种方法提取白花丹参成熟干叶基因组 DNA 产率

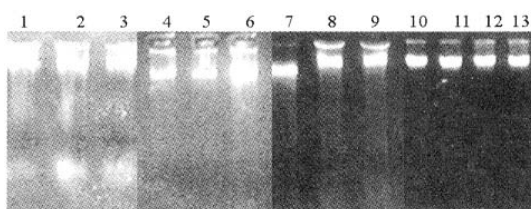
Table 1 Genomic DNA yield from dried leaves of Taishan *S. miltiorrhiza* f. *alba* by four extracting methods

方 法	颜色	A_{260}/A_{280}	DNA 产率/(ng $\cdot$ mg ⁻¹)
常规 CTAB 法	浅棕色	1.54	98
高盐低 pH 法	浅黄色	1.71	123
改良 CTAB 处理 A	浅棕色	1.74	45
改良 CTAB 处理 B	白色	1.86	85

琼脂糖电泳分析说明, 常规 CTAB 法和高盐低 pH 法可能蛋白质去除不彻底, 点样孔杂质较多; 改良 CTAB 中的处理 A 的 DNA 量少 (图 1), 说明单独使用 VC 时量不能太高; 而处理 B 的 DNA 量和蛋白质去除效果均较好。

2.2 AFLP 实验分析 DNA 质量: 取 250 ng DNA 用 EcoRI/Mse I 消化, 限制酶切片经 T₄ DNA 连接酶与接头连接及 PCR 扩增, 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳, 银染显色, 以构建出重复性好、多态性丰富的基因组 DNA AFLP 指纹图谱来进一步评价 DNA 质量。具体方法参照试剂盒说明书进行。引物组合为 (E-AAG; GAC TGC GTA CCA ATT CAA G; M-CCC; GAT GAG TCC TGA GTA ACC C)。将

采用不同方法提取的 DNA 做 AFLP 分析, 结果见图 2。常规 CTAB 法、高盐低 pH 法、改良 CTAB 中的处理 A 得到呈浅黄色至浅棕色的总 DNA, AFLP 扩增都没有产物, 而改良 CTAB 中的处理 B 扩增效果较好。看来提取液的颜色深度 (含有较多酚类物质) 与扩增结果呈明显负相关, 文献报道^[6]去除多酚类物质效果较好的高盐低 pH 法并不可行。



1~3-CTAB 法 4~6-改良 CTAB 法的处理
7~9-高盐低 pH 值法 10~13 改良 CTAB 法处理 B
1—3-normal CTAB method 4—6-A treated by modified CTAB method 7—9-high salt and low pH method 10—13-B treated by modified CTAB method

图 1 4 种方法提取白花丹参成熟干叶基因组 DNA 电泳图

Fig. 1 Electropherogram of DNA extract from dried leaves of Taishan *S. miltiorrhiza* f. *alba* by four extracting methods

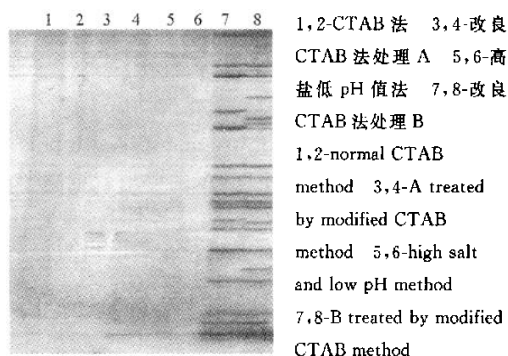


图 2 白花丹参基因组 DNA 的 AFLP 分析

Fig. 2 AFLP Analysis of genomic DNA of Taishan *S. miltiorrhiza* f. *alba*

3 讨论

植物中的多酚类化合物和多糖对于 DNA 质量的影响, 是植物分子生物学研究中最常遇到、必须解决的问题, 许多学者对于不同的植物作过研究报道^[7~9]。中药材的特性又使得这一问题更为突出, 即从药材中提取高质量的 DNA 并非易事。一方面由于中药材次生代谢物质丰富, 细胞裂解后释放的植物次生代谢产物多酚类化合物易于氧化, 氧化的多酚结合到 DNA 分子上而导致 DNA 降解, 因此难以从富含多酚的植物组织中分离出高相对分子质量

DNA。PVP 可与多酚结合形成复合物,可以有效避免多酚类化合物介导的 DNA 降解^[9,10]。另一方面,多糖的去除也是提取中药材 DNA 的关键。一般在材料粉碎之前,先不加细胞膜裂解液,因而 DNA 尚未溶出,用一些缓冲液清洗,可除去一些多糖^[11]。

本研究结果显示,只有改良的 CTAB 法的处理 B 可以达到 AFLP 分析的要求。笔者根据上述多酚及多糖的物理、化学特性对 CTAB 法作了如下改进:提高 CTAB 的浓度(4×CTAB 缓冲液)以尽可能破碎细胞壁、细胞膜,使核酸与蛋白质完全解离,并有利于 CTAB DNA 复合物形成;对于含多酚类较多的植物,增加 CTAB 提取缓冲液中 β -mercaptoethanol (提高到 4%),以固体形式加入 VC,防止多酚类物质氧化,同时以固体形式加入 PVP 使其与多酚类物质结合形成复合物。

通过对普通 CTAB 法改进以后,笔者从保存一个月的泰山白花丹参成熟干叶片中提取到高质量的 DNA, DNA 的电泳结果表明, DNA 的纯度和产率都比较理想。由于本实验是为了给后续研究利用 AFLP 法分析丹参道地性奠定基础,因此采用 AFLP 分析对分离的 DNA 质量作了进一步的评价,即使用 EcoRI/Mse I 消化 DNA 和随后的限制酶切片经 T_4 DNA 连接酶与接头连接及 PCR 扩增,结果扩增出可重复的 PCR 产物(实验重复 3 次)。结果表明,该技术可有效地从富含多酚和多糖的药用植物组织中分离出高质量 DNA。

使用此方法时应该注意:PVP 和 VC 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发生作用而失去效果,且 VC 和 PVP 配合使用。PVP 与样本共研后,要用预冷的清洗液,并在冰

上放置一段时间,也是防止氧化的手段。加 VC 后溶液的 pH 值会下降到 pH 4~5,这样的条件下,CTAB 的提取效果不佳,必须将提取液的 pH 值调到接近中性 pH 6~6.5。

References:

- [1] Li A L, Ma Z Y. AFLP molecular marker and crop improvement [J]. *J Hebei Agric Univ* (河北农业大学学报), 2001, 24 (1): 89-94.
- [2] Luo Z Y, Zhou G, Zhou S Q, et al. Construction of genomic DNA fingerprinting in *Panax ginseng* and *P. quinquefolium* by AFLP [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2000, 35 (8): 626-629.
- [3] Li Z T, Yang B J, Ma G E. Study on the chemical constituents of *Salvia miltiorrhiza* Bge. f. *alba*. [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 1991, 26 (3): 209.
- [4] Hao G P, Wu Z Y, Cao M Q, et al. Single nucleotide polymorphisms of CBF4 locus region of *Arabidopsis thaliana* correspond to drought tolerance [J]. *Chin J Agric Biotech* (中国农业生物技术), 1 (3): 181-190.
- [5] Shao P Z, Cao H. Authentication of Chinese Medicinal Materials by DNA Technology (中药分子鉴定) [M]. Shanghai: Fudan University Press, 2004.
- [6] Gu H, Gai L, Zhou T S, et al. A preliminary study on the molecular and chemical characteristics of authenticity (Dao-dixing) of a traditional Chinese medicinal plant—*Forsythia suspense* Vahl [J]. *J Fudan Univ; Nat Sci* (复旦学报:自然科学版), 2002, 41 (6): 664-668.
- [7] Luo Z Y, Zhou G, Chen X Y, et al. Isolation of high quality genomic DNA from plants [J]. *Bull Hunan Med Univ* (湖南医科大学学报), 2001, 26: 178-180.
- [8] Green M J, Thompson D A, Mackenzie D J. Easy and efficient DNA extraction from woody plants for the detection of phytoplasmas by polymerase chain reaction [J]. *Plant Dis*, 1999, 83: 482-485.
- [9] Kim C S, Lee C H, Shin J S, et al. A simple and rapid method for isolation of high quality genomic DNA from fruit tree and conifers using PVP [J]. *Nucleic Acids Res*, 1997, 25: 1085-1086.
- [10] Wang Q, Qu X P, Zhang K C, et al. An efficient protocol for preparation of high molecular weight DNA from fruit trees [J]. *High Technol Lett* (高技术通讯), 2000, 10 (4): 1-3.
- [11] Fu R Z, Wang J, Sun Y R, et al. Extraction of genomic DNA suitable for PCR analysis from dried plants rhizomes/roots [J]. *Biotechniques*, 1988, 25: 796-798.

RP-HPLC 法测定健儿糖浆中 6'-羟基-爵床定 B

于肖辉¹, 杨美华^{2*}, 金 钺², 陈建民²

(1. 江西天施康中药股份有限公司, 江西 鹰潭 335000; 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)

健儿糖浆由萝藦和爵床两味药材组成, 具有消痞化积、行气活血、消肿解毒的功效, 用于小儿疳积。

制剂原标准中只有爵床药材的薄层色谱鉴别, 无定量测定项。为了更好地控制本品的质量, 笔者参考文

收稿日期: 2005-11-14

作者简介: 于肖辉(1965—), 男, 江西余江人, 高级工程师, 主要从事新药研发, 科研管理工作。Tel: (0701) 6215005

* 通讯作者 杨美华 Tel: (010) 62899730 E-mail: yangmeihua15@hotmail.com