

## · 药材与资源 ·

## 黄连药材 DNA 提取及 RAPD 反应体系的优化

陈大霞<sup>1</sup>, 李隆云<sup>1</sup>, 钱敏<sup>1</sup>, 鲁成<sup>2</sup>

(1. 重庆市中药研究院, 重庆 400065; 2. 西南农业大学 蚕桑学重点实验室, 重庆 400716)

**摘要:**目的 探索黄连药材 DNA 的提取并对其 RAPD 反应体系进行优化。方法 采用目前较为流行的苯酚法、CTAB 法、高盐低 pH 值法, 通过电泳、紫外分光光度计检测及 RAPD 扩增效果确定黄连药材基因组 DNA 提取的最佳方法。结果 CTAB 法为黄连药材基因组 DNA 提取的最佳方法, 建立了适合黄连药材的 RAPD 反应体系: 25  $\mu\text{L}$  体系中内含 1 $\times$ PCR buffer、2 mmol/L  $\text{Mg}^{2+}$ 、100~150  $\mu\text{mol/L}$  dNTP、20 ng 引物、40 ng 模板、1 U *Taq* 酶。结论 CTAB 法及黄连药材的 RAPD 反应体系可以用于黄连药材的 RAPD 分析。

**关键词:**黄连药材; 基因组 DNA 提取; RAPD; 反应体系

中图分类号: R282.7

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2006)08-1233-05

DNA Extraction from *Rhizoma Coptidis* and optimization of RAPD reaction systemCHEN Da-xia, LI Long-yun<sup>1</sup>, QIAN Min<sup>1</sup>, LU Cheng<sup>2</sup>

(1. Chongqing Academy of Chinese Materia Medica, Chongqing 400065, China; 2. The Key Sericultural Laboratory of Southwest Agricultural University, Chongqing 400716, China)

**Abstract: Objective** To study the genomic DNA extraction from *Rhizoma Coptidis* and optimization of RAPD reaction system. **Methods** Different methods, i. e. phenol method, CTAB method, low pH extraction medium with high salt, were used to genomic DNA extract from *Rhizoma Coptidis*. The DNA samples obtained by the above methods were tested by agarose gel electrophoresis and ultraviolet spectrometer. **Results** CTAB Method was considered to be an optimal technique. Based on the genomic DNA extracted by CTAB method, a reaction system suitable for *Rhizoma Coptidis* was established, that is, 25  $\mu\text{L}$  amplification reactions system containing 1 $\times$ PCR buffer, 2 mmol/L  $\text{Mg}^{2+}$ , 100—150  $\mu\text{mol/L}$  dNTP, 20 ng primer, 40 ng template DNA, and 1 U *Taq* DNA polymerase. **Conclusion** CTAB Method and RAPD reaction system can be used to RAPD analysis in *Rhizoma Coptidis*.

**Key words:** *Rhizoma Coptidis*; genomic DNA extraction; RAPD; reaction system

对于新鲜材料而言, DNA 的提取已有较为成熟的提取方法, 而中药材在加工、炮制、贮藏过程中, 药材的 DNA 或多或少被降解, 寻找一种从干品中药材中提取 DNA 的简便、快捷、高效的方法, 是进行药材分子生物学研究非常关键的一步。本研究拟采取目前较为流行的苯酚法、CTAB 法、高盐低 pH 值法进行比较探索。随机扩增多态性 DNA (random amplified polymorphic DNA, 简称 RAPD) 技术是 1990 年由 Williams<sup>[1]</sup> 和 Welsh<sup>[2]</sup> 两个研究小组几乎同时发展起来的一项 DNA 多态检测技术。该技术具有操作简便、灵敏快速、费用低廉、安全等优点, 已广泛应用于中药的鉴定<sup>[3]</sup>、分类<sup>[4]</sup> 以及药材的道地性<sup>[5]</sup> 等方面的研究。但 RAPD 易受各种因素的干扰, 其最佳扩增条件在不同物种各有不同, 因

此在对黄连药材进行 RAPD 分析时, 完全有必要对各因子的反应条件进行优化, 建立稳定的、最佳的反应体系。

## 1 材料和方法

1.1 材料: 黄连 *Coptis chinensis* Franch. 于 2004 年 11 月采自四川、重庆、陕西、湖北等生产地, 由本院生药栽培室李隆云研究员鉴定, 各地黄连均收集生长了 5 年以上的。在成熟植株上选择当年萌发的幼嫩叶片, 低温下带回实验室, 洗净晾干后, 冻于 -80  $^{\circ}\text{C}$  超低温冰箱中保存。黄连根部洗净后, 置于 50  $^{\circ}\text{C}$  烘箱内烘至完全干燥, 最后密封保存于干燥室。

1.2 仪器与试剂: TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice Model No. TP600 扩增仪 (宝生物工程 (有限公))、Smart Spee<sup>TM</sup> 3000 型分光光度计 (BIO-RAD

收稿日期: 2005-11-10

基金项目: 国家科技攻关计划 (2004BA721A32); 国家中医药管理局攻关项目 (国中医药科 2004ZX06-1); 重庆市科技计划项目 (8847)

作者简介: 陈大霞 (1968—), 女, 重庆人, 助理研究员, 硕士, 主要从事药用植物分子生物学研究。

Tel: (023) 89029190 E-mail: 17837@163.com

公司)、DYCP-34A 型琼脂糖水平电泳槽(北京市六一仪器厂)、Gel Doc 2000 凝胶成像系统(BIO-RAD 公司)、10 mer 随机引物(赛百盛)、*Taq* 酶(promega)、dNTPs (promega)、 $\lambda$ -EcoT141 digest DNA Marker (TakaRa)、CTAB (Amresco)、PVP (Sigma)、 $\beta$ -巯基乙醇(Sigma)、琼脂糖(进口分装),其余均为国产分析纯试剂。

1.3 黄连基因组 DNA 提取方法的探索:分别称取同一株黄连药材(去掉表面的老皮) 0.5 g,用下面 3 种方法提取基因组 DNA。

苯酚法:采用稍做改进的 Sambrook<sup>[6]</sup>的方法。高盐低 pH 值法:参照文献方法<sup>[7]</sup>进行。CTAB 法:采用本院稍作改进的 CTAB 法<sup>[8]</sup>进行。黄连新鲜材料基因组 DNA 提取方法:采用本院稍作改进的 CTAB 法<sup>[8]</sup>进行。

1.4 DNA 扩增:参照常规的 PCR 反应中各成分的量,将黄连药材 RAPD 优化的初始反应体系确定为:反应总体积 25  $\mu$ L,内含 1 $\times$ PCR buffer、MgCl<sub>2</sub> 1.5 mmol/L、dNTP 200  $\mu$ mol/L、引物 40 ng、模板 40 ng、*Taq* 酶 1 U。根据预实验的结果,以 SBSC<sub>9</sub> 为引物,对黄连 RAPD 反应体系中 5 种主要成分(Mg<sup>2+</sup>、dNTP、引物、模板、*Taq* 酶)及牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)分别进行单因子实验,每一个合适条件确定后作为后续研究的一个条件。

扩增程序为 94  $^{\circ}$ C 预变性 5 min,然后进行 35 个循环:94  $^{\circ}$ C 变性 30 s、37  $^{\circ}$ C 复性 1 min、72  $^{\circ}$ C 延伸 1.5 min、循环结束后 72  $^{\circ}$ C 延伸 7 min,-4  $^{\circ}$ C 保存。1.5 PCR 产物的检测:扩增产物在 1.5% 琼脂糖凝胶上电泳分离,电压不超过 5 V/cm。当溴酚蓝指示剂距离琼脂糖凝胶前沿约 2~3 cm 时停止电泳,用 0.5  $\mu$ g/mL EB 染色 15~30 min 后,在凝胶成像系统上检测、照相、记录。

## 2 结果与分析

2.1 黄连药材基因组 DNA 提取方法比较:3 种方法所提 DNA 的颜色深浅不一:CTAB 法所提 DNA 为无色,苯酚法浅棕色,高盐低 pH 法颜色最深,为棕色。从外观看,每种方法所提 DNA 所含的杂质量是不同的。紫外分光光度仪检测结果:就 DNA 产率而言,高盐低 pH 法最高,但  $A_{260/280}$  值 1.942,可见该法提出的 DNA 中 RNA 量较高;苯酚法的产率次于高盐低 pH 法,但  $A_{260/280}$  值 1.198,说明有蛋白质和酚的污染;相对而言,CTAB 法虽然产率低,但  $A_{260/280}$  值 1.60 左右,与其他两种方法相比较,蛋白

质、RNA 去除较干净。

1% 琼脂糖电泳结果显示(图 1),3 种方法所提 DNA 均有大于 20 kb 的主带,可以用于 RAPD 分析。高盐低 pH 法背景最深,溴酚蓝下面还有一条明显的 RNA 带。3 种方法的上样量以高盐低 pH 法最高(3 700 ng)、苯酚法次之(770 ng)、CTAB 法最低(700 ng),但条带的亮度却正好相反。由此可见,DNA 的纯度、产率仅凭紫外分光光度仪检测是不够准确的,应该与电泳结合起来确定。

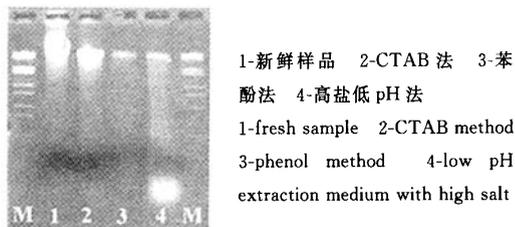


图 1 不同提取方法电泳比较

Fig. 1 Comparison of various extraction methods by electrophoresis

通过以上外部观测及紫外分光光度仪、电泳检测,可以初步确定 CTAB 法是优于苯酚法和高盐低 pH 法的。为进一步证实这点,笔者进行了 RAPD 扩增效果的比较。从图 2 可以看出:CTAB 法所提药材 DNA 与鲜品 DNA 的扩增结果完全一致;苯酚法稍差,能扩增出主带;高盐低 pH 法扩增效果最差,仅得到一些小相对分子质量的条带。

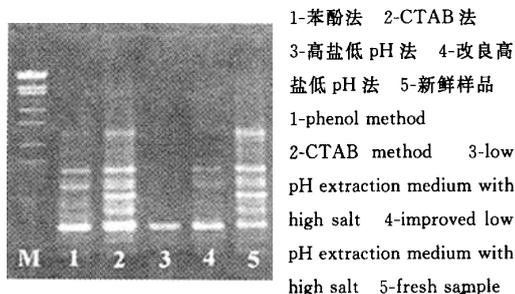


图 2 不同提取方法 RAPD 扩增效果比较

Fig. 2 Comparison of RAPD amplification by various extraction methods

综合上述检测结果:将 CTAB 法确定为黄连药材基因组 DNA 提取的最佳方法。

### 2.2 黄连药材 RAPD 反应体系的优化

2.2.1 Mg<sup>2+</sup> 浓度: *Taq* DNA 聚合酶是 Mg<sup>2+</sup> 依赖性酶,对 Mg<sup>2+</sup> 浓度非常敏感,是影响 PCR 结果的重要变量之一,因此选择合适的 Mg<sup>2+</sup> 浓度,对 PCR 反应至关重要。本研究共设置了 0.5~4 mmol/L 共 7 个 Mg<sup>2+</sup> 梯度,结果如图 3 所示:Mg<sup>2+</sup> 浓度在 2.0~

3.0 mmol/L, 扩增结果基本一致, 但以 2.0 mmol/L 最佳; 其他浓度下的扩增弱, 0.5 mmol/L 时未得到产物。

2.2.2 dNTP 浓度: 底物 dNTP 浓度过高, 会导致聚合酶错误地掺入, 浓度过低, 又会影响合成效率, 甚至会因 dNTP 过早消耗而使产物单链化, 影响扩增效果。本实验设置了从 20~600 μmol/L 共 9 个 dNTP 梯度, 见图 4。dNTP 浓度过高(600 μmol/L) 无扩增产物; 100、200 μmol/L dNTP 得到的谱带一致; 其余浓度下, 只能扩增出一些小相对分子质量的条带。

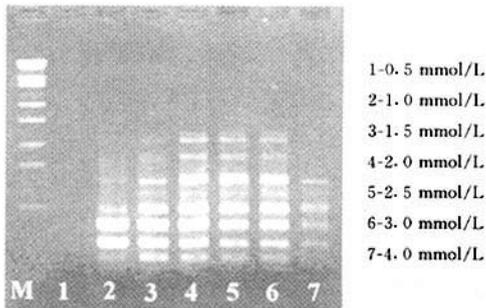


图 3 Mg<sup>2+</sup> 浓度的影响

Fig. 1 Influence of Mg<sup>2+</sup> concentration

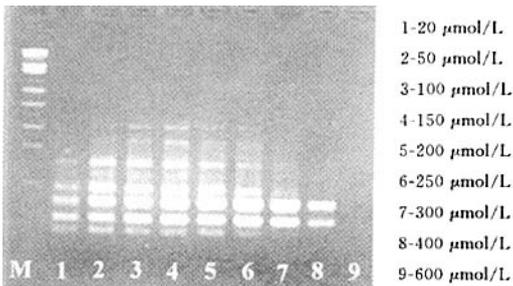


图 4 dNTP 浓度的影响

Fig. 4 Influence of dNTP concentration

2.2.3 引物浓度: 引物浓度不宜偏高, 一般为 0.1~0.5 μmol/L, 如图 5 所示。引物质量浓度过低(10 ng), 引物与模板的结合率低, 扩增弱。引物在 20~80 ng 条带数基本一致, 但可明显看出, 随着引物浓度的升高, 非特异性扩增产物增加, 造成背景模糊。因此, 综合考虑, 引物以 20~30 ng 较适宜。

2.2.4 模板梯度: 从本研究设置的 10 个模板梯度(1~480 ng)可看出(图 6); RAPD-PCR 对模板的要求并不严格, 模板质量浓度在一定范围内(10~240 ng)并不会影响扩增条带的增减。模板量过低(1 ng)或过高(360、480 ng), 得到的扩增产物少或不稳定, 甚至无产物。本实验采用了 40 ng 的模板量。

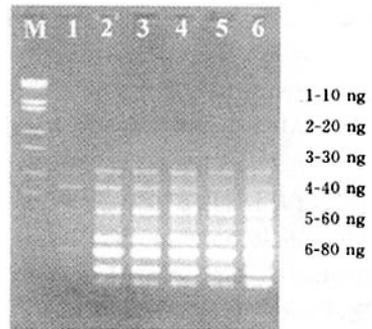
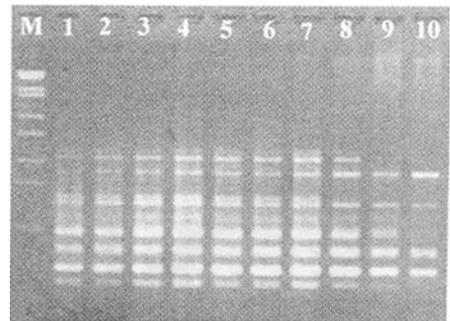


图 5 引物浓度的影响

Fig. 5 Influence of primer concentration

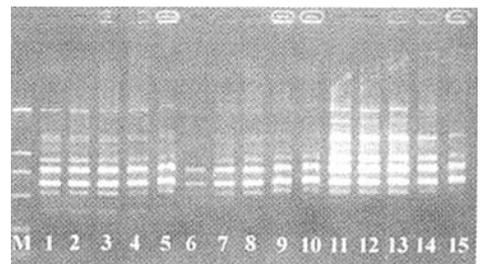


1-1 ng 2-5 ng 3-10 ng 4-20 ng 5-40 ng 6-80 ng  
7-120 ng 8-240 ng 9-360 ng 10-480 ng

图 6 模板浓度的影响

Fig. 6 Influence of template concentration

2.2.5 不同提取方法与 BSA 浓度的关系: 本实验就 BSA 对 RAPD 的影响进行了探索。如图 7 所示, BSA 对苯酚法、CTAB 法所提 DNA 的扩增结果影响并不显著, 相反高浓度的 BSA 还不利于扩增。但对高盐低 pH 值法所提 DNA 的扩增却有影响, 加了 BSA 的扩增条带数明显多于未加 BSA 的。此外, 当 BSA 浓度高于 3 μg/μL 时, 扩增产物较黏稠, 电泳



1~5-苯酚法 6~10-高盐低 pH 值法  
11~15-CTAB 法 BSA(0,1,2,3,4 μg/μL)  
1-5-phenol method 6-10-low pH extraction medium with high salt 11-15-CTAB method BSA (0,1,2,3, and 4 μg/μL)

图 7 不同提取方法与 BSA

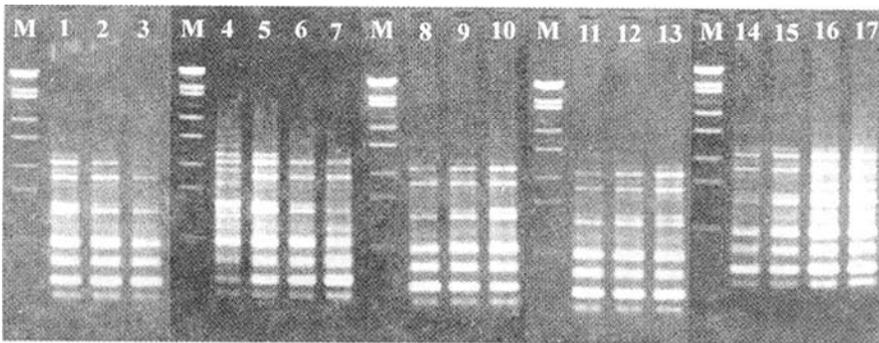
Fig. 7 Various extraction methods and BSA

时溴酚蓝滞后,染色后可见条带宽度缩小变窄,点样孔有 EB 吸收。

2.2.6 黄连药材 RAPD 反应体系的建立:通过对黄连 RAPD 反应体系中 5 种主要成分( $Mg^{2+}$ 、dNTP、引物、模板、*Taq* 酶)及 BSA 单因子优化实验,综合实验成本等因素考虑,建立了适合黄连药材的 RAPD 反应体系:25  $\mu$ L 体系中含  $1 \times$  PCR 缓冲液、2 mmol/L  $Mg^{2+}$ 、100~150  $\mu$ mol/L dNTP、20 ng 引物、40 ng 模板、1 U *Taq* 酶。

2.3 扩增程序的优化:对扩增程序中的一些主要热循环参数进行了探讨。94  $^{\circ}$ C 下设置了 30、40、60 s 共 3 个时间梯度,结果表明:40、60 s 扩增的条带数均

少于 30 s,因此变性时间以 30 s 为佳;退火温度设置了 34、37、39、45  $^{\circ}$ C 共 4 个梯度,34  $^{\circ}$ C 的退火温度下,扩增的条带多而弱,随温度的升高,特异性增强,但条带相对少一些,相比之下,37  $^{\circ}$ C 退火温度下扩增的条带数及亮度均较适宜;37  $^{\circ}$ C 下退火时间设置了 30、60、120 s 共 3 个梯度,结果表明:带型基本一致,本实验选用 60 s 作为退火时间;72  $^{\circ}$ C 下延伸时间从 60~120 s 对条型无明显影响,本实验选用 90 s 作为延伸时间;循环数设置了 30、35、40、45 次,各循环数下得到的条型基本一致,但 30 次的循环数扩增量明显不足,40、45 次扩增量显著提高,但非特异性增强,背景加深,因此 35 次的循环数较适宜。见图 8。



1~3-94  $^{\circ}$ C 下变性时间 30、40、60 s 4~7-退火温度 34、37、39、45  $^{\circ}$ C 8~10-37  $^{\circ}$ C 下退火时间 30、60、120 s  
11~13-72  $^{\circ}$ C 下延伸时间 60、90、120 s 14~17-循环数 30、35、40、45 次

1—3-denaturation time of 30, 40, and 60 s in 94  $^{\circ}$ C 4—7-annealing temperature of 34, 37, 39, and 45  $^{\circ}$ C 8—10-annealing time of 30, 60, and 120 s in 37  $^{\circ}$ C 11—13-extension time of 60, 90, and 120 s in 72  $^{\circ}$ C 14—17-cycles of 30, 35, 40, and 45 times

图 8 扩增程序的优化

Fig. 8 Optimization of amplified program

### 3 讨论

对于新鲜幼嫩的材料而言,植物基因组 DNA 的提取已有较为行之有效的方法,而中药材样品来源复杂,药用部位大多是老组织,含有大量的多酚和多糖物质,植物细胞在死亡过程中,也会产生一些影响下一步分子生物学实验的次生物质。这些次生物质与核酸形成复合物,DNA 包埋在这种黏稠的胶状物中难以溶解或产生不同程度的褐变。因此药材基因组的提取较新鲜材料困难得多。虽然药材 DNA 的提取方法已有一些报道<sup>[9]</sup>,但目前还没有一种较通用的方法。因此在中药材分子生物学研究过程中,针对不同药材进行 DNA 提取方法的摸索是完全有必要的。从本研究结果看,无论是电泳检测还是 PCR 扩增效果,CTAB 法所提药材 DNA 与鲜品 DNA 的结果完全一致,这可能与本文黄连药材的快速干燥、保存时间相对较短有一定关系,至于贮存时间长短对 RAPD 的影响尚有待进一步探讨。

药材基因组 DNA 浓度与纯度通常用紫外分光光度仪进行测定,由于某些杂质在 UV 260 nm 处也有吸收峰,因此仅通过紫外吸收进行 DNA 的定量偏差较大。从本研究结果看,应结合电泳检测、PCR 扩增效果综合分析。笔者认为就中药材而言,PCR 扩增检测更为重要,一是因为中药材品种繁多,化学成分各异,基因组 DNA 带有不同的杂质,RAPD 对模板的纯度要求不严,少量的杂质并不影响扩增的结果;二是因为药材的特殊性,特别是一些贮藏时间较长的药材,提取的产物中含有基因组 DNA,只是由于量太少,用紫外分光光度仪和电泳往往检测不到,但足以用于 PCR 的扩增。因此,在前两种方法检测效果不好的情况下,可以用 PCR 扩增作为补充手段。

在影响 RAPD 扩增效果的主要因素中, $Mg^{2+}$  与 dNTP 之间的浓度关系至关重要,需要通过实验来确定。RAPD 对模板的纯度要求不高,因此,在本实验中,CTAB 法、苯酚法所提 DNA 尽管有杂质,

但并不影响扩增结果,但高盐低 pH 法所提 DNA 呈棕色,含有较多抑制酶活性的多酚类物质。为消除多酚类物质对扩增的影响,本研究参照其他研究者的经验,在 RAPD 反应体系中添加 BSA,用于减少内源抑制物的干扰作用<sup>[10]</sup>。结果证实,对于杂质多的样品,添加 BSA 是可以改善扩增效果的。据报道 BSA 的一个可能作用机制是作用于多酚体系,通过其上富含赖氨酸的阳离子与多酚化合物的阴离子相互作用而消除内源的多酚类化合物,阻止它们与 Taq 酶结合,从而提高酶的活性,改善扩增效果<sup>[11]</sup>。

致谢:本研究分子生物学实验在西南农业大学蚕桑学重点实验室完成。

References:

[1] Williams J G K, Kuvelik A R, Livak K, et al. DNA Polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers [J]. *Nucl Acids Res*, 1990, 18 (22): 6531-6535.  
 [2] Welsh J, McClell M. Polymorphisms generated by arbitrarily primed PCR in the mouse: application to strain identification and genetic mapping [J]. *Nucl Acids Res*, 1991, 19 (2): 303-306.  
 [3] Huang Y, Qin M J, Yang G, et al. Identification of *Belamcanda Chinensis* and related Chinese material medica of *Irid L.* by RAPD analysis [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中

草药), 2002, 33 (10): 935-937.  
 [4] Xiao X H, Liu F Q, Shi C H, et al. RAPD Polymorphism and authentication of medicinal plants from Turmeric (*Curcuma*) L. in China [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2000, 31 (3): 209-212.  
 [5] Gao W Y, Qin E Q, Xiao X H, et al. Analysis on genuineness of *Angelica sinensis* of RAPD [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2001, 32 (10): 926-929.  
 [6] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T, et al. *Molecular Cloning A Laboratory Manual* [M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.  
 [7] Zou Y P, Wan X Q, Lei Y D, et al. Isolation and characterization of total DNA from endangered species and their allies [J]. *Acta Bot Sin* (植物学报), 1994, 36 (7): 528-532.  
 [8] Peng R, Song H Y, Li Q S, et al. The extraction and Identification of total DNA in *Herba Dendrobii* [J]. *China Journal of Chinese Materia Medica* (中国中药杂志), 2003, 28 (2): 1129-1131.  
 [9] Guo B L, Lin S. DNA Extraction of dried leaves of *Salvia miltiorrhiza* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2002, 33 (5): 418-420.  
 [10] Wang Y M, Zhou K Y, Wu P, et al. Isolation and amplification of DNA from tortoise and turtle shells [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 1996, 31 (6): 472-476.  
 [11] Bian C M, Li J M, Jin Z X, et al. Effect of BSA on random amplified polymorphic DNA (RAPD) in plants [J]. *Hereditas* (遗传), 2002, 24 (3): 279-282.

## 肉苁蓉愈伤组织培养及所含有效成分量的研究

宋玉霞<sup>1</sup>, 郭生虎<sup>1</sup>, 张芦燕<sup>3</sup>, 李 苗<sup>1</sup>, 马洪爱<sup>1</sup>, 牛东玲<sup>1,2</sup>, 郑国琦<sup>1,2</sup>, 王英华<sup>3</sup>

(1. 宁夏农业生物技术重点实验室, 宁夏 银川 750002; 2. 宁夏大学生命科学学院, 宁夏 银川 750021, 3. 宁夏药品检验所, 宁夏 银川 750004)

**摘要:**目的 为扩大和提高肉苁蓉 *Cistanche deserticola* 资源的利用效率。方法 以肉苁蓉肉质茎的不同组织部位作为外植体, 采用正交实验方法, 筛选诱导愈伤组织产生的不同培养基和培养条件, 并继代培养。应用 HPLC 方法对愈伤组织培养物中松果菊苷和洋丁香苷(毛蕊花糖苷)的量进行测定。结果 肉苁蓉肉质茎的维管组织部分是诱导愈伤组织的最适外植体, 鳞片叶次之, 髓组织部分诱导效果较差。在暗培养、25~27℃条件下以 B5 为基本培养基附加 6-BA (0.5~2 mg/L) 与 IAA (0.5~1.5 mg/L) 诱导愈伤组织效果最佳; 在半光照(光培养 10 h/d, 暗培养 14 h/d)条件下, 愈伤组织生长正常, 最佳继代时间为 25~30 d。愈伤组织培养物中松果菊苷和洋丁香苷(毛蕊花糖苷)达 4.37%。结论 筛选出了适宜的肉苁蓉愈伤组织培养方法, 且培养物中主要药用有效成分松果菊苷和洋丁香苷(毛蕊花糖苷)的量达到并超过了《中国药典》要求(0.3%)的标准。

**关键词:**肉苁蓉; 肉质茎; 愈伤组织; 洋丁香苷(毛蕊花糖苷); 松果菊苷

**中图分类号:**R282.1; R282.6 **文献标识码:**A **文章编号:**0253-2670(2006)08-1237-05

### Callus culture of *Cistanche deserticola* and its acteoside content

SONG Yu-xia<sup>1</sup>, GUO Sheng-hu<sup>1</sup>, ZHANG Lu-yan<sup>3</sup>, LI Miao<sup>1</sup>, MA Hong-ai<sup>1</sup>, NIU Dong-ling<sup>2</sup>, ZHENG Guo-qi<sup>2</sup>, WANG Ying-hua<sup>3</sup>

(1. Ningxia Agricultural Biotechnological Key Laboratory, Yinchuan 750002, China; 2. School of Life Science, Ningxia University, Yinchuan 750021, China; 3. Ningxia Institute for Drug Control, Yinchuan 750004, China)

收稿日期:2005-11-10

基金项目:国家自然科学基金项目(30260008); 国家科技部攻关西部专项(2002BA901A32); 宁夏自然科学基金项目(NZ0522)

作者简介:宋玉霞(1963—), 女, 硕士, 研究员, 主要从事结构植物学和药用植物资源方面的研究。E-mail: songyx666@163.com