

美花石斛基因组 DNA 提取方法的比较

包英华*, 白音, 谭庆辉, 彭凌, 阙生全

(韶关学院英东生物工程学院, 广东 韶关 512005)

摘要:采用 CTAB 法、尿素法、高盐低 pH 法、SDS 法和陈大明法等 5 种方法提取美花石斛(*Dendrobium loddigesii* Rolfe) 基因组总 DNA, 通过电泳、紫外光谱分析和 RAPD-PCR 扩增等检测手段, 比较分析了 DNA 质量。DNA 条带显示改良 CTAB 法和改良尿素法较好。

关键词:美花石斛; 基因组 DNA; DNA 提取方法

中图分类号: Q523

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2007)02-0147-05

Comparison of Methods of Genomic DNA Extraction from *Dendrobium loddigesii* Rolfe

BAO Ying-hua, BAI Yin, TAN Qing-hui, PENG Ling, QUE Sheng-quan

(Yingdong College of Bioengineering, Shaoguan College, Shaoguan 512005, China)

Abstract: Five methods of genomic DNA extraction from *Dendrobium loddigesii* Rolfe were compared. DNA was detected by electrophoresis, UV and RAPD-PCR. DNA bands showed that the modified CTAB and carbamide methods are better than the other four methods including CTAB, carbamide, high salt and low pH, SDS and Chen methods.

Key words: *Dendrobium loddigesii*; Genomic DNA; DNA extraction methods

美花石斛 (*Dendrobium loddigesii* Rolfe) 为兰科石斛属多年生附生植物, 主要分布于广西、广东、贵州和云南等省区, 生于海拔 400-1 500 m 的山地森林中树干上或林下岩石上^[2]。美花石斛、铁皮石斛 (*D. officinale*)、金钗石斛 (*D. nobile*)、束花石斛 (*D. chrysanthum*) 和流苏石斛 (*D. fimbriatum*) 等石斛属植物为中药石斛的主要来源, 具有滋阴清热、益胃生津和润肺止咳等功效^[3]。目前在市场上通常有金石斛属 (*Flickingeria*)、石仙桃属 (*Pholidota*) 和石豆兰属 (*Bulbophyllum*) 等多种混淆植物代用中药石斛于临床治疗, 从而难以保证药用石斛的临床疗效。虽然石斛及其混淆品植物之间形态差异较大, 但这些植物加工成药材后, 外形相似, 对其进行性状、显微鉴定和形态鉴别难以解决鉴定问题。近年来, 随着

分子生物学的快速发展, 在分子水平上判断中药材真伪优劣提供了较为可靠的技术和方法, 然而分子鉴别是否可靠稳定, 能否获得高质量的基因组 DNA 十分重要。

石斛含有多糖、生物碱、酚类、萜类、黄酮类、倍半萜类、甾体类及香豆素等多种代谢物质^[4], 这些物质往往影响石斛基因组 DNA 的提取分离, 尤其是酚类物质与 DNA 分子可发生不可逆的结合, 从而增加 DNA 溶液的粘性, 降低提取产物纯度, 甚至产生棕色氧化物质。前人^[5-6]使用常用植物基因组 DNA 提取方法所获得的石斛基因组 DNA 质量不太理想, 这与作者实验一致。因此本文以美花石斛为研究材料, 采用改进的 DNA 提取方法, 利用 3 种检测手段对已提取的基因组总 DNA 进行检测, 最终

收稿日期: 2006-09-04 接受日期: 2006-11-28

资助项目: 韶关市科技计划项目 (No. 2005-10) 资助

* 通讯作者 Corresponding author

筛选出能获得高质量石斛基因组 DNA 的提取方法。

1 材料和方法

1.1 材料

试验材料采自贵州省兴义市龙广镇野生美花石斛,栽培于韶关学院英东生态园。

1.2 主要试剂

CTAB、SDS、PVP (K30)、EDTA、Tris、尿素、引物、dNTP、Taq 聚合酶和 ME 等试剂购自广州威佳和上海生工。

1.3 样品 DNA 提取方法

采用常规植物基因组 DNA 提取方法(如 CTAB、SDS、高盐低 pH、尿素法和陈大明法)提取石斛属植物基因组 DNA 所获得的 DNA 纯度和浓度不太理想,因此我们针对石斛属植物主含成分的特点,对常规提取方法的组分有所改变。采用改进的 CTAB 法、尿素法、高盐低 pH 法、SDS 法和陈大明法(表 1),提取美花石斛基因组总 DNA。其总体步骤如下:分别称取美花石斛的鲜叶和干叶(用变色硅胶干燥),加入 2 ml 65℃ 预热的提取液,并 65℃ 水浴 30-120 min,加等体积抽提液抽提,4℃ 5 000-10 000 r min⁻¹ 离心 5-10 min。取上清

液,加入无水乙醇或异丙醇或 2/3 倍体积的 NaAc (3 mol L⁻¹, pH5.2),静止,离心 10 min,沉淀用 70% 乙醇洗两次,晾干,加 100 μl TE 溶解,保存。DNA 提取和检测试验均重复 5 次。

1.4 DNA 鉴定

紫外分光光度计检测 用紫外分光光度计在波长 260 nm 和 280 nm 处的吸光度(A 值)来计算 DNA 的大致含量。根据其 A₂₆₀ 值和 A₂₆₀/A₂₈₀ 比值计算 DNA 浓度和纯度。计算公式为:DNA 浓度 (ng)=A₂₆₀×50×稀释倍数×TE 体积/1 000;DNA 得率 (ng g⁻¹ 叶质量)=DNA 浓度 (ng)/DNA 质量(g)。

电泳检测 将所得 DNA 于 1.2% 琼脂糖凝胶中进行电泳,TBE 电泳缓冲液,用 ImageMaster VCD 凝胶成像系统扫描电泳结果,判断 DNA 的纯度和浓度。

PCR 扩增检测 将不同方法所得 DNA 为模板,用 RAPD 引物 S98 进行 PCR 扩增。25 μl 反应体系中含 DNA 模板 46 ng,引物浓度为 0.3 mmol/L,2.5 μl 10× Buffer,1.2 mmol/L MgCl₂,160 mmol/L dNTPs,1.2 U Taq 聚合酶,加水至 25 μl。反应程序为 94℃ 预变性 3 min;94℃ 变性 50 s;40℃ 退火 1 min;72℃ 延伸 2 min,40 cycles,72℃ 延伸 5 min,产物以 1.8% 琼脂糖凝胶电泳。

表 1 5 种 DNA 提取常规方法的比较

Table 1 Comparison of five DNA extraction methods

提取方法 Method	DNA 提取溶液 DNA isolation buffer
CTAB 法 ^[7] CTAB	2% CTAB, 0.05 mol/L Tris-HCl, 0.7 mol/L NaCl, 0.01 mol/L EDTA, 0.4% ME, Chloroform:Isoamyl alcohol (24:1)
改良 CTAB 法 Modified CTAB	4% CTAB, 0.1 mol/L Tris-HCl, 1.4 mol/L NaCl, 0.02 mol/L EDTA, 1.2% ME, 3% PVP, Chloroform:Isoamyl alcohol (24:1)
尿素法 ^[8] Carbamide	8 mol/L Carbamide, 0.25 mol/L Tris-HCl, 0.4 mol/L NaCl, 0.5 mmol/L EDTA, 0.5% ME, 1% SDS, 20% PVP, 10 mol/L NH ₄ Ac, Phenol:Chloroform:Isoamyl alcohol (50:49:1)
改良尿素法 Modified carbamide method	8 mol/L Carbamide, 0.25 mol/L Tris-HCl, 0.4 mol/L NaCl, 0.5 mmol/L EDTA, 0.5% ME, Chloroform:Isoamyl alcohol (24:1)
高盐低 pH 法 ^[9] High salt, low pH method	1.4% SDS, 0.05 mol/L EDTA, 0.05 mol/L NaCl, 2% PVP, 0.1 mol/L NaAc, 5 mol/L KAc
改良高盐低 pH 法 Modified high salt, low pH method	1.5% SDS, 0.02 mol/L EDTA, 1 mol/L NaCl, 0.1% ME, 0.1 mol/L Tris-HCl, 3 mol/L NaAc
SDS 法 ^[7] SDS	0.1 mol/L Tris-HCl, 0.5 mol/L NaCl, 0.05 mol/L EDTA, 10% SDS, 0.1% ME, 3 mol/L NaAc
改良 SDS 法 Modified SDS method	0.1 mol/L Tris-HCl, 0.5 mol/L NaCl, 0.1 mol/L EDTA, 2% SDS, 0.1% ME, 3 mol/L NaAc, 3% Vc, Chloroform:Isoamyl alcohol (24:1)
陈大明法 ^[10] Chen method	0.4 mol/L Glucose, 3% PVP, 0.01% ME, 1.5% SDS, 0.02 mol/L EDTA, 0.1 mol/L Tris-HCl, 0.5 mol/L NaCl, Chloroform:Isoamyl alcohol:alcohol (80:4:16)
改良陈大明法 Modified Chen method	0.4 mol/L Glucose, 3% PVP, 0.5% ME, 1.5% SDS, 0.02 mol/L EDTA, 0.1 mol/L Tris-HCl, 1 mol/L NaCl, Phenol:Chloroform:Isoamyl alcohol (25:24:1)

2 结果和分析

2.1 紫外检测

5 种 DNA 提取方法, 分别提取美花石斛鲜叶和干叶基因组 DNA, 其紫外检测结果见表 2 和表 3。结果表明未改良方法提取的美花石斛基因组 DNA 在纯度与浓度上明显低于改良法提取的 DNA, 这

证明改良的 DNA 提取方法, 能有效的去除细胞内杂质, 抑制次生代谢物与 DNA 结合, 所得的 DNA 溶液较纯, 浓度较高。

但从美花石斛鲜叶提取 DNA 时, 改良高盐低 pH 法和改良陈大明法提取的 DNA 纯度很低(表 2), 除去蛋白质不彻底, 而改良 CTAB 法所得 DNA 纯度高 ($A_{260}/A_{280}=1.8$), 其次是改良尿素法和改良 SDS

表 2 美花石斛鲜叶基因组 DNA 紫外检测结果

Table 2 Yield of genomic DNA from fresh leaves of *D. loddigesii* detected by UV

方法 Method	A_{260}	A_{280}	A_{260}/A_{280}	DNA 浓度 DNA concentration (ng)	DNA 提取率 DNA yield (ng g ⁻¹)
CTAB 法 CTAB	0.009	0.006	1.500	4.5	22.5
改良 CTAB 法 Modified CTAB method	0.036	0.020	1.800	18	90
尿素法 Carbamide method	0.005	0.003	1.667	11	50
改良尿素法 Modified carbamide method	0.014	0.007	2.000	28	140
高盐低 pH 法 High salt, low pH method	0.004	0.003	1.333	4	40
改良高盐低 pH 法 Modified high salt, low pH method	0.016	0.010	1.600	16	80
SDS 法 SDS	0.015	0.009	1.667	7.5	75
改良 SDS 法 Modified SDS method	0.008	0.004	2.000	8	40
陈大明法 Chen method	0.027	0.015	1.333	13.5	135
改良陈大明法 Modified Chen method	0.032	0.028	1.143	32	160

表 3 美花石斛干叶基因组 DNA 紫外检测结果

Table 3 Yield of genomic DNA from dry leaves of *D. loddigesii* detected by UV

方法 Method	A_{260}	A_{280}	A_{260}/A_{280}	DNA 浓度 DNA concentration (ng)	DNA 提取率 DNA yield (ng g ⁻¹)
CTAB 法 CTAB	0.038	0.023	1.696	19	950
改良 CTAB 法 Modified CTAB method	0.023	0.013	1.769	46	2300
尿素法 Carbamide method	0.034	0.020	1.700	17	850
改良尿素法 Modified carbamide method	0.011	0.006	1.833	22	1100
高盐低 pH 法 High salt, low pH method	0.018	0.011	1.600	9	450
改良高盐低 pH 法 Modified high salt, low pH method	0.034	0.020	1.700	17	850
SDS 法 SDS	0.015	0.009	1.667	7.5	375
改良 SDS 法 Modified SDS method	0.037	0.022	1.682	18.5	925
陈大明法 Chen method	0.010	0.006	1.667	10	500
改良陈大明法 Modified Chen method	0.024	0.013	1.846	24	1200

法 ($A_{260}/A_{280}=2.0$)。从美花石斛干叶中提取 DNA 时 (表 3), 改良的 CTAB 法、尿素法和陈大明法所提取的 DNA 不仅纯度高 ($A_{260}/A_{280} \approx 1.8$), 而且产率也较高, 可达 $1\ 100 - 2\ 300\ \text{ng}\ \text{g}^{-1}$, 而改良高盐低 pH 法和 SDS 法所提取的 DNA 纯度不如上述 3 种方法。鉴于此, 对于美花石斛鲜叶或干叶来讲, 改良 CTAB 法和改良尿素法所得 DNA 纯度高, 产率也较高, 而且稳定性强, 重复性好。

2.2 电泳检测

从电泳检测结果看 (图 1、2), 5 种改良的 DNA 提取方法所得的美花石斛鲜叶或干叶 DNA 均可产生较清晰和稳定的电泳条带 (图 1-II、图 2-II)。从图 2-II 更为清晰地看到, 改良 CTAB 法和改良尿素法效果最好, 所得 DNA 条带较清晰, 浓度较高。但未改良法提取的美花石斛鲜叶或干叶 DNA 电泳条带很弱, 甚至有些没有出现 DNA 带 (图 1-I、图 2-I)。

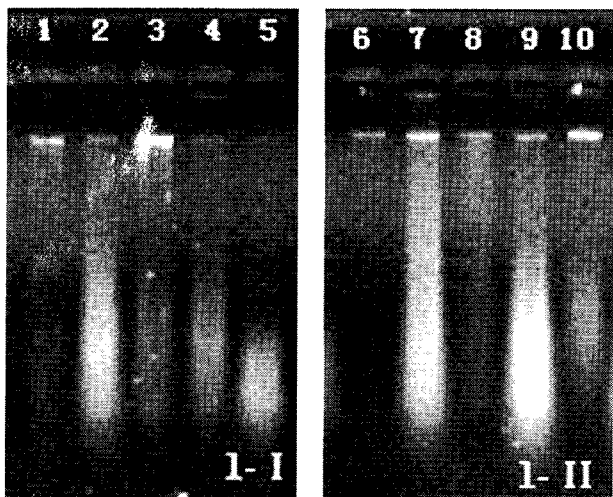


图 1 5 种方法提取鲜叶基因组 DNA 的电泳结果

Fig. 1 Electrophoresis of genomic DNA from fresh leaves of *D. loddigesii* using five extraction methods

1: CTAB 法; 2: 尿素法; 3: 高盐低 pH 法; 4: SDS 法; 5: 陈大明法; 6: 改良 CTAB 法; 7: 改良尿素法; 8: 改良高盐低 pH 法; 9: 改良 SDS 法; 10: 改良陈大明法 (条带编号下同)。Lane 1: By CTAB method; Lane 2: By carbamide method; Lane 3: By high salt, low pH method; Lane 4: By SDS method; Lane 5: By Chen method; Lane 6: By modified CTAB method; Lane 7: By modified carbamide method; Lane 8: By modified high salt, low pH method; Lane 9: By modified SDS method; Lane 10: By modified Chen method (The same as below)

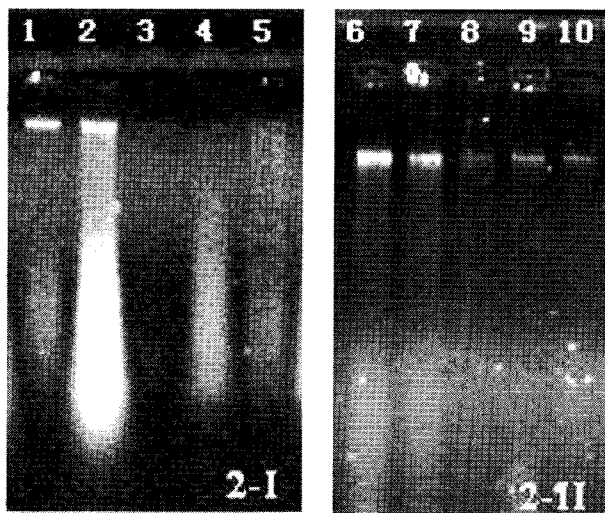


图 2 5 种方法提取干叶基因组 DNA 的电泳结果

Fig. 2 Electrophoresis of genomic DNA from dry leaves of *D. loddigesii* using five extraction methods

2.3 PCR 扩增

用随机引物 S98, 以未改良或改良的 5 种 DNA 提取方法提取获得的 DNA 为模板, 进行 PCR 扩增 (图 3、4)。结果表明, 改良法提取的鲜叶或干叶 DNA 的 RAPD-PCR 扩增条带明显比未改良的多, 条带连续并清楚 (图 3-II、图 4-II), 其中第 6 和第 7 泳道的扩增条带最清晰。但未改良法提取的鲜叶或干叶 DNA 的 RAPD-PCR 扩增条带数目少, 不连续 (图 3-I), 模糊 (图 4-I), 无法进行后续分析。

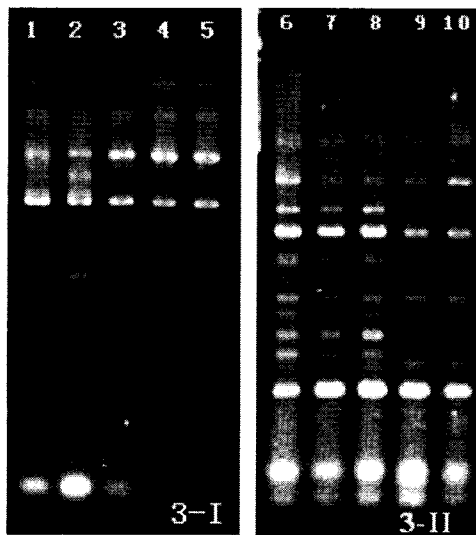


图 3 5 种方法提取鲜叶基因组 DNA 的 RAPD-PCR 扩增结果

Fig. 3 RAPD-PCR amplification of genomic DNA from fresh leaves of *D. loddigesii* using five extraction methods

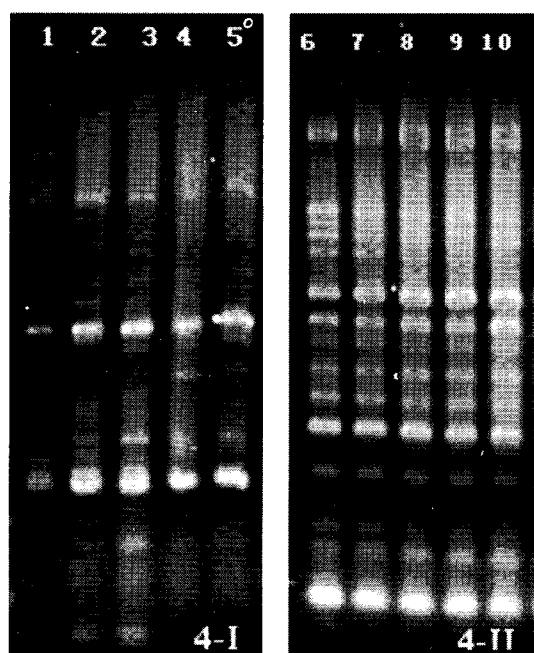


图4 5种方法提取干叶基因组DNA的RAPD-PCR扩增结果
Fig. 4 RAPD-PCR amplification of genomic DNA from dry leaves of *D. loddigesii* using five extraction methods

3 讨论

植物基因组DNA提取常规方法主要有CTAB法、SDS法、高盐低pH法和尿素法等几种。预试验结果表明,利用这些常规方法所提取DNA分子的扩增效果不是很理想(表2、3)。主要原因可能是石斛含有多糖、生物碱和酚类等多种代谢产物,这些物质都可能会影响DNA提取分离,尤其是多糖和酚类物质通常与DNA结合,甚至把DNA的颜色都变成棕褐色。针对这些问题,对常用的5种DNA提取方法进行适当改进,尽可能消除这些物质对DNA提取的影响。例如在提取液中加入聚乙烯吡咯烷酮(PVP)或巯基乙醇,以防止褐化。PVP浓度必须适当,过高会把DNA变得粘稠。另外,巯基乙醇,不仅防止褐化,还防止DNA断裂并重聚为二聚体。增加氯仿:异戊醇(24:1)抽提次数,可以提高除去蛋白质

的效果。

用3种检测方法对上述5种方法提取的DNA质量进行综合检测分析,结果表明改良CTAB法和改良尿素法最适合于美花石斛DNA提取分离,所提取的DNA纯度和产率较高,电泳条带清晰,RAPD-PCR扩增结果比较稳定,重复性好。

参考文献

- [1] Qiao Y S (乔玉山), Zhang Z (章镇), Shen Z J (沈志军). Optimization of for DNA on *Prunus salicina* Lind L. [J]. Shanghai Jiaotong Univ (上海交通大学学报), 2004, 22 (2):138-142. (in Chinese)
- [2] Delectis Florae Reipublicae Popularis Sinicae Agendae Academiae Sinicae Edita. Flora Reipublicae Popularis Sinicae, Tomus 19 [M]. Beijing: Science Press, 1999.
- [3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 2000 版一部 [M]. 化学工业出版社, 2000:70.
- [4] Li S (李墅), Wang C L (王春兰), Guo S X (郭顺星), et al. Advances in studies on components and pharmacol of epiphytic type medicinal plants in the Orohid [J]. Chin J Chin Mat Med (中国中医药杂志), 2005, 30 (19):1489-1496. (in Chinese)
- [5] Zhu S W (朱苏文), Liu W (刘伟). Genomic DNA Extraction and RAPD Analysis from Aired-dried Stem of *Dendrobium candidum* [J]. Acta Laser Biol Sin (激光生物学报), 2005, 14 (3):224-227. (in Chinese)
- [6] Peng R (彭锐), Song H Y (宋洪元), Li Q S (李泉森), et al. Extraction and of DNA from *Dendrobium* [J]. China J Chin Mat Med (中国中医药杂志), 2003, 28 (12):1129-1131. (in Chinese)
- [7] 顾红雅, 礼嘉主译. 植物分子生物学:实验手册 [M]. 北京:高等教育出版社, 1998.
- [8] Guo B L (郭宝林), Lin S (林生). DNA extraction of dried leaves of *Salvia miltiorrhiza* [J]. Chin Trad Herb Drugs (中草药), 2002, 33 (5):418-420. (in Chinese)
- [9] Wang C T (王传堂), Huang Y (黄粤), Yang X D (杨新道), et al. Isolation of DNA from peanut: comparison between modified CTAB and high salt, low pH methods [J]. Peanut Sci Tech (花生学报), 2002, 31 (3):20-23. (in Chinese)
- [10] Chen D M (陈大明), Zhang S L (张上隆), Jin Y F (金勇). A method for genomic DNA preparation of woody fruit crops [J]. J Zhejiang Agric Univ (浙江农业大学学报) 1997, 23 (6):621-624. (in Chinese)