

天麻基因组 DNA 不同提取方法比较

黎晓英^{1,2,3}, 李俊威^{1,2,3}, 刘胜贵^{1,2,3}, 田玉桥⁴, 陈三春⁴, 方伟^{1,2,3}, 邹娟^{1,2,3}, 邱小燕^{1,2,3}, 伍贤进^{1,2,3*}

(1. 怀化学院生物与食品工程学院, 湖南怀化 418008; 2. 民族药用植物资源研究与利用湖南省重点实验室, 湖南怀化 418008; 3. 湘西药用植物与民族植物学湖南省高校重点实验室, 湖南怀化 418008; 4. 湖南省博世康中医药有限公司, 湖南怀化 418008)

摘要 以天麻块茎为供试材料, 采用琼脂糖凝胶电泳检测和紫外分光光度含量测定技术, 比较改良 CTAB 法和 SDS-CTAB 法提取天麻块茎基因组 DNA 的效果。结果表明, 改良 CTAB 法提取天麻块茎基因组 DNA 的产量高于 SDS-CTAB 法, 纯度略次于 SDS-CTAB 法, 二者提取的基因组 DNA, DNA 结构完整、大片的 DNA 分子含量高。该研究为天麻基因组 DNA 提取方法的选择提供了参考依据, 为天麻种质资源的分子遗传研究奠定了一定的科学与技术基础。

关键词 天麻; 基因组 DNA; SDS-CTAB 法; 改良 CTAB 法

中图分类号 Q 943 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2019)22-0111-02

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2019.22.035



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Comparison of Different Extraction Methods of Genome DNA in *Gastrodia elata* B1.

LI Xiao-ying^{1,2,3}, LI Jun-wei^{1,2,3}, LIU Sheng-gui^{1,2,3} et al (1. College of Biological and Food Engineering, Huaihua University, Huaihua, Hunan 418008; 2. Key Laboratory of Research and Utilization of Ethnomedicinal Plant Resources of Hunan Province, Huaihua, Hunan 418008; 3. Key Laboratory of Xiangxi Medicinal Plant and Ethnobotany of Hunan Higher Education, Huaihua, Hunan 418008)

Abstract Taking *Gastrodia elata* B1. tuber as material, agarose gel electrophoresis and ultraviolet spectrophotometry were used to compare the effects of improved CTAB and SDS-CTAB on genomic DNA from rhizoma tuber of *G. elata*. The results showed that the yield of genomic DNA extracted from *G. elata* tubers by improved CTAB method was higher than that by SDS-CTAB method, and the purity was slightly lower than that by SDS-CTAB method. The results provided a reference for selecting genomic DNA extraction methods of *G. elata* and laid a scientific and technical foundation for the molecular genetic research of *G. elata* germplasm resources.

Key words *Gastrodia elata* B1.; Genomic DNA; SDS-CTAB method; Improved CTAB method

天麻为常用名贵中药, 是三科植物天麻(*Gastrodia elata* B1.)的茎块, 植株生长于海拔 400~3 200 m 的林下、林中空地、林边缘及灌丛边缘, 为国家二级保护植物。其根茎入药用以治疗头晕目眩、肢体麻木、小儿惊风癫痫抽搐等症, 同时还具有刺激神经系统、健脑、延缓衰老、增强机体免疫力和预防骨质疏松等作用^[1-2]。因天麻特殊的生物学特性——没有一般植物所具有的叶片, 加上含丰富的蛋白质、较高的多糖和酚类、酶类及其他次生代谢物, 使得其基因组 DNA 的提取比较困难。传统的提取方法常常导致基因组 DNA 产量过低、杂质较多、DNA 不纯、质量较难控制等许多问题, 提取物仅可满足普通的分子生物学试验分析的需要, 因此众多学者对中药材基因组 DNA 提取方法进行过探讨^[3-5]。关萍等^[6]对天麻基因组 DNA 提取方法进行了比较研究, 认为 SDS-CTAB 法是较理想的提取方法; 张弦等^[7]证明 SDS-CTAB 法提取 DNA 完整、纯度高、重复性好; 程纪伦等^[8]应用 CTAB 法和改良的 CTAB 法提取天麻基因组 DNA, 结果表明改良 CTAB 法提取的天麻基因组 DNA 产量高、纯度高。但是, 提取天麻基因组 DNA 究竟采用改良 CTAB 法效果好还是 SDS-CTAB 法好, 还有待考证。基于天麻基因组 DNA 提取方法的研究现状, 笔者将应用改良 CTAB 法和 SDS-CTAB 法对天麻基因组 DNA 提取效果进行比较研究。

1 材料与方法

1.1 材料 供试天麻为采集于湖北、陕西等地区的新鲜天麻, 由湖南省博世康中医药有限公司提供。

1.2 主要试剂

1.2.1 改良 CTAB 法主要试剂。 CTAB, 氯仿:异戊醇(24:1), RNase A, 异丙醇, 无水乙醇, TE。

1.2.2 SDS-CTAB 法主要试剂。 β -巯基乙醇, 蛋白酶 K, SDS, CTAB, 氯仿:异戊醇(24:1), RNase A, NaAc, 无水乙醇, TE。

1.3 方法

1.3.1 改良 CTAB 法。 取天麻细小块状物约 0.5 g 放入研钵中, 加入 1 mL 预热的 CTAB 提取液, 研磨; 将细粉末转移到 1.5 mL 的 Eppendorf 管中, 再加 CTAB 提取液至 1.5 mL, 置于 65 °C 水浴中保温 1 h; 从水浴中取出离心管, 冷却至室温, 再 12 000 r/min 离心 10 min, 然后吸取上清液放至另一干净已灭菌的 1.5 mL Eppendorf 管中, 同时加入同样体积的氯仿:异戊醇(24:1), 轻缓颠倒混匀, 12 000 r/min 离心 5 min, 然后吸取上清液放至另一干净已灭菌的 1.5 mL Eppendorf 管中, 同时加入同样体积的异丙醇, 混匀, 放置在 -20 °C 冰箱中 60 min; 12 000 r/min 离心 15 min 获得 DNA 沉淀, 70% 乙醇洗 2 次, 沉淀自然干燥; 加入 30 μ L TE 缓冲液或者去离子水(含有 10 μ g/mL RNase A)溶解 DNA, 并贮存在 4 °C 冰箱中。

1.3.2 SDS-CTAB 法。 将 1.5 mL 的 Eppendorf 管中装 70 μ L β -巯基乙醇, 置于 -20 °C 冰箱中预冷, 取天麻细小块状物约 0.5 g, 置于预冷的离心管中, 同时快速加入 40 μ L 10 mg/mL 蛋白酶 K, 混合; 加入 56 °C 预热 SDS 700 μ L, 混匀, 56 °C 水

基金项目 湖南省战略性新兴产业科技攻关项目(2016GK4052); 湖南省双一流学科建设及怀化市科技创新人才团队扶持项目。

作者简介 黎晓英(1976—), 女, 土家族, 湖南张家界人, 讲师, 硕士, 从事植物资源评价与分子生物学研究。* 通信作者, 教授, 博士, 硕士生导师, 从事药用植物学与分子生物学研究。

收稿日期 2019-05-16; **修回日期** 2019-05-28

浴 120 min, 然后取出, 冷却至室温, 加入 1/2 体积 100 g/L CTAB, 56 °C 水浴 30 min, 取出, 冷却至室温, 再 12 000 r/min 离心 10 min, 然后吸取上清液放至另一干净已灭菌的 1.5 mL Eppendorf 管中, 同时加入同样体积的氯仿: 异戊醇 (24:1), 混合 30 min, 12 000 r/min 离心 12 min, 取上清液重复操作一次。取上清液至另一无菌 Eppendorf 管中, 加入 -20 °C 预冷的 1/10 体积 3 mol/L NaAc 和 2 倍体积无水乙醇, 置 -20 °C 冰箱中沉淀 60 min, 12 000 r/min 离心 10 min。用 70% 冷乙醇洗涤沉淀 2 次, 每次 12 000 r/min 离心 10 min, 沉淀自然干燥; 加入 30 μ L TE 缓冲液或者去离子水 (含有 10 μ g/mL RNase A) 溶解 DNA, 并贮存在 4 °C 冰箱中。

1.4 基因组 DNA 的电泳检测

1.4.1 配制 1% 琼脂糖凝胶。用电子天平称取琼脂糖粉 1 000 mg, 置于锥形瓶中, 加入 1 \times TBE 溶液 100 mL, 充分摇匀, 将该锥形瓶直接加热至 TBE 溶液沸腾, 煮沸 20 s, 视觉判断琼脂糖粉完全溶解, 取出加入一滴 EB (约 20 μ L), 缓慢摇匀后, 自然降温至 55 °C 左右 (以不烫手背为宜)。然后, 放置好制胶器, 插好挡板, 按要求在固定处放好梳子, 再将溶液缓缓倒入胶槽, 室温下放置 1 h 左右, 待凝胶冷却凝固后, 轻轻移去梳子, 去掉挡板, 将凝胶板置于含有 TBE 缓冲液的水平电泳槽中。

1.4.2 上样。取 2 μ L 上述 2 种方法提取的 DNA 混入少量的溴酚蓝 (大约是样品量的 1/10), 混匀后全部点入梳子孔内, 注意留出第一孔位置加入等量的 DNA 分子量标记。

1.4.3 恒压电泳。接通电源后, 调节电压至 100 V, 启动电泳, 恒压电泳 1.5~2.0 h, 根据溴酚蓝距离点样孔的位置来判断电泳进程。

1.4.4 拍照。将凝胶从凝胶板上取下, 采用凝胶成像仪拍照。

1.5 DNA 的紫外检测 蛋白质的最大吸收波长为 280 nm, 核苷酸为 260 nm, 测波长分别为 260、280 nm 时的 OD 值进行比较, 分析 DNA 的浓度和纯度。先用 2 mL 双蒸水校正紫外分光光度计的零点, 用微量移液器取 DNA 样品 2 μ L, 加双蒸水稀释 10 倍并充分混匀后, 全部转入专用比色皿中, 分别读出其在不同波长下的 OD 值, 然后计算 DNA 样品的浓度。DNA 样品浓度 (μ g/ μ L) = OD₂₆₀ \times 核酸稀释浓度 \times 50/1 000。

2 结果与分析

2.1 改良 CTAB 法提取的天麻基因组 DNA 产量及纯度分析

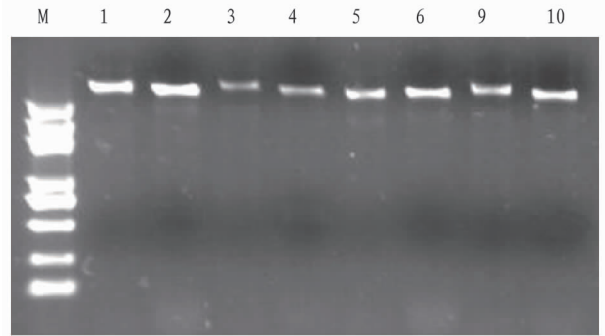
2.1.1 基因组 DNA 的琼脂糖凝胶电泳检测。运用改良 CTAB 法提取的天麻基因组 DNA 琼脂糖凝胶电泳检测结果如图 1, DNA 条带亮度高, 无明显杂带。

2.1.2 DNA 产量及纯度分析。该方法提取 DNA 的 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值为 1.756, <1.8, 表明 DNA 中存在少量的杂质; 根据 OD₂₆₀ 计算所提取的 DNA 浓度为 1.513 μ g/ μ L。

2.2 SDS-CTAB 法提取的天麻基因组 DNA 产量及纯度分析

2.2.1 基因组 DNA 的琼脂糖凝胶电泳检测。运用 SDS-

CTAB 法提取天麻基因组 DNA 后, 取样 2 μ L 进行琼脂糖凝胶电泳检测, 结果如图 2, DNA 条带亮度好, 无杂带。

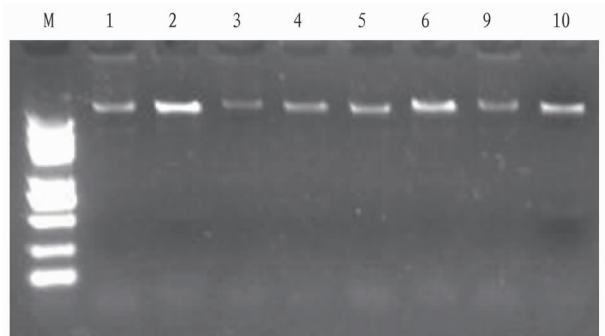


注: M 为分子量标记, 1~10 为提取的基因组 DNA

Note: M is the molecular weight marker; 1-10 are the extracted genomic DNA

图 1 改良 CTAB 法提取的天麻基因组 DNA 电泳结果

Fig.1 The results of genomic DNA electrophoresis of *Gastrodia elata* extracted by improved CTAB



注: M 为分子量标记, 1~10 为提取的基因组 DNA

Note: M is the molecular weight marker; 1-10 are the extracted genomic DNA

图 2 SDS-CTAB 法提取的天麻基因组 DNA 电泳结果

Fig.2 The results of genomic DNA electrophoresis of *Gastrodia elata* extracted by SDS-CTAB

2.2.2 DNA 产量及纯度分析。该法提取 DNA 的 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值为 1.822, 接近 1.80, 表明 DNA 纯度比较高, 污染比较少; 根据 OD₂₆₀ 计算所提取的天麻基因组 DNA 浓度为 1.296 μ g/ μ L。

3 讨论

2 种方法提取的天麻基因组 DNA 琼脂糖凝胶电泳结果显示, 改良 CTAB 法的条带亮度明显优于 SDS-CTAB 法。SDS-CTAB 法使用了 β -巯基乙醇、蛋白酶 K、SDS, 这些试剂的共同作用均可分解蛋白质, 便于 DNA 解离, 但是 β -巯基乙醇为高毒试剂, 且气味难闻。SDS-CTAB 法耗时较改良 CTAB 法长, 操作步骤较多, 操作过程难免造成 DNA 损失。因此, SDS-CTAB 法得到的 DNA 纯度比改良 CTAB 法高, 产量比改良 CTAB 法低。

天麻块茎多糖类和酚类物质的含量相当高, 在试验中有效筛选和改进不同的基因组 DNA 的提取方法对获得高质量的基因组 DNA 十分重要, 也是对天麻物种进行分子生物学研究的重要前提^[9]。通过改良 CTAB 法和 SDS-CTAB 法提

(下转第 174 页)

出于保护消费者健康角度,建议啞菌酯、多菌灵、腐霉利、吡唑啉菌酯、氯氟氰菊酯、苯醚甲环唑、氯氟菊酯、啞霉胺、溴氰菊酯、甲霜灵 10 种农药残留限量仍保持原有规定,针对吡虫啉、丙环唑 2 种我国尚未制定最大残留限量和异菌脲、咪鲜胺 2 种最大残留限量比最大残留限量估计值高的农药,在参考国际食品法典、欧盟、美国、日本、澳大利亚、韩国、新西兰的最大残留限量值(中国农药信息网农药最大残留限量数据库中查询)设定后,建议其最大残留限量分别设为 6、7、6、1 mg/kg。

3.3 影响风险评估结果的因素 调查发现的几种种植户常用农药戊唑醇、氟虫脲、肟菌酯、抑霉唑、啞虫脒、烯啶吡啶未在此次监测范围,若扩大监测范围,葡萄样品农药残留风险可能会相应增加。

参考文献

- [1] 王冬群,华晓霞.慈溪市葡萄农药残留膳食摄入风险评估[J].食品安全质量检测学报,2017,8(3):1018-1024.
- [2] 刘河疆,康露,华震宇,等.新疆鲜食葡萄产区农药残留风险评估[J].江西农业大学学报,2018,40(4):714-724.
- [3] 中华人民共和国农业部.蔬菜和水果中有机磷、有机氯、拟除虫菊酯和氨基甲酸酯类农药多残留的测定:NY/T 761—2008[S].北京:中国农业出版社,2008.
- [4] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会,中华人民共和国农业部,国家食品药品监督管理局.水果和蔬菜中 500 种农药及相关化学品残留量的测定 气相色谱-质谱法:GB 23200.8—2016[S].北京:中国农业出版社,2008.
- [5] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局,中国国家标准化管理委员会.水果和蔬菜中 450 种农药及相关化学品残留量的测定 液相色谱-串联质谱法:GB/T 20769—2008[S].北京:中国农业出版社,2008.
- [6] 赵敏娟,王灿楠,李亭亭,等.江苏居民有机磷农药膳食暴露急性风险评估[J].卫生研究,2013,42(5):844-848.

(上接第 112 页)

取天麻基因组 DNA 的比较研究表明,改良 CTAB 法提取天麻块茎基因组 DNA 的产量优于 SDS-CTAB 法,虽然改良 CTAB 法提取的 DNA 纯度略差,但是二者提取的 DNA 片段完整无断裂,主要原因是 2 种方法都使用了 CTAB,CTAB 具有从大量产生黏多糖的有机体中制备纯化 DNA 的特性。CTAB 属于一种带阳离子的表面活性剂,具有较好的化学特性,即在溶液中离子强度低的情况下,可以沉淀核酸和酸性多聚糖,在溶液中离子强度高的情况下,CTAB 与蛋白质和非酸性多聚糖形成复合物而不能沉淀 DNA 和 RNA^[10]。提取基因 DNA 必须考虑后续分子生物学研究,倾向于选择无杂质且 DNA 片段完整的提取方法。

在天麻块茎基因组 DNA 提取过程中务必始终注意以下几点:①研钵、吸头、配制的试剂要按照要求进行灭菌,运用 SDS-CTAB 法时,研钵和部分试剂要在低温冰箱中预冷,尽可能地减少外来污染和 DNA 降解;②研磨材料的力度应该适当,太小造成细胞破裂不充分,影响 DNA 得率,过大可能损坏 DNA 分子,所以在整个研磨过程中,应该保持用力均匀且方向一致;③操作过程避免剧烈振荡,以减少 DNA 断裂,

- [7] 葛继云,李志霞,刘传德,等.苹果农药残留风险评估[J].中国农业科学,2014,47(18):3655-3667.
- [8] 张志恒,汤涛,徐浩,等.果蔬中氯吡啶残留的膳食摄入风险评估[J].中国农业科学,2012,45(10):1982-1991.
- [9] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会,中华人民共和国农业部,国家食品药品监督管理局.食品中农药最大残留限量:GB 2763—2016[S].北京:中国农业出版社,2016.
- [10] Food and Agriculture Organization of the United Nations(FAO).Submission and Evaluation of Pesticide Residues Data for Estimation of Maximum Residue Levels in Food and Feed (FAO Plant Production and Protection Paper197)[M].2nd ed.Rome:FAO,2009.
- [11] WHO(World Health Organization).A template for the automatic calculation of the IESTI[EB/OL].[2015-05-08].www.who.int/entity/foodsafety/chem/IESTI_calculation_13c.xlt.
- [12] 高仁君,陈隆智,张文吉.农药残留急性膳食风险评估研究进展[J].食品科学,2007,28(2):363-368.
- [13] The Veterinary Residues Committee-Annual Report on Surveillance for Veterinary Residues in Food in the UK 2010[EB/OL].[2018-11-05].http://www.vmd.defra.gov.uk/VRC/pdf/reports/vrcar2010.pdf.
- [14] The Veterinary Residues Committee-Matrix Ranking Subgroup Minutes of the meeting held on Wednesday 4 September 2013 at the VMD[EB/OL].[2018-11-05].http://www.vmd.defra.gov.uk/VRC/pdf/papers/2013/vrc1334.pdf.
- [15] 国家技术监督局.农药登记毒理学试验方法:GB 15670—1995[S].北京:中国标准出版社,1996.
- [16] 食品伙伴网.食品数据库.农药药数据库[DB/OL].[2018-11-01].http://db.foodmate.net/pesticide/show_45.html.
- [17] 中华人民共和国农业部农药检定所.中国农业信息网[DB/OL].[2018-11-05].http://www.icama.org.cn/hysj/index.jhtml.
- [18] WHO(World Health Organization).Inventory of evaluations performed by the Joint Meeting on Pesticide Residues (JMPR)[DB/OL].[2018-11-05].http://apps.who.int/pesticide-residues-jmpr-database/Home/Range/All.
- [19] 柴勇,杨俊英,李燕,等.基于食品安全指数法评估重庆市蔬菜中农药残留的风险[J].西南农业学报,2010,23(1):98-102.
- [20] 中华人民共和国农业部农药检定所.中国农业信息网[DB/OL].[2018-11-05].http://202.127.42.84/tbt-sps/mlrsdb/mlrsdb.do.

动作尽量温和,保持 DNA 完整;④操作要规范,在制备琼脂糖凝胶时要避免产生气泡,上样电泳时移液器吸头不能插入胶中或划破胶孔,电泳时先高电压再低电压;⑤紫外分光光度计测定 DNA 样品时,使用 TE 缓冲液作为溶解 DNA 的溶液比较好,是由于 TE 缓冲液保持了低离子浓度,可以保证读数准确。

参考文献

- [1] 袁崇文.中国天麻[M].贵阳:贵州科技出版社,2002.
- [2] 周铨,杨兴华,梁汉兴,等.天麻形态学[M].北京:科学出版社,1987.
- [3] 徐昌艳,雷丹丹,曹旭林,等.天冬药材基因组 DNA 提取方法研究[J].安徽农业科学,2019,47(8):171-173.
- [4] 方强强,王燕,岩陀 DNA 提取方法研究[J].井冈山大学学报(自然科学版),2019,40(2):19-24.
- [5] 陈力群,谭晴晴,陈雪燕,等.桑黄基因组 DNA 提取方法优化及分子鉴定[J].山东农业科学,2019,51(1):18-21,31.
- [6] 关萍,康冀川,邹容,等.兰科植物天麻基因组 DNA 提取方法的比较研究[J].山地农业生物学报,2004,23(5):422-425.
- [7] 张弦,张小蕾.天麻基因组 DNA 提取方法的选择和优化[J].吉林医学,2010,31(9):1219.
- [8] 程纪伦,范爱辉,陈琦.高质量天麻基因组 DNA 的提取[J].广东农业科学,2009(8):153-155.
- [9] 陈宗礼,陈昱宇,王睿婷,等.组培枣苗基因组 DNA 提取方法及其含量的比较[J].基因组学与应用生物学,2011,30(1):110-116.
- [10] 魏群.分子生物学试验指导[M].北京:高等教育出版社,1999.