

# 三种罗布麻干燥叶片基因组 DNA 的提取方法

张卫明<sup>1,2</sup>, 王曼丽<sup>1</sup>, 彭雪梅<sup>1</sup>, 薛华杰<sup>1</sup>, 陆长梅<sup>1</sup>

(1 南京师范大学生命科学院, 江苏 南京 210097, 2 南京野生植物综合利用研究院, 江苏 南京 210042)

**[摘要]** 采用 Qiagen 的植物基因组 DNA 提取试剂盒并加以改进, 首次从不同季节采收、不同干燥方法保存的三种罗布麻 (罗布红麻、大叶白麻和白麻) 干燥叶片中提取出基因组 DNA。提取的基因组 TE 溶解液的  $OD_{260} / OD_{280}$  值多在 1.7~1.9 范围内, 电泳呈现单条带, 核基因组的 ITS 片段、叶绿体基因组的 tmL 内含子和 tmL-F 非编码区片段的 PCR 扩增条带清晰并能进行 DNA 测序, 这表明基因组 DNA 质量较好, 可以满足后续分子生物学实验的要求。本研究为罗布麻等中药材的进一步分子生物学研究提供了必要的技术基础。

**[关键词]** 罗布麻叶, DNA 提取, PCR

**[中图分类号]** S563.7 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1001-4616(2007)01-0102-04

## Isolation of Genomic DNA From Dried Leaves of Three Kinds of Luobum a

Zhang Weiming<sup>1,2</sup>, Wang Manli<sup>1</sup>, Peng Xuemei<sup>1</sup>, Xue Huajie<sup>1</sup>, Lu Changmei<sup>1</sup>

(1. School of Life Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China)

(2. Nanjing Institute for Comprehensive Utilization of Wild Plant, Nanjing 210042, China)

**Abstract** Genomic DNA was first isolated from dried leaves of Luobum a by the modified method of the Qiagen DNeasy plant mini kit. Results showed that by this method genomic DNA could be isolated from Luobum a leaves of three species being collected at different seasons and being preserved by different methods. The  $OD_{260} / OD_{280}$  ratios of the isolated DNA were in the range of 1.7~1.9, and only one band presented in agarose gels. Clear PCR bands of ITS rDNA and tmL intron, tmL-F non-coding cpDNA could be sequenced. All the above revealed that the isolated DNA was complete and it could fulfill further denaturation and formolecular biological experiment.

**Key words** leaves of Luobum a, DNA isolation, PCR

## 0 引言

通常人们所说的罗布麻在中国有大叶白麻 (*Poacynum hendersonii*)、白麻 (*P. pictum*) 和罗布红麻 (*Apoacynum venetum*) 3种植物, 它们均是具有许多优良性状的野生植物资源<sup>[1]</sup>。目前国内外对它们的研究多是围绕其比较解剖以及药用等方面展开<sup>[2,3]</sup>, 而在分子水平的研究较少。

完整的基因组 DNA 提取是分子生物学研究的起点, 也是实验中最关键的一步。由于罗布麻叶片含有较多的乳汁、多糖、黄酮类及蛋白质等多种物质; 我国优良的罗布麻资源又多分布在新疆、甘肃等气候条件恶劣的边远地区, 采集时很难有冷冻等较好的保存条件, 很难获得与保存; 我国的罗布麻资源正在急剧减小, 原先分布于新疆、甘肃的白麻在我们的 2005 年全国罗布麻资源调查中已难觅踪迹, 现在人们所能见到的仅是保存在各标本馆中的标本; 药用、茶用、烟用等的罗布麻叶片又采用干燥法保存, 要从以上这些材料中获得完整的基因 DNA 并进而进行分子鉴定、系统演化等分子生物学研究均有一定的技术难度。这也是目前罗布麻相关分子生物研究较少的原因所在。因此急需寻找一种能够从自然干燥与标本罗布麻样本中提取完整基因组 DNA 的方法。

收稿日期: 2006-09-26 修回日期: 2006-10-20

基金项目: “十五”科技攻关基金 (2004BA502B10)、江苏省高新技术研究计划 (BG2006318) 资助项目。

作者简介: 张卫明 (1957-), 教授, 博士生导师, 主要从事野生植物资源的开发和利用研究。E-mail: botanyzt@163.com

通讯联系人: 陆长梅 (1969-), 女, 副教授, 主要从事植物学的教学与研究。E-mail: lchangmei@njnu.edu.cn

本实验通过比较实验室常用 DNA 提取方法与不同市售试剂盒方法, 并对 Q iagen 试剂盒方法进行改进, 首次从不同季节采收与不同方法保存的罗布麻干燥叶片中提取出完整基因组 DNA. 这为进一步从分子生物学方面研究罗布麻提供了一个技术基础.

## 1 材料与方方法

### 1.1 材料

实验所用材料包括 2 个属 3 个分类群的 8 个地区的植物样本. 材料的采集地、采集时间与贮藏方法等详见表 1, 材料最终由南京野生植物研究院的肖正春教授鉴定.

表 1 罗布麻材料名称、来源、不同罗布麻样本的基因组 DNA 提取结果比较以及部分序列 GenBank 序列号

Table 1 Lubum a san ples from different localities used in this study, efficiency comparison of genomic DNA isolated from different san ples and some DNA regions' GenBank accession number

中文名	植物学名	采集地	采集时间	干燥方法	纯度 (OD <sub>260</sub> /OD <sub>280</sub> )	GenBank 序列登录号		
						ITS	tmL 内含子	tmL-F 间隔区
罗布红麻	<i>A. venetum</i> Linn. Sp. Ed	内蒙通辽扎旗	2005-10	自然	1.82	DQ 449485	DQ 463213	DQ 463212
		新疆库尔勒	2005-7	硅胶	2.04			
		甘肃玉门	2005-8	自然	1.63			
		河南三门峡	2005-9	硅胶	1.75			
		江苏东台	2005-9	硅胶	1.78			
大叶白麻	<i>P. hendersonii</i> (Hook. F.) Woodson	新疆库尔勒	2005-7	硅胶	1.67	DQ 451831	DQ 463215	DQ 463214
		青海柴达木	2005-9	自然	1.76			
		甘肃玉门	2005-8	自然	1.87			
白麻	<i>P. pictum</i> (Schrenk) Baill	宁夏中巴	1988	压制标本	1.82	DQ 451830	DQ 463216	DQ 463217

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 DNA 提取法

为了提取罗布麻干燥叶片中的基因组 DNA, 实验首先尝试了 3 种常用市售试剂盒 (上海申能博采 3S Spin Plant 试剂盒、安徽优晶 H. Q. & Q. 试剂盒、Q iagen DNeasy plant mini kit) 与实验室常用的 CTAB 与 SDS 综合法<sup>[4]</sup>, 但均未成功. 在此基础上又分别对 H. Q. & Q. 法和 Q iagen 法进行改进, 具体方法如下:

改进的 H. Q. & Q. 法: 在材料直接经液氮研磨成粉末后, 向每一份样品粉末中加入 800 μL 的 ZW-1 和 DTT 至终浓度为 40 mg/mL, 强烈漩涡振荡混匀后再加入 2 μL 木瓜蛋白酶 (Sigma 公司) 至终浓度 50 mg/mL, 37°C 条件下振荡 (140 r/min) 温浴 12 h 以下按试剂盒说明书步骤进行, 直至去除蛋白. 去除蛋白后, 加入 5 mol/L 的 NaCl 溶液至终浓度 2.5 mol/L, 再加入 0.7 倍体积的异丙醇, 沉淀 DNA 去除多糖. 后续操作按试剂盒说明书进行.

改进的 Q iagen 法: 采用 Q iagen DNeasy plant mini kit 在材料直接经液氮研磨成粉末后, 向每一份粉末中加入裂解液后, 再加入木瓜蛋白酶 (Sigma 公司) 至终浓度 50 mg/mL 和 DTT 至终浓度 40 mg/mL (Sigma 公司), 37°C 条件下, 振荡 (140 r/min) 温浴 12 h 其余操作按试剂盒说明书进行.

#### 1.2.2 DNA 纯度与基因组 DNA 完整性检测

DNA 纯度测定采用紫外分光光度法. 基因组完整性检验采用电泳法.

#### 1.2.3 ITS 片段、tmL 内含子和 tmL-F 非编码区片段的扩增

基因组 DNA ITS 区 (包括 ITS1、5.8S 和 ITS2) 扩增选用 White 等<sup>[5]</sup>设计的 ITS 通用引物 ITS4 和 ITS5, tmL 内含子与 tmL-F 非编码区扩增选用 Taberlet 等<sup>[6]</sup>设计的通用引物“c”和“e”. PCR 反应分别得到 ITS 片段和 tmL 内含子与 tmL-F 非编码区片段的扩增产物.

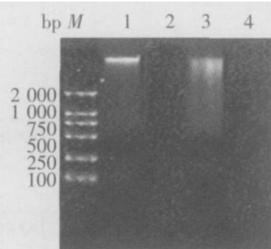
#### 1.2.4 DNA 测序与序列确定

PCR 产物经 1% 常规琼脂糖凝胶电泳分析, 目的条带经纯化后, 直接作测序模板, 用 PCR 扩增引物测序. 所得各样品的 ITS 区、tmL 内含子和 tmL-F 非编码区序列始末端的决定, 均参考了 GenBank 中相关属植物的相应序列, 各序列均已被 GenBank 收录, 具体登录号详见表 1.

## 2 结果与分析

### 2.1 不同植物基因组 DNA 提取方法比较

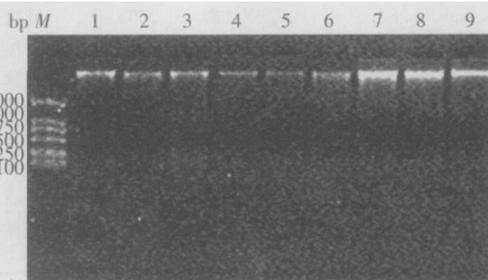
首先以内蒙通辽扎旗地区的自然干燥罗布红麻叶片进行基因组 DNA 提取试验. 虽然 3 种常用植物基因组 DNA 提取试剂盒以及常用 CTAB 与 SDS 综合法均未能从罗布红麻自然干燥叶片中提取得基因组 DNA (部分结果见图 1- 2, 4), 但发现在使用 3S Spin Plant 法、H. Q. & Q. 法和 CTAB 与 SDS 综合法时, 醇沉后, 均有透明胶状物析出, 且只有 H. Q. & Q. 法的醇沉物中有少量白色絮状物 (紫外与电泳检测是 DNA); 而使用 Qiagen 法没有任何物质析出. 以上结果显示, 除 Qiagen 试剂盒法外, 其余 4 种方法未能彻底去除多糖, 而 5 种方法均未能很好释放 DNA. 据此, 参照提取动物标本基因组 DNA 的提取方法<sup>[7]</sup>, 改进 H. Q. & Q. 法和 Qiagen 法. 结果显示: 改进 H. Q. & Q. 法, 可以去除多糖, 但 TE 溶解液的 OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 为 1.57, 电泳条带呈弥散状 (图 1- 3), 显示提取的 DNA 纯度不高, 也不完整; 而改进的 Qiagen 法可以从自然干燥的罗布红麻叶片中提取出高纯度的基因组 DNA (OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> = 1.82), 电泳结果亦显示提取的基因组 DNA 为单条带 (图 2), 初步表明提取的基因组 DNA 完整度较高.



1:改进 Qiagen 法; 2:Qiagen 法;  
3:改进 H.Q.&Q.法; 4:H.Q.&Q.法

图 1 不同方法提取的内蒙通辽扎旗罗布红麻基因组 DNA 比较

Fig.1 Comparison of isolating genomic DNA from leaves of *A.venetum* by different methods



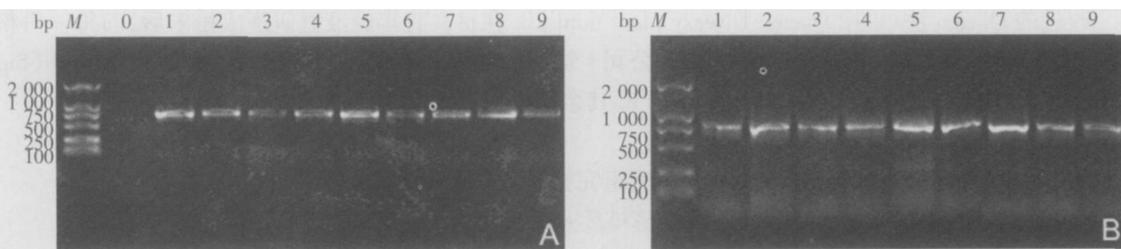
1. 内蒙通辽扎旗罗布红麻; 2. 新疆库尔勒罗布红麻; 3. 甘肃玉门市罗布红麻;  
4. 河南三门峡罗布红麻; 5. 江苏东台罗布红麻; 6. 新疆库尔勒大叶白麻;  
7. 青海柴达木大叶白麻; 8. 甘肃玉门市大叶白麻; 9. 宁夏中巴县白麻

图 2 不同样本基因组 DNA 提取结果比较

Fig.2 Comparison of genomic DNA isolated from leaves of different samples

### 2.2 不同种类、不同保存方法的罗布麻叶片提取效果比较

为检验该方法适用范围, 进一步选取了三种罗布麻的样本, 取材时间从 7 月到 10 月不等, 干燥方法则有自然干燥、硅胶干燥和长期的压制标本干燥 (具体见表 1). 这些材料统一用改进的 Qiagen 法提取基因组 DNA, 提取结果见表 1 与图 2 结果显示: 虽然不同的植物样本在提取时条带亮度不是很一致, 但纯度均相对较高, 而且基因组 DNA 均没有发生降解.



0: 以改进 H.Q. & Q. 法提取的内蒙通辽扎旗罗布红麻基因组 DNA 作为模板; 1-9: 均为改进 Qiagen 法提取的基因组 DNA 做为模板。

1: 内蒙通辽扎旗罗布红麻; 2: 新疆库尔勒罗布红麻; 3: 甘肃玉门市罗布红麻; 4: 河南三门峡罗布红麻; 5: 江苏东台罗布红麻; 6. 新疆库尔勒大叶白麻; 7: 青海柴达木大叶白麻; 8: 甘肃玉门市大叶白麻; 9: 宁夏中巴县白麻

图 3 ITS 序列 (包括 ITS1、ITS2 和 5.8 S) (A) 和 trnL 内含子与 trn L-F 非编码区序列 (B) PCR 扩增结果

Fig.3 PCR results of ITS (including ITS1, ITS2 and 5.8 S) (A) and trnL intron, trn L-F noncoding regions (B)

### 2.3 不同罗布麻样本提取基因组 DNA 的质量检测

植物基因组 DNA 包括核基因组、细胞器 (包括叶绿体和线粒体) 基因组两个部分. 为进一步检验提取基因组的完整性, 并检验提取的基因组 DNA 是否适用于分子生物学研究, 分别选择位于核基因组部分的 ITS 片段和位于叶绿体基因组部分的 trnL 内含子与 trnL-F 非编码区片段作为 PCR 扩增对象, 图 3- A 与

图 3- B 分别是 ITS 片段和 tmL 内含子与 tmL- F 非编码区片段扩增电泳图谱结果。电泳图谱显示: 应用改进的 H. Q. & Q. 法虽然可以提取出部分 DNA, 但未能从中扩增出条带 (图 3- A- 0); 而用改进的 Qiagen 法提取的基因组 DNA 作为模板, 均可扩增出清晰的 ITS 和 tmL 内含子与 tmL- F 非编码区片段 PCR 条带; 并且回收的这些 PCR 产物均可很好地完成 DNA 的测序工作, 所得罗布红麻、大叶白麻和白麻的 ITS、tmL 内含子与 tmL- F 非编码区片段的序列均已登录 GenBank, 其具体序列号详见表 1。以上结果表明: 用改进 Qiagen 法提取的不同方法保存的 3 种罗布麻叶片基因组 DNA, 完整度较高、质量较好, 包含了完整的细胞核与细胞器基因组 DNA。

### 3 讨论

实验室常规方法以及常见市售试剂盒均不能从干燥罗布麻叶片中提取出基因组 DNA。由于使用的是干燥叶片, 且根据应用上述方法提取时的现象与检测结果, 推测 DNA 提取困难的主要原因可能由于绝大部分 DNA 未能从细胞或组蛋白中释放。而从乙醇保存的动物标本中提取基因组 DNA 时, 由于乙醇的作用使细胞内 DNA 和蛋白质交联现象严重, 多采用蛋白酶 K 长时间水解释放的方法<sup>[7]</sup>。借鉴这一做法, 在裂解植物材料时加入了木瓜蛋白酶, 并在 37℃ 条件下, 振荡 (140 r/min) 温浴 12 h 长时间的振荡是为了尽可能彻底地将组蛋白降解以释放 DNA, 而将温度从 65℃ 降低到 37℃ 是为了尽量长时间保持蛋白水解酶活性以达到最佳降解效果; 此外加入 DTT 则是为了防止组织的褐变。实验结果显示: 改进的 Qiagen 法均可以从不同生长时期与不同方法保存的 3 种罗布麻叶片中提取到包括细胞核和细胞器基因组在内的完整基因组; 用提取的基因组 DNA 作为模版可以分别扩增出位于细胞核和叶绿体基因组上的基因序列, 并且 PCR 产物可以完成测序工作。以上结果不仅显示用改进 Qiagen 法提取的基因组 DNA 可以适用于常规的分子生物学实验, 而且罗布红麻、大叶白麻和白麻的 DNA 序列的测出, 也为罗布麻相关的分子生物学与系统分类学研究提供了一个基础。该方法还为相关属干燥药材与植物标本完整基因组 DNA 的提取提供了一个很好的借鉴。

### [参考文献]

- [1] 蒋英, 李秉滔. 中国植物志 (第六十三卷) [M]. 北京: 科学出版社, 1977: 157-165.
- [2] 马骥, 李俊祯, 刘新民. 罗布麻与大花罗布麻种子微结构特征 [J]. 西北植物学报, 2000, 20(3): 476-479.
- [3] Kwan C Y, Zhang W B, Nishibe S et al. A novel in vitro endothelium - dependent vascular relaxant effect of Apocynum venetum leaf extracts [J]. Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology, 2005, 32 (9): 789-795.
- [4] Sakih M, Aljanabi N, Martinez et al. Universal and rapid salt extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques [J]. Nucl Acids Res, 1997, 22 4 692-4 693.
- [5] White T J, Bruns T, Les S et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics [M] // Innis M, Gelfand D, Sninsky J, White T eds. PCR Protocol: a Guide to Methods and Application. San Diego: Academic Press, 1990. 315-322.
- [6] Taberlet P, Gelly L, Pautou G, et al. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA [J]. Plant Mol Biol, 1991, 17: 1105-1109.
- [7] 张德华, 周开亚, 孙红英. 乙醇保存的动物标本基因组 DNA 提取方法的比较 [J]. 生物学杂志, 2004 21(6): 46-48.

[责任编辑: 孙德泉]