

## 研究报告

### Research Report

# 青藏高原珍稀藏药水母雪莲药材 DNA 微量提取方法优化

王钧<sup>1,2</sup> 胡延萍<sup>1</sup> 王建科<sup>1,2</sup> 石琳<sup>1,2</sup> 杨文韬<sup>3</sup> 李毅<sup>1</sup> 王莉<sup>1\*</sup>

1 中国科学院西北高原生物研究所, 西宁, 810000; 2 中国科学院大学, 北京, 100049; 3 山东大学生命科学院, 济南, 250100

\* 通讯作者, wangli@nwipb.cas.cn

**摘要** 本研究采用改良 CTAB 法、改良 SDS 法、高盐低 pH 法提取自然风干的水母雪莲植株的基因组 DNA, 并对提取方法进行优化筛选出适合于水母雪莲药材 DNA 的提取方法。研究表明改良 CTAB (CTAB 浓度为 2%, PVP 浓度为 1%,  $\beta$ - 巯基乙醇浓度为 2%) 法所提取的基因组 DNA 得率较高, 且使用氯仿/异戊醇抽提两次时提取出的 DNA 质量较好, 能够满足 ISSR 分析要求。在此基础上对实验材料进行预处理, 优化获得了完全适用于水母雪莲风干药材 DNA 提取的一整套提取流程。该方法能够有效去除次生代谢产物对 DNA 提取的影响, 且对原材料消耗较少, 可以应用于后续水母雪莲种质资源鉴定和遗传多样性分析。

**关键词** 水母雪莲, 改良 CTAB 法, 微量提取, 优化, 前处理

## Optimization of DNA Micro-extraction Method of *Saussurea medusa* Maxim, A Rare Tibetan Medicinal Plant of Qinghai-Tibet Plateau

Wang Jun<sup>1,2</sup> Hu Yanping<sup>1</sup> Wang Jianke<sup>1,2</sup> Shi Lin<sup>1,2</sup> Yang Wentao<sup>3</sup> Li Yi<sup>1</sup> Wang Li<sup>1\*</sup>

1 Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining, 810000; 2 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100049; 3 College of Life Sciences, Shandong University, Ji'nan, 250100

\* Corresponding author, wangli@nwipb.cas.cn

DOI: 10.13271/j.mpb.014.002335

**Abstract** In this study, Genomic DNA of dried *Saussurea medusa* was extracted through CTAB-improved method, SDS-improved method and high salt low pH basic method, then optimized and screened a suitable method for DNA extraction of *S. medusa*. Results showed that the yield of genomic DNA extracted by CTAB-improved method (2% CTAB concentration, 1% PVP concentration, 2%  $\beta$ -mercaptoethanol concentration) was higher than others. And two times of extraction with chloroform/isoamyl alcohol had got the better quality of DNA that met the requirements of ISSR analysis. On the basis of this, preprocessed the experimental materials and got a complete set of DNA extraction process of *S. medusa* dried herbs. This improved method can effectively remove the effect of secondary metabolites and consume less plant materials and it also can be applied to the germplasm identification and genetic diversity analysis of *S. medusa*.

**Keywords** *Saussurea medusa* Maxim, CTAB-improved method, Micro-extraction, Optimization, Pretreatment

中药材的正确鉴定作为中医药领域发展的重要环节之一, 一直受到广泛关注。随着现代分子生物学的蓬勃发展, 传统中药材鉴定不再局限于传统的性状特征, 而是采用准确性高、重现性好的分子标记技术(南晓洁等, 2009), 其中利用生物个体、物种或者居群基因组中有差异的 DNA 片段来鉴别药材品种 DNA 分子标记技术备受关注(李文强等, 2005; 应依等, 2006; 张文龙和曾桂萍, 2014)。提取优质样本

DNA 是完成一系列分子鉴定过程的核心基础, 不同药材中所用方法又各有不同。

本研究以菊科(Compositae)风毛菊属(*Saussurea*)植物水母雪莲(*Saussurea medusa* Maxim)为实验材料。水母雪莲又称水母雪兔子, 分布于青海、西藏、四川、甘肃等地, 生长于海拔 3 700~5 200 m 的高山流石滩(刘尚武, 1996), 是一种名贵的藏药材, 现已被列入青海省第二批重点保护野生植物名录, 其含有的

基金项目 本研究由青海省(应用)基础研究计划项目(2013-N-756)和国家自然科学基金项目(31300269)共同资助

生物碱类、黄酮类、甾醇、挥发油、多糖等成分在抗癌、抗衰老、消炎镇痛、治疗妇科疾病、心脑血管疾病等方面均具有很大的研究价值(Fan and Yue, 2003; 李咏华等, 2004)。由于水母雪莲生境特殊、天然生长缓慢(生长期 5~6 年),目前仍无法实现人工引种和野生抚育,市场上的药材均来自天然植物,来源混杂,鉴定方法有限。利用分子标记技术鉴定水母雪莲药材将有效区分其来源。但药材风干阴干过程中, DNA 降解程度比较严重,又含有较多的多酚、多糖等次生代谢产物,极大地干扰了 DNA 提取工作。因此,为了充分利用材料,实现多种研究目的,探索一种适用于水母雪莲药材 DNA 微量提取方法势在必行。

目前水母雪莲药材 DNA 提取和分子鉴定方面仍属空白,本研究旨在探索一种有效的水母雪莲药材 DNA 微量提取工艺,为水母雪莲药材鉴定乃至后续分子遗传研究方面提供基础手段。

## 1 结果与分析

### 1.1 不同提取方法对基因组 DNA 质量的影响

#### 1.1.1 微量分光光度计检测

以叶片和茎为材料,3 种不同方法提取得到的基

因组 DNA 纯度及浓度(表 1)。CTAB 法提取的 DNA 浓度整体水平最高,高盐低 pH 法次之,SDS 法最差;从 OD 值来看,三种方法提取叶片 DNA 纯度无明显差别,但高盐低 pH 法提取茎 DNA 的 OD 值更好,CTAB 法次之,SDS 法最差。

#### 1.1.2 琼脂糖凝胶电泳检测

基因组 DNA 琼脂糖凝胶电泳(图 1) CTAB 法提取的水母雪莲药材叶片 DNA 质量较好,23 kb 出有一明显主带,亮度较高,高盐低 pH 法提取效果次之,SDS 法提取效果最差,同样在茎中也表现出相同的结果。

综合以上两方面的检测,选用 CTAB 法为待优化方法。

### 1.2 正交试验优化

正交试验中不同处理组合所提取的基因组 DNA 电泳差异显著(图 2)。整体来看由叶片中提取的基因组 DNA 质量优于茎的。两次提取结果的评分(表 6)。极差与方差分析(表 2; 表 3)。

根据得分计算 CTAB 法各因素在同一水平得分的平均值(X)和得分之和(T),以及每一因素在不同水平上得分的极差(R)。

表 1 三种不同方法提取的 DNA 纯度及浓度的比较

Table 1 Comparison of DNA purity and concentration extracted by three different methods

方法 Method	编号 Number	叶 Leaf			茎 Stem		
		A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub>	浓度(ng/μL) Concentration (ng/μL)	平均浓度(ng/μL) Average concentration (ng/μL)	A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub>	浓度(ng/μL) Concentration (ng/μL)	平均浓度(ng/μL) Average concentration (ng/μL)
高盐低 pH 法 High salt low pH basic method	1	1.80	327.80	412.42	1.84	126.20	191.75
	2	1.99	520.70		1.83	116.10	
	3	1.92	406.40		2.04	202.90	
	4	1.94	304.90		1.88	186.20	
	5	1.86	351.90		1.80	228.80	
	6	1.91	562.80		1.93	290.30	
CTAB 法 CTAB method	1	2.00	416.20	520.25	1.94	162.50	262.70
	2	1.79	446.80		1.95	244.30	
	3	1.83	443.50		2.01	397.60	
	4	1.93	653.80		2.03	356.10	
	5	1.85	699.00		2.02	283.80	
	6	1.80	462.20		1.89	131.90	
SDS 法 SDS method	1	1.98	243.70	230.03	2.09	149.80	139.63
	2	1.91	262.50		2.22	162.10	
	3	1.95	182.80		2.25	202.60	
	4	1.94	217.40		2.22	132.80	
	5	2.02	223.40		2.63	56.00	
	6	1.94	250.40		2.09	134.50	

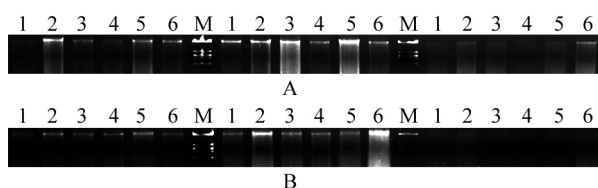


图1 水母雪莲药材基因组 DNA 电泳  
注: A: 叶片; B: 茎; 左 1~6: 高盐低 pH 法; 中间 1~6: CTAB 法; 右 1~6: SDS 法; M:  $\lambda$ DNA/*Hind* molecular ladder  
Figure 1 Electrophoresis of genomic DNA of *S. medusa*  
Note: A: Leaf; B: Stem; Left 1~6: High salt low pH basic method; in between 1~6: CTAB method; Right 1~6: SDS method; M:  $\lambda$ DNA/*Hind* molecular ladder

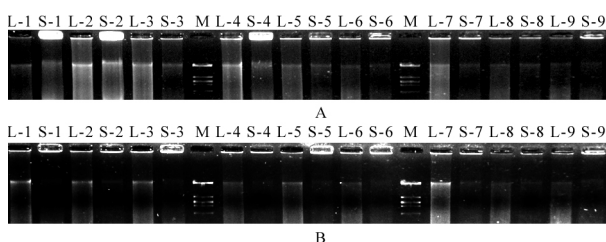


图2 正交试验电泳  
注: A: 重复 1; B: 重复 2; M:  $\lambda$ DNA/*Hind* molecular ladder; L-1~L-9: 表 1 叶处理组合编号, S-1~S-9: 表 1 茎处理组合编号  
Figure 2 Electrophoresis for orthogonal design  
Note: A: Repeat 1; B: Repeat 2; M:  $\lambda$ DNA/*Hind* molecular ladder; L-1~L-9: Numbers are shown in table 1 (leaf), S-1~S-9: numbers are shown in table 1 (stem)

平均值 X 显示了 CTAB 提取法各因素的理论最适水平, X 越大, 表示该因素在此水平越适宜, 即 DNA 提取液中各因素理论最适水平为 2% CTAB, 1% PVP, 2%  $\beta$ - 巯基乙醇, 氯仿/异戊醇抽提两次。

R 值代表了各因素对试验结果的影响程度大小, R 越大, 影响程度越大, 因此得出各因素影响力大小顺序: CTAB> $\beta$ - 巯基乙醇>PVP>氯仿/异戊醇抽

表 2 CTAB 提取法各因素极差分析

Table 2 Range analysis of the factors in CTAB method

计算结果	十六烷基三甲基溴化铵	聚乙烯吡咯烷酮	$\beta$ - 巯基乙醇	抽提次数
Calculation results	CTAB	PVP	$\beta$ -mercaptoethanol	Extraction times
T1	89.000 0	68.000 0	42.000 0	50.000 0
T2	53.000 0	66.000 0	61.000 0	69.000 0
T3	38.000 0	46.000 0	77.000 0	61.000 0
X1	7.416 7	5.666 7	3.500 0	4.166 7
X2	4.416 7	5.500 0	5.083 3	5.750 0
X3	3.166 7	3.833 3	6.416 7	5.083 3
R	4.250 0	1.833 3	2.916 7	1.583 3

注: T1~T3: 每一因素同一水平下的总和; X1~X3: 每一因素同一水平下的平均值; R: 极差

Note: T1~T3: Sum of every factor under the same level; X1~X3: Mean of every factor under the same level; R: Range

提次数。

方差分析中 F 值与极差分析中 R 值反映一致, p 值则显示四因素对实验结果影响显著, 且均达到极显著水平 ( $p < 0.01$ )。

因此, 对影响 DNA 提取结果的四因素进行 Duncan 多重比较(表 4), 以确定各因素最适水平。其中, CTAB 三水平之间差异显著, PVP 水平 1 和水平 2 差异不显著, 二者与水平三差异显著,  $\beta$ - 巯基乙醇三水平之间差异显著, 蛋白抽提次数水平 3 与水平 1 差异不显著, 与水平 2 差异不显著, 而水平 1 与水平 2 差异显著。

本实验中 CTAB 对实验影响最大, 随着提取液中 CTAB 浓度的增加(图 2), 条带逐渐模糊, 提取效果下降, 且结合数据分析(表 2; 表 4), 最终确定 CTAB 最适浓度为水平 1 (2%),  $\beta$ - 巯基乙醇三水平差异(图 2)没有表现出来, 其平均值分析决定最终选用水平 3 (2%) 为最适浓度(表 2); PVP 水平 3 结果不理想(图 2), 水平 1 与水平 2 相差不大, 结合多重比较(表 4), 最终选取水平 1 (1%) 为最适浓度, 氯仿/异戊醇抽提蛋白的次数对本次实验影响最小, 为了方便实验操作, 最终选取水平 2 (氯仿/异戊醇抽提两次) 为最适条件。

综上所述确立水母雪莲风干药材基因组 DNA 提取方法, 即 CTAB 提取液中除常规配方外, CTAB 浓度为 2%, PVP 浓度为 1%,  $\beta$ - 巯基乙醇浓度为 2%, 且提取过程中使用氯仿/异戊醇抽提蛋白两次。

### 1.3 优化改良后 CTAB 法的稳定性检测

以优化改良后的 CTAB 法提取的水母雪莲基因组 DNA 为模板进行 ISSR-PCR 扩增(图 3)。从扩增情况来看, 所有个体叶、茎均扩增出稳定、清晰的条带, 且

表 3 各因素方差分析

Table 3 Variance analysis of each factor

变异来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
Source	SS	df	MS	F value	P value
CTAB	114.500 0	2	57.250 0	44.804 3	0.000 1
PVP	24.666 7	2	12.333 3	9.652 2	0.000 7
β-mercaptoethanol	51.166 7	2	25.583 3	20.021 7	0.000 1
Extraction times	15.166 7	2	7.583 3	5.934 8	0.007 3
Error	34.500 0	27	1.277 8		

表 4 四因素水平间 Duncan 多重比较

Table 4 Duncan multiple comparison of four factors at different levels

十六烷基三甲基溴化铵(%)	均值	聚乙烯吡咯烷酮(%)	均值	β-巯基乙醇(%)	均值	抽提次数	均值
CTAB (%)	Average	PVP (%)	Average	β-mercaptoethanol (%)	Average	Extraction times	Average
2	7.4167a	1	5.6667a	2	6.4167a	2	5.7500a
3	4.4167b	2	5.5000a	1.5	5.0833b	3	5.0833ab
4	3.1667c	3	3.8333b	1	3.5000c	1	4.1667b

条带数目较多,条带大小基本位于 350~2 000 bp 之间,说明优化后的提取方法能够使用微量的药材得到高质量 DNA,可以用于进一步分子标记的研究。

#### 1.4 样品预处理对 DNA 提取的影响

不同前处理方法提取的样品 DNA 纯度及浓度(表 5)。从提取浓度来看,无水乙醇预处理组合与空白对照组效果相当,提取浓度较高,而其它两组较低;从提取纯度来看,冰水预处理组合与空白对照组 OD 值偏高,RNA 含量丰富,而另外两组 OD 值整体处于可接受范围。

经不同预处理后所提取的 DNA 电泳(图 4)。经 A 冰水和 B 丙酮处理的水母雪莲叶片 DNA 提取效率较低;无预处理的对照组 D 能够提取出足量

DNA,但电泳后点样孔较亮,有蛋白污染,而经无水乙醇处理后的组合 C 提取出的 DNA 效率高,在 23 kb 处有一条清晰的条带,且点样孔亮度明显低于无预处理组合 D。因此证明在水母雪莲药材 DNA 提取工作开始前对样品进行相应的预处理是不可或缺的。

以上述 C 预处理方法所提取的基因组 DNA 为模板所提 DNA 进行 ISSR-PCR 扩增(图 5)。扩增较好,条带清晰,数目多,稳定性好,证实以上方法所提水母雪莲药材 DNA 质量较好,可以用于后续实验。

## 2 讨论

制备出高质量的 DNA 是分子生物学研究的基础和前提。对于新鲜、保存良好、样品量充足的植物样品,其 DNA 提取工艺已相当成熟。药材传统加工

L-1 L-2 L-3 L-4 L-5 L-6 M1 S-1 S-2 S-3 S-4 S-5 S-6 L-1'L-2' L-3'L-4' L-5' L-6' M2 S-1' S-2' S-3' S-4' S-5' S-6'

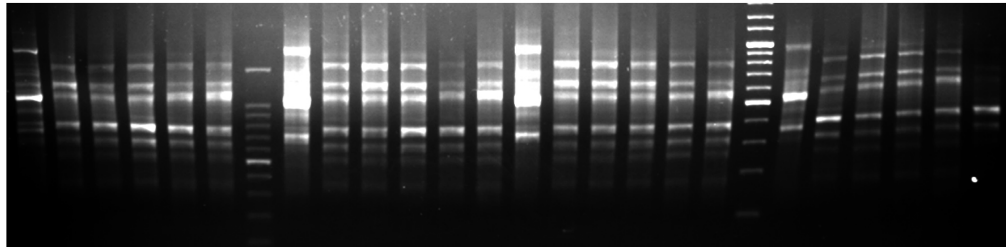


图 3 不同水母雪莲个体 ISSR-PCR 扩增

注: L-1~L-6 为六个个体叶编号; S-1~S-6 为六个个体茎编号; L-1'~L-6' 和 S-1'~S-6' 分别为 L-1~L-6 和 S-1~S-6 的重复; M1: 100 bp molecular marker, M2: 200 bp molecular marker

Figure 3 The application in dried herbs of *S. medusa*

Note: L-1~L-6: Numbers of six leaves; S-1~S-6: Numbers of six stems; L-1'~L-6' and S-1'~S-6': The repeat of L-1~L-6 and S-1~S-6; M1: 100 bp molecular marker; M2: 200 bp molecular marker

表 5 不同预处理方法提取的 DNA 纯度及浓度的比较

Table 5 Comparison of DNA purity and concentration extracted with different pretreatment methods

编号 Number	对照组 Control group		0℃冰水预处理 Ice water pretreatment (0℃)		丙酮预处理 Acetone pretreatment		无水乙醇预处理 Absolute alcohol pretreatment	
	A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub>	浓度(ng/μL) Concentration (ng/μL)	A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub>	浓度(ng/μL) Concentration (ng/μL)	A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub>	浓度(ng/μL) Concentration (ng/μL)	A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub>	浓度(ng/μL) Concentration (ng/μL)
1	1.97	423.40	1.97	64.00	1.86	347.90	1.87	391.70
2	2.04	398.20	1.94	41.40	2.07	189.10	2.03	314.20
3	2.01	357.70	2.09	163.70	1.97	206.40	1.89	327.80
4	1.99	333.40	1.93	149.90	2.02	111.20	1.97	400.50
5	1.98	351.20	2.09	103.30	1.76	122.90	1.87	290.80
6	2.00	347.20	2.13	143.10	1.99	142.40	1.99	520.70
平均值 Average	2.00	368.52	2.03	110.90	1.95	186.65	1.90	374.28

工艺、存放条件粗犷, DNA 氧化降解程度极其严重, 含有多糖、酚类等次生代谢产物, 最终提取出的 DNA 质量颇低, 影响后续实验研究。近十几年来已有许多关于药材中提取高质量 DNA 的研究(王培训等, 1999; 陈大霞等, 2006; 张晓祥等, 2012; 罗焜等, 2012), 但不同药材的 DNA 提取方法差异较大, 在研究中应针对某种药材探索其适宜的方法。许多珍稀中药材植物由于各种因素的影响样品量稀少, 因此建立一种利用微量样品提取高质量 DNA 的方法对于研究珍稀药材的分子标记鉴定是非常必要的。

CTAB 法适用于新鲜植物基因组 DNA 的提取, 但对于传统中药材来说 DNA 提取效率普遍不高(曹晖等, 1996; 肖婷婷等, 2010), 这是由于这些药材中

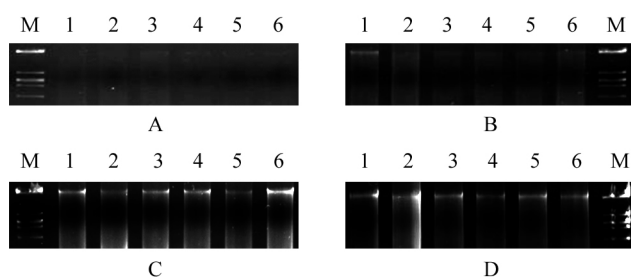


图 4 不同预处理方法提取水母雪莲药材叶片 DNA 电泳  
注: A: 0℃冰水浴预处理; B: 丙酮预处理; C: 无水乙醇预处理; D: 对照组; M: λDNA/Hind 标准分子量参照物; 1~6: 不同个体叶编号

Figure 4 Electrophoresis of genomic DNA extracted from dry leaves of *S. medusa* with different pretreatment methods

Note: A: Ice water pretreatment (0℃); B: Acetone pretreatment; C: Absolute alcohol pretreatment; D: Control group; M: λDNA/Hind molecular mass marker; 1~6: Numbers of different individual leaves

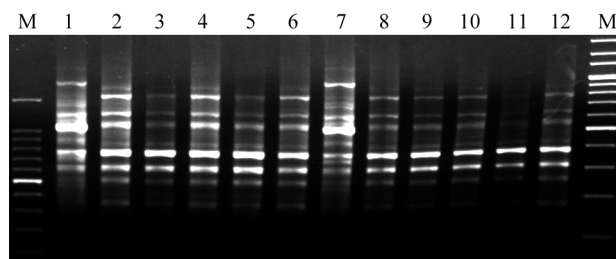


图 5 水母雪莲药材叶片 ISSR-PCR 扩增(无水乙醇前处理后)  
注: 1~6: 六个个体叶片编号; 7~12: 1~6 的重复; M: 1100 bp molecular marker, M': 200 bp molecular marker

Figure 5 The application results of dried leaves of *S. medusa* (after absolute alcohol pretreatment)

Note: 1~6: Numbers of six leaves; 7~12: The repeat of 1~6; M: 100 bp molecular marker, M': 200 bp molecular marker

大都含有较多酚类, 适量增加 CTAB 浓度和 β- 巯基乙醇浓度会使提取结果有所改善(Cheng et al., 1997), 本次实验选用 2% CTAB 效果较好。水母雪莲药材含大量多酚、多糖成分, 在未优化提取方法之前, 添加 β- 巯基乙醇水平仅为 0.2%, 提出的总 DNA 呈褐色, 4℃静置呈粘稠状, 且在进行琼脂糖凝胶电泳时不易跑出点样孔或形成明显拖带, 这与陈大霞(2006)和张智强(张智强等, 2015, 江苏农业科学, 12: 33-36)等的研究出现的问题一致, 因此, 在优化实验时我们将 β- 巯基乙醇的用量提升到 1%~2%, 解决了上述问题。β- 巯基乙醇与 PVP 不但可以防止 DNA 褐变, 同样能够有效去除中药材中的大量酚类成分, 但不同浓度的 PVP 以及 β- 巯基乙醇对 DNA 褐化的影响程度不同(刘玉皎等, 2008; 邓力超等, 2009), 本研究证明其含量分别以 1% 和 2% 为宜。使用氯仿/异戊醇抽提蛋白杂质效果显著, 但随着抽提次数增加

DNA 损失情况严重,造成浪费,因而抽提次数以两次为宜(郑云柯等, 2015)。另外,对干燥药材或其它干燥样品进行 DNA 提取前往往要对样品进行预处理(南晓洁等, 2009; Hu et al., 2009; 赵玲云等, 2016),这也是为了去除色素及氧化成分干扰而采取的必要措施。

本研究以微量分光光度检测、DNA 琼脂糖凝胶电泳检测、ISSR-PCR 扩增检测等检测手段对所提 DNA 质量进行测定,证实经改良后的 CTAB 法能够从微量水母雪莲风干药材中提取出质量较好的基因组 DNA,且扩增条带清晰,多态性好,可以用于后续分子鉴定工作。加之经济实用且操作简便,因而可以广泛应用于其它取材困难、样品稀少的珍贵中药材植物 DNA 提取过程中。

### 3 材料与方法

#### 3.1 试验材料

本实验所用水母雪莲风干药材收集于青海省玛沁县大武镇,经中国科学院西北高原生物研究所卢学峰研究员鉴定,并贮存于阴凉条件下。

#### 3.2 主要仪器与试剂

ChemiDoc™ MP 凝胶成像系统 (Bio-Rad, USA)、离心机 Sigma 2K15, Nanodrop 2000 c 微量分光光度计、Bio-Rad PowerPac 电泳仪及电泳槽,十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)、十二烷基磺酸钠(SDS)、 $\beta$ - 巯基乙醇均购于上海生工生物公司,聚乙烯吡咯烷酮(PVP-40)购于北京拜尔迪生物公司,Tris、乙二胺四乙酸(EDTA)、无水乙醇、氯仿、异丙醇、异戊醇、丙酮等为国产分析纯试剂。

#### 3.3 不同 DNA 提取方法的比较

分别从六株水母雪莲药材上取下叶片、茎各 25 mg 并编号,采用高盐低 pH 法(张英等, 2004)、改良 CTAB 法(肖婷婷等, 2010)、改良 SDS 法(卢东柏等, 2008)提取六株水母雪莲药材叶、茎基因组 DNA,并利用微量分光光度计、琼脂糖凝胶电泳对茎、叶的 DNA 质量分别进行检测,选出适合水母雪莲药材 DNA 提取的方法进行后续优化实验。

#### 3.4 DNA 提取方法的正交优化

采用  $L_9(3^4)$  正交试验设计方法,对 DNA 提取液中 CTAB 浓度、PVP 浓度、 $\beta$ - 巯基乙醇浓度、使用氯仿异戊醇抽提的次数这 4 个要素进行四因素三水平

筛选(表 6)。

设计配制 DNA 提取液成分(表 6),分别提取 DNA,并进行电泳检测,对电泳结果按照条带清晰度、泳道弥散程度、点样孔杂质残留多少等指标划为 9 个等级进行打分,条带清晰、亮度高、背景暗、杂质少的处理记为 9 分,相反最差记为 1 分,并使用 DPS 7.05 统计软件对评分进行极差与方差分析(唐启义和冯明光, 2006)。

以优化改良后的 CTAB 法提取的水母雪莲基因组 DNA 为模板进行 ISSR-PCR 扩增,对优化工艺进行稳定性检测。

#### 3.5 样品预处理对 DNA 提取的影响

现采用 0℃ 冰水浴、丙酮浸泡、无水乙醇浸泡以及无预处理对照等方式分别将水母雪莲药材叶片处理 24 d,之后再按照上述优化后程序进行 DNA 提取。通过琼脂糖凝胶电泳对所得基因组 DNA 进行检测,并以基因组 DNA 为模板进行 ISSR-PCR 扩增实验,检测优化流程的稳定性与可靠性。

#### 3.6 基因组 DNA 检测方法

微量分光光度计检测: 适量待测 DNA 样品经 Nanodrop 2 000 c 微量分光光度计测得其浓度及 OD 值( $A_{260}/A_{280}$ ),以鉴定所提 DNA 的纯度。OD 值介于 1.8~2.0 之间证明 DNA 纯度较好,小于 1.8 证明有蛋白污染,大于 2.0 则有 RNA 污染。

琼脂糖凝胶电泳检测: 采用 0.8% 琼脂糖凝胶(0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  溴化乙锭, 1 $\times$  TAE Buffer)电泳,凝胶成像系统拍照保存。

ISSR-PCR 检测: 20  $\mu\text{L}$  反应体系中 *Taq* DNA 聚合酶 0.7 U、dNTP 0.125 mmol/L、引物 0.3  $\mu\text{mol}/\text{L}$ 、模板 DNA 40 ng、 $\text{Mg}^{2+}$  1.5 mmol/L,扩增程序为 94℃ 预变性 5 min,94℃ 变性 20 s,57℃ 复性 1 min,72℃ 延伸 80 s,循环 38 次,72℃ 延伸 6 min,4℃ 保存。PCR 产物经 1.2% 琼脂糖凝胶(0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  溴化乙锭, 1 $\times$  TAE Buffer)电泳,并在凝胶成像系统中拍照保存。ISSR 引物选用 UBC862 (5'-AGC AGC AGCAGCAGC AGC-3')。

#### 作者贡献

王钧和胡延萍是本研究的实验设计和实验研究的执行人,王建科及石琳完成数据分析,论文初稿的写作,杨文韬参与实验设计,试验结果分析,王莉和李毅是项目的构思者及负责人,指导实验设计及论文写作与修改。全体作者都阅读并同意最终的文本。

表 6 CTAB 提取法正交试验设计

Table 6 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) orthogonal design of CTAB method

编号 Number	因素 Factors				评分结果 Score results			
	CTAB 浓度(%) CTAB concentration (%)	PVP 浓度(%) PVP concentration (%)	β- 巯基乙醇浓度(%) β-mercaptoethanol concentration (%)	氯仿/异戊醇抽提次数 extraction times with chloroform/isoamyl alcohol	重复 1 Repeat 1		重复 2 Repeat 2	
					叶 Leaf	茎 Stem	叶 Leaf	茎 Stem
1	2	1	1.0	1	4	5	7	7
2	2	2	1.5	2	9	9	8	9
3	2	3	2.0	3	8	8	9	6
4	3	1	1.5	3	7	6	4	4
5	3	2	2.0	1	5	7	5	5
6	3	3	1.0	2	3	3	3	1
7	4	1	2.0	2	6	4	6	8
8	4	2	1.0	3	2	2	2	3
9	4	3	1.5	1	1	1	1	2

致谢

本研究由青海省(应用)基础研究计划项目(2013-N-756)和国家自然科学基金项目(31300269)共同资助。

参考文献

Cao H., Bi P.X., and Shao P.Z., 1996, Identification of chinese drug "Herba elephantopi" by DNA fingerprinting using random primed PCR, *Zhong Yaocai (Journal of Chinese Medicinal Materials)*, 19(12): 608-612 (曹晖, 毕培曦, 邵鹏柱, 1996, 中药材苦地胆的 DNA 指纹鉴定, *中药材*, 19 (12): 608-612)

Chen D.X., Li L.Y., Qian M., and Lu C., 2006, DNA extraction from rhizoma coptidis and optimization of RAPD reaction system, *Zhong Caoyao (Chinese Traditional and Herbal Drugs)*, 37(8): 1233-1237 (陈大霞, 李隆云, 钱敏, 鲁成, 2006, 黄连药材 DNA 提取及 RAPD 反应体系的优化, *中草药*, 37(8): 1233-1237)

Cheng F.S., Brown S.K., and Weeden N.F., 1997, A DNA extraction protocol from various tissues in woody species, *Hortscience*, 32(5): 921-922

Deng L.C., Qiu D.S., Tu N.M., Tan M.X., Zhang Z.C., Chen J.B., Li S.L., and Wang Z.Q., 2009, Effect of PVP on the extraction of tobacco genomic DNA, *Guangdong Nongye Kexue (Guangdong Agricultural Sciences)*, (5): 37-39, 57 (邓力超, 邱道寿, 屠乃美, 谭铭喜, 张振臣, 陈俊标, 李淑玲, 王泽清, 2009, PVP 对烟草基因组 DNA 提取的影响, *广东农业科学*, (5): 37-39, 57)

Fan C.Q., and Yue J.M., 2003, Biologically active phenols from *Saussurea medusa*, *Bioorg Med. Chem.*, 11: 703-708

Hu Y.P., Xie X.L., Wang L., Yang J., Zhang H.G., and Li Y., 2009, An effective and low-cost method for DNA extraction from herbal drugs of *Rheum tanguticum* (polygonaceae), *African Journal of Biotechnology*, 12: 2691-2694

Li W.Q., Huang S.L., Niu Y.L., Zhao J.C., and Wang X.R., 2005, Application of DNA molecular marking technology in identifying Chinese herbal medicine, *Hebei Shifan Daxue Xuebao (Journal of Hebei Normal University)*, 29(6): 617-622 (李文强, 黄土良, 牛玉璐, 赵建成, 王晓蕊, 2005, DNA 分子标记技术在中草药鉴别中的应用, *河北师范大学学报*, 29(6): 617-622)

Li Y.H., Ge F.H., and Su W.W., 2004, The research progress of *Saussurea medusa* Maxim, *Zhong Yaocai (Journal of Chinese Medicinal Materials)*, 4(31): 297-299 (李咏华, 葛发欢, 苏薇薇, 2004, 水母雪莲花研究进展, *中药材*, 4(31): 297-299)

Liu S.W., eds., 1996, *Qinhai Zhiwu Zhi (Flora of Qinghai)*, Qinghai People's Publishing House, Xi'ning, China, (3): 457 (刘尚武, 编著, 1996, 青海植物志(第 3 卷), 青海人民出版社, 中国, 西宁,(3): 457)

Liu Y.J., Li P., and Zhang X.T., 2008, Effect of β-mercaptoethanol and PVP on DNA quantity from fababean, *Hubei Nongye Kexue (Hubei Agricultural Sciences)*, 3(27): 248-250 (刘玉皎, 李萍, 张小田, 2008, β- 巯基乙醇和 PVP 对蚕豆 DNA 质量的影响, *湖北农业科学*, 3(27): 248-250)

Lu D.B., Li X.F., and Liu Z.X., 2008, Extraction of cotton genomic DNA using development SDS, *Guangdong Nongye Kexue (Guangdong Agricultural Sciences)*, (5): 14-16 (卢东柏, 李晓方, 刘志霞, 2008, 改良 SDS 法提取棉花基因组 DNA 研究, *广东农业科学*, (5): 14-16)

Luo K., Ma P., Yao H., Song J.Y., Chen K.L., and Liu Y.M.,

- 2012, Study on DNA extraction method for Chinese herbs, *Shijie Kexue Jishu: Zhong yiyao Xiandaihua (World Science and Technology: Modernization of Traditional Chinese Medicine and Material Medica)*, 2(20): 1433-1439 (罗焜, 马培, 姚辉, 宋经元, 陈科力, 刘义梅, 2012, 中药 DNA 条形码鉴定中的 DNA 提取方法研究, *世界科学技术: 中医药现代化*, 2(20): 1433-1439)
- Nan X.J., Hao Y.Y., Zhao G.G., Han R., and Qin X.M., 2009, Genomic DNA extraction and RAPD analysis from dried roots of *Bupleurum Chinense*, *Zhong caoyao (Chinese Traditional and Herbal Drugs)*, 40(3): 447-451 (南晓洁, 郝媛媛, 赵良贵, 韩榕, 秦雪梅, 2009, 柴胡药材干根 DNA 提取及 RAPD 分析, *中草药*, 40(3): 447-451)
- Tang Q.Y., and Feng M.G., eds., 2006, DPS data processing system experimental design, statistical analysis and modeling, Science Press, Beijing, China, pp.82-88 (唐启义, 冯明光, 编著, 2006, DPS 数据处理系统 - 实验设计、统计分析及模型优化, 科学出版社, 中国, 北京, pp. 82-88)
- Wang P.X., Huang F., Zhou L., Cao L.Y., and Liang R.Y., 1999, A comparative study of methods for isolation of total DNA from herbal medicines, *Zhongyao Xinyao Yu Linchuang Yaoli (Traditional Chinese Drug Research and Clinical Pharmacology)*, 10(1): 18-20, 60-61 (王培训, 黄丰, 周联, 曹柳英, 梁瑞燕, 1999, 植物中药材总 DNA 提取方法的比较, *中药新药与临床药理*, 10(1): 18-20, 60-61)
- Xiao T.T., Zhu Y., Ye B.P., Jin G.Q., and Qin M.J., 2010, Comparison of methods of DNA extraction from *Iris L.*, *Zhongguo Yesheng Zhiwu Ziyuan (Chinese Wild Plant Resources)*, 29(3): 46-50 (肖婷婷, 朱艳, 叶波平, 金国虔, 秦民坚, 2010, 鸢尾属药用植物总 DNA 提取方法的比较研究, *中国野生植物资源*, 29(3): 46-50)
- Ying Y., Xu H., and Wang Z.T., 2006, Application of DNA molecular biological technology in identification of traditional Chinese Medicine *Dendrobium*, *Shijie Kexue Jishu: Zhong yiyao Xiandaihua (World Science and Technology: Modernization of Traditional Chinese Medicine and Material Medica)*, (3): 65-70 (应依, 徐红, 王峥涛, 2006, DNA 分子标记技术在中药石斛类药材鉴定中的应用, *世界科学技术: 中医药现代化*, (3): 65-70)
- Zhang W.L., and Zeng G.P., 2014, Application and advance of study on medicinal herb *Dendrobium* by molecular marker, *Jiyinzuxue Yu Yingyong Shengwuxue (Genomics and Applied Biology)*, 32(2): 452-457 (张文龙, 曾桂萍, 2014, 分子标记技术及其在中药石斛研究中的应用进展, *基因组学与应用生物学*, 32(2): 452-457)
- Zhang X.X., Wang L., and Shou L.L., 2012, A rapid modified CTAB method of extracting Genomic DNA from Wheat leaf, *Zhongguo Nongxue Tongbao (Chinese Agricultural Science Bulletin)*, 28(36): 46-49 (张晓祥, 王玲, 寿路路, 2012, 一种快速提取小麦基因组 DNA 的改良 CTAB 方法, *中国农学通报*, 28(36): 46-49)
- Zhang Y., Bai G.R., Huang M.H., Yang M.S., and Cao H., 2004, Evaluation and authentication of methodology on Genomic DNA isolation of plant, *Yaopin Pingjia (Drug Evaluation)*, 1(4): 292-297, 289 (张英, 柏干荣, 黄明辉, 杨梦苏, 曹晖, 2004, 植物基因组 DNA 提取方法学评析与验证, *药品评价*, 1(4): 292-297, 289)
- Zhao L.Y., Fan D.Y., Li Y.F., Yan X., and Huang L.L., 2016, The extraction of metagenom DNA in branch bark, *Shengwu Jishu Tongbao (Biotechnology Bulletin)*, 32(1): 74-79 (赵玲云, 范东颖, 李燕芳, 颜霞, 黄丽丽, 2016, 枝干树皮宏基因组 DNA 的提取, *生物技术通报*, 32(1): 74-79)
- Zheng Y.K., Hu X.Y., Song X.Q., and Wang J., 2015, Optimized extraction method for genomic DNA from *Dendrobium* species (Orchidaceae), *Redai Zhiwu Xuebao (Journal of Tropical Biology)*, 6(2): 168-172 (郑云柯, 胡翔宇, 宋希强, 王健, 2015, 石斛属植物基因组 DNA 提取方法的对比, *热带生物学报*, 6(2): 168-172)