

北冬虫夏草 DNA 提取方法的比较

康信聪^{1,2}, 刘东波^{1,2,3*}, 夏志兰^{1,2,3}, 陈芳^{1,2}

(1.湖南农业大学 园艺园林学院, 湖南 长沙 410128; 2.国家中医药管理局 亚健康干预技术实验室, 湖南 长沙 410128; 3.作物种质创新与资源利用湖南省重点实验室, 湖南 长沙 410128)

摘要: 运用 CTAB 法、CTAB 改良法 1、CTAB 改良法 2、氯化苄法、裂解法、改良 SDS 法、改良尿素法等 7 种方法提取北冬虫夏草基因组 DNA, 发现 CTAB 改良法 2(提纯时加入低浓度乙醇)提取的 DNA 的 OD_{260}/OD_{280} 都在 1.9 以上, 能获得清晰的 PCR 扩增图谱, 能被 *Hind*III 酶切消化。

关键词: 北冬虫夏草; 基因组 DNA; 提取

中图分类号: Q503 文献标志码: A 文章编号: 1007-1032(2011)02-0147-03

Comparison of genomic DNA extraction from *Cordyceps militaris*

KANG Xin-cong^{1,2}, LIU Dong-bo^{1,2,3*}, XIA Zhi-lan^{1,2,3}, CHEN Fang^{1,2}

(1.College of Horticulture and Landscape, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China; 2.State Key Laboratory of Sub-Health Intervention Technology, State Administration of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410128, China; 3.Hunan Provincial Key Laboratory for Germplasm Innovation and Utilization of Crop, Changsha 410128, China)

Abstract: This study is an attempt to compare the DNA extraction methods of 7 kinds of extraction: CTAB method, improved CTAB method 1, improved CTAB method 2, benzyl chloride method, lysis method, improved SDS method, and improved urea method so as to isolate high quality genomic DNA from *Cordyceps militaris* enriching polysaccharides and protein. The results showed that the extraction effect of the third method (improved CTAB method 2) (added low concentration ethanol at purification) was the best. The value of OD_{260}/OD_{280} was over 1.90, the DNA was amplifiable in the polymerase chain reaction (PCR) and completely digestible with restriction endonucleases *Hind*III.

Key words: *Cordyceps militaris*; genomic DNA; extract

由于北冬虫夏草某些活性成分如虫草素含量高于冬虫夏草^[1-4], 常被作为冬虫夏草的替代品在临床上应用。北冬虫夏草的分子生物学研究需要能迅速分离出纯度高、相对分子质量大的基因组 DNA^[5]。笔者借鉴了大量食用菌基因组 DNA 的提取方法, 对北冬虫夏草基因组 DNA 的提取方法进行比较研究。

1 材料与方法

1.1 材料

北冬虫夏草菌种来源于湖南农业大学食用菌研究所。

1.2 方法

1.2.1 DNA 的提取

采用 7 种方法提取北冬虫夏草基因组 DNA, 菌

收稿日期: 2010-11-16

基金项目: 国家科技支撑计划项目(2006BIA06A20)

作者简介: 康信聪(1988—), 女, 江西吉安人, 硕士研究生, 主要从事功能食品开发与评价研究, kangxincong@163.com; *通信作者, chinasaga@163.com

丝体0.5 g。

方法1:CTAB法,参照文献[6]。方法2:CTAB改良法1,参照文献[7-8],将CTAB缓冲液中的NaCl浓度提高至2.5 mol/L,并在加入CTAB提取缓冲液后再加入蛋白酶K进行裂解,沉淀后加入低浓度的NaCl对DNA进行溶解,再用氯仿 异戊醇(24 1)进行抽提。方法3:CTAB改良法2,参照文献[9],用苯酚 氯仿 异戊醇(25 24 1)进行提纯的同时,加入30%体积的无水乙醇对杂质多糖进行沉淀。方法4、5、6、7分别为氯化苜法、裂解法、改良SDS法、改良尿素法,参照文献[10-13]。

1.2.2 DNA质量检测

1) 纯度检测。将所得DNA 提取液稀释后, Shimadzu UV1800紫外分光光度计测定260、280 nm处的吸光度以及DNA质量浓度,并根据 OD_{260}/OD_{280} 值判断DNA 纯度。

2) 电泳检测。将所得DNA 于1.0%琼脂糖凝胶中进行电泳,在SYNGENE 型凝胶成像系统下观察、拍照。

3) PCR 扩增检测。以提取的DNA为模板,进行PCR检测。25 μ L 反应体系中含ddH₂O 14.8 μ L、10 \times PCR Buffer 3 μ L、10 mmol/L dNTPs(北京鼎国) 0.3 μ L、20 mmol/L Mg²⁺ 2 μ L、2.5 μ mol/L引物1(上海生工) 2 μ L, 2.5 μ mol/L引物2 2 μ L、5 U/ μ L Taq 酶(上海生工) 0.4 μ L、150 ng/ μ L模板0.5 μ L。扩增在东胜龙EDC-810 PCR仪上进行,扩增程序为94 $^{\circ}$ C预变性5 min,94 $^{\circ}$ C 变性60 s,35 $^{\circ}$ C退火60 s,72 $^{\circ}$ C延伸2 min,5个循环,94 $^{\circ}$ C变性60 s,50 $^{\circ}$ C退火60 s,72 $^{\circ}$ C延伸2 min,35个循环,72 $^{\circ}$ C延伸10 min,16 $^{\circ}$ C保温结束反应。扩增产物在1.0%的琼脂糖凝胶上电泳,在SYNGENE型凝胶成像系统下观察、拍照。

4) 限制性内切酶酶切检测。将提取的DNA用限制性内切酶Hind III 于37 $^{\circ}$ C水浴中酶切消化1 h(酶切反应总体积为20 μ L,包括10 \times Buffer 2 μ L, DNA 5 μ g, Hind III 5 U,加超纯水至20 μ L)后,取2.5 μ L用1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测酶切效果。

2 结果与分析

2.1 DNA 的紫外吸收值比较

用7种方法多次重复提取北冬虫夏草的DNA,分别测定其 OD_{260} 、 OD_{280} 、 OD_{260}/OD_{280} 值,结果(表1)表明,7种方法提取的DNA,方法3的 OD_{260}/OD_{280} 值最佳,大多为1.90~2.10,平均为1.913,表明这种方法提取的DNA 有较好的纯度。

表1 7种方法提取DNA 的紫外检测结果

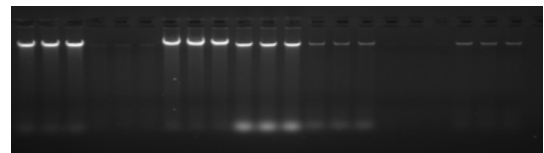
Table 1 The ultraviolet absorbance of DNA extracted with seven different methods

OD 比值	方法1	方法2	方法3	方法4	方法5	方法6	方法7
平均值	1.575	1.542	1.913	1.752	1.677	1.769	1.750

2.2 电泳检测结果

从图1可看出,7种方法所提DNA 电泳后的图谱清晰,方法1、3、4的DNA 条带较亮,方法5、7的稍弱,而方法2、6几乎没有,总体基本无降解拖尾现象,在加样孔附近滞留的物质也很少。但仔细比较,仍可发现7种DNA 之间的细微差别,方法1、3、4比方法5、7的降解略多,在加样孔附近的滞留物也是方法1、3、4比方法5、7的稍多。方法4的RNA 残留较多,方法1、5次之,说明方法4提取的DNA 中仍含有抑制RNA 酶的杂质。

1 1 1 2 2 2 3 3 3 4 4 4 4 5 5 5 6 6 6 7 7 7



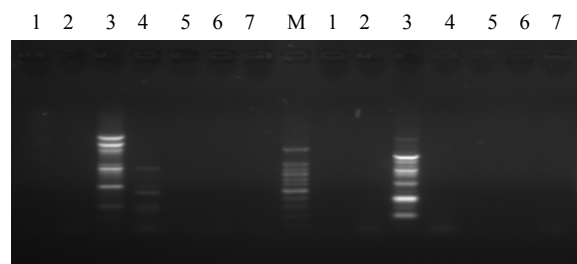
1 CTAB法;2 CTAB改良法1;3 CTAB改良法2;4 氯化苜法;5 裂解法;6 SDS法;7 尿素法。

图1 7种方法提取北冬虫夏草基因组DNA 的电泳图谱
Fig. 1 Electrophoresis figure of genomic DNA extracted with seven different methods

2.3 PCR 扩增结果

图2是7种方法提取的DNA以Me1为正向引物,分别以Em1、Em2为反向引物的PCR 扩增结果。扩增产物的电泳结果表明,方法3提取的DNA 均能很好地进行PCR 扩增,并获得丰富清晰的扩增谱带;方法4以Em1为反向引物时,虽也有些条带能扩增出来,但谱带较弱,且扩增的条带不完全。说明方法3所提取的DNA 质量最好,杂质少,对

Taq 酶的活性影响小, 所提取的 DNA 能用做 PCR 的模板, 可满足 DNA 分子标记的要求。



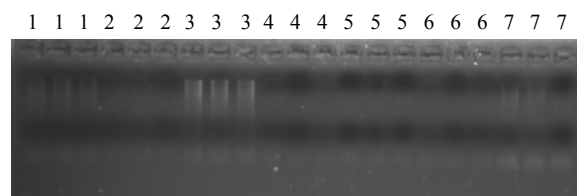
1 CTAB 法; 2 CTAB 改良法 1; 3 CTAB 改良法 2; 4 氯化苯法; 5 裂解法; 6 SDS 法; 7 尿素法; M DNA marker。

图 2 7 种方法提取北冬虫夏草基因组 DNA 的 PCR 扩增图谱

Fig.2 PCR amplified of DNA extracted with seven different methods

2.4 DNA 的酶切效果

用限制性内切酶 *Hind*III 对 7 种方法所提取 DNA 的酶切结果(图 3)表明, 方法 1、3、7 的 DNA 能看出酶切的痕迹, 而方法 2、4、5、6 既无 DNA 条带, 也无任何酶切痕迹。方法 3 的酶切痕迹最为明显, 可能是酶切时所用 DNA 量少, 所以总体图谱不清晰, 而方法 2、4、5、6 可能含杂质较多未被酶切开, 却因 DNA 量太少而看不出 DNA 条带; 方法 1、3、7 均被切开, 以方法 3 最为明显, 说明方法 3 的 DNA 质量最好, 所含抑制限制性内切酶的各种污染物最少。



1 CTAB 法; 2 CTAB 改良法 1; 3 CTAB 改良法 2; 4 氯化苯法; 5 裂解法; 6 SDS 法; 7 尿素法。

图 3 7 种方法提取北冬虫夏草基因组 DNA 的 *Hind*III 酶切图谱

Fig.3 *Hind* III digesting the genomic DNA extracted with seven different methods

3 讨论

去除多糖类物质是提取药食用真菌 DNA 时常遇到的难题。药食用真菌中富含多糖, 而多糖的许多理化性质与核酸相似, 在去除多糖的同时 DNA 也被裹挟, 造成 DNA 得率的减少; 在沉淀 DNA 时, 产生多糖的凝胶状沉淀, 这种含有多糖的 DNA 沉淀

难溶于水, 或溶解后产生黏稠状的溶液, 由于多糖可以抑制 DNA 限制性内切酶、*T₄* DNA 连接酶、*Taq* DNA 聚合酶等多种酶类的活性^[14-15], 因此污染了多糖的 DNA 样品无法用于进一步的分子生物学研究。在常规方法中, 通过在 CTAB 缓冲液中加入 PVP 去除少许多糖^[16], 在高浓度 Na^+ 或 K^+ 存在条件下, 通过苯酚、氯仿抽提除去一些多糖^[7], 通过水饱和和乙醚将部分多糖留在上清液中^[17], 或通过区室法在细胞裂解前就将细胞质中的大多数生化物质包括多糖去除^[18-19], 虽然这些方法都可以在一定程度上减少多糖污染, 但仍有相当多的多糖与 DNA 混杂在一起, 所以还需要用更有效的方法来解决 DNA 分离纯化时多糖污染的问题。

用低浓度乙醇沉淀多糖是提取 RNA 去除多糖效果较好的方法, Tesniere^[9]报道多糖会在低浓度乙醇(10%~30%)中沉淀, 而 RNA 则要在 75% 的乙醇中才能沉淀, 所以利用 RNA 与多糖在不同浓度乙醇中的沉淀性质不同来分离这 2 种物质。本研究中, 方法 3 采用了去多糖效果较好的 CTAB 法, 并在此基础上根据 RNA 去多糖的方法进行了改良, 在加入苯酚 氯仿 异戊醇(25 24 1)的同时, 加入 30% 无水乙醇, 所提取的 DNA OD_{260}/OD_{280} 值都处于 1.9~2.0, 能获得清晰的 PCR 扩增图谱, 也能被 *Hind*III 酶切。表明低浓度乙醇沉淀法不仅可以很好地去除 RNA 中的多糖, 也可以很好地去除 DNA 中的多糖。

本研究中, 7 种方法提取的 DNA, 只有方法 3(CTAB 改良法 2)无论从 OD_{260}/OD_{280} 值、PCR 扩增, 还是从酶切图谱来看, 都是最优方法, 去除蛋白质和多糖的效果好。只是在电泳检测时, 方法 3 比方法 5、7 的降解和加样孔附近的滞留物略多, 但黄建安等^[18]认为, 这些问题的解决有赖于实验者对一些操作细节的掌握, 只要操作精细合理, 都是可以避免的。

参考文献:

- [1] 汤晓赞, 丁选胜. 蛹草的研究进展[J]. 基层中药杂志, 2002, 16(4): 50-53.
- [2] 张显科, 刘文霞. 蛹虫草化学成分测定[J]. 菌物系统, 1997, 16(1): 78-80.

法外,还有液相色谱法、气相色谱法、毛细管电泳法等^[9],这些方法在测定低含量的糖类化合物时,无一例外的需对样品进行柱前衍生或柱后衍生,操作步骤繁琐,所需时间较长,人力和物力成本较高,分离效果不理想。而离子色谱法使用了脉冲安培检测器,这种检测器可对糖类化合物直接进行检测,无需衍生,具有非常高的灵敏度,且具有选择性。测定结果表明,测定的精密度、回收率高。本试验中选择的2套梯度条件分别进行检测,可以较好地解决干扰的问题,达到较好的分离效果,综合这两套数据基本可以得到样品中所有待测糖类的准确测定结果,从而提供水稻秸秆木质纤维素的单糖组成基本信息。

参考文献:

- [1] 陈静萍,王克勤,熊兴耀,等. γ 射线对稻草纤维组织及酶解效果的影响[J].核农学报,2005,22(3):304-309.
- [2] 何源禄.植物纤维原料辐射水解研究进展[J].核技术,2008,7(5):7-10.
- [3] 彭维,向志明.水稻秸秆的纤维素酶水解研究[J].四川食品与发酵,2007,137(3):11-15.
- [4] 曲音波.纤维素乙醇产业化[J].化学进展,2007,19(7/8):1098-1108.
- [5] 孙多志,许庆利,王复,等.木质纤维素制取燃料乙醇水解工艺技术进展[J].河南化工,2008,25(4):114.
- [6] 龚大春,田毅红,李德莹,等.纤维素乙醇的研究进展[J].化学与生物工程,2007,24(1):4-6.
- [7] 韩鲁佳,闫巧娟,刘向阳,等.中国农作物秸秆资源及其利用现状[J].农业工程学报,2002,18(3):87-91.
- [8] 吴创之,马隆龙.生物质能现代化利用技术[M].北京:化学工业出版社,2003:173-196.
- [9] 马乃,许思昭,陈美洪.食品中糖类的测定方法探讨[J].现代食品科技,2006,22(1):139-142.
- [10] 都兴范,李亚杰,王林华,等.北冬虫夏草的研究发展现状[J].辽宁农业科学,2003(4):26-28.
- [11] 李祝,刘爱英,梁宗琦.虫草菌素的生物活性及检测方法[J].食用菌学报,2002,9(1):57-62.
- [12] 臧金平,连宾,袁生.简便易行的食用菌菌丝体基因组DNA提取法[J].食品科学,2005,26(3):66-68.
- [13] 郭大龙,吴正景.一种简单有效的去除植物DNA中多糖等杂质的方法[J].生物技术,2008,18(5):31-32.
- [14] 崔光红,唐晓晶,黄璐琦.含淀粉及多糖类中药材DNA的提取方法研究[J].中国中药杂志,2006,31(16):1365-1367.
- [15] 江树勋,邵碧英,陈文炳.15种常见食(药)用菌的3种总DNA提取方法比较研究[J].食品科学,2004,25(5):36-40.
- [16] Tesniere C, Vayda M E. Method for the isolation of high quality RNA from grape berry tissues without contaminating tannins or carbohydrates[J]. Plant Mol Biol Rep, 1991(9): 242-251.
- [17] 张莉莉,张苓花,史剑斐,等.利用氯化苜蓿提取真菌基因组DNA及其分子生物学分析[J].大连轻工业学院学报,2000,19(1):36-39.
- [18] 米锐,王鹤,孟楠,等.北冬虫夏草基因组DNA提取方法的研究[J].辽宁农业科学,2008(5):56-57.
- [19] 陈莉,魏莉,周童,等.几种中药DNA提取方法的比较研究[J].广西植物,2007(1):137-139.
- [20] 曹文波,郑璐璐,谢文海.一种提取植物基因组DNA的方法——改良尿素法[J].华中师范大学学报,2008,42(3):448-451.
- [21] Fang G, Hammar S, Grumet R. A quick and inexpensive method for removing polysaccharides from plant genomic DNA[J]. Bio Techniques, 1992, 13: 52-56.
- [22] 罗志勇,周钢,陈湘晖,等.高质量植物基因组DNA的分离[J].湖南医科大学学报,2001,26(2):178-180.
- [23] 卓伟,余茂德,鲁成.PVP在桑叶总DNA提取中的应用[J].西南农业大学学报,2001,23(1):61-62.
- [24] 程运江,伊华林,庞晓明,等.几种木本果树DNA的有效提取[J].华中农业大学学报,2001,20(5):481-483.
- [25] 黄建安,黄意欢,罗军武,等.茶树基因组DNA的高效提取方法[J].湖南农业大学学报:自然科学版,2003,29(5):402-407.
- [26] 王经源,郭明亮,林文雄.高多糖含量植物——莲DNA的提取方法[J].福建稻麦科技,2004(3):8-9.
- [27] 徐怀德.天然产物提取工艺学[M].北京:中国轻工业出版社,2006:250.

责任编辑:罗慧敏
英文编辑:易来宾

(上接第149页)