濒危药用植物麻花秦艽和粗茎秦艽 cpDNA 提取研究*

高欢欢[1,3]，倪梁红[2]，胡志刚[1]，姚 辉[3]，吴和珍[1**]，潘宏林[1**]

(1. 湖北中医药大学药学院 武汉 430065；2. 上海中医药大学中药学院 上海 201203；
3. 中国医学科学院北京协和医学院药用植物研究所 北京 100193)

摘 要：目的：对麻花秦艽和粗茎秦艽叶绿体基因组进行提取研究，为进一步研究秦艽叶绿体的基因组序列特征、遗传多样性以及资源保护研究奠定基础。方法：本文以麻花秦艽、粗茎秦艽为对象，采用改良的蔗糖密度梯度离心方法进行提取，优化纯化方法，分离得到秦艽叶绿体后测定 cpDNA 浓度，检测其 OD 值并扩增 ITS2 序列验证其纯度。结果：获得高质量、高纯度的 cpDNA (0.1~0.4 μg/10 g)，扩增 ITS2 序列验证其无核污染，满足后续测序要求。结论：cpDNA 的纯度和质量对叶绿体基因组测序的正确率和可信度具有重要的影响。本文获得了高纯度、高质量的秦艽 cpDNA，为秦艽叶绿体基因组全序列的获得提供保障。

关键词：麻花秦艽 粗茎秦艽 叶绿体 DNA 提取

doi: 10.11842/wst.2013.09.002 中图分类号：R284.2 文献标识码：A

自 1986 年第一条完整叶绿体发表以来[1]，叶绿体基因组的研究备受关注。叶绿体基因工程以及系统发育是其主要的研究方向，并且被广泛用于叶绿体转化技术及植物亲缘关系鉴定的基础和应用研究[2~4]。截止 2013 年 2 月，NCBI 数据库***公布了 324 条完整叶绿体序列，但多数为经济作物，已知的药用植物叶绿体基因组相对较少。叶绿体 DNA (cpDNA) 的提取困难和测序成本较高是制约获得药用植物叶绿体全基因组序列的两个重要因素。而以标签技术对多个物种进行高通量测序时，对 cpDNA 的浓度和纯度要求严格，需保证无核基因组 DNA 和线粒体 DNA 污染[5]，尤其以三代测序平台 PacBio 测序时，高纯度的 cpDNA 模板获得数据准确率更高[6]。因此，cpDNA 提取研究是进行叶绿体基因组研究的基础。

秦艽是我国重要的传统中药材，始载于《神农本草经》，“主寒热邪气，寒湿风痹，肢节痛、下水、利小便”。麻花秦艽 (*Gentiana straminea* Maxim.) 和粗茎秦艽 (*Gentiana crasicaulis* Duthie ex Burk.) 是其来源之一，由于生长周期长、数量少、过度采挖，致使秦艽野生资源严重枯竭，被列为国家三级重点保护植物。在前期的研究中，罗焜等[7]筛选了可准确鉴别多基源秦艽药材和其常见混伪品的 DNA 条形码序列，张得钧等[8]基于黄管秦艽叶绿体基因进行核苷酸变异和遗传分析，为黄管秦艽优良种质资源筛选和规范化种植提供科学依据。目前尚无对秦艽叶绿体基因组的研究。通过对药用植物叶绿体基因组的研究，可以推动叶绿体转化技术、植物亲缘关系鉴

收稿日期：2013-03-01

修回日期：2013-03-19

* 科学技术部国家高技术研究发展计划（“863 计划”）项目 (2012AA021602)：基于 DNA 条形码的珍稀药用、野生等资源快速检测技术及产品研发，负责人：陈士林；教育部长江学者和创新团队发展计划 (IRT1150)：中药资源学，负责人：陈士林。

** 通讯作者：吴和珍，教授，博士，主要研究方向：中药的品种、质量及资源开发研究；潘宏林，教授，主要研究方向：中药资源及其品质研究。

*** http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/GenomesGroup.cgi?taxid=2759&opt=plastid

定及遗传多样性研究在保护濒危中药资源中的应用。因此，本文对获得高质量秦艽 cpDNA 的研究，是进一步挖掘秦艽叶绿体基因组遗传信息的前提，为秦艽资源保护研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料

采自西藏地区的麻花秦艽和粗茎秦艽（表 1），经上海中医药大学生药学教研室赵志礼教授鉴定为正品。每种秦艽取新鲜叶片各 80 g，洗净保存在干冰中运输至实验室。叶片剪碎后保存在缓冲液中，-80℃冻存。

1.1.2 试剂与成分

实验所用试剂为 Buffer A、Buffer 1、Buffer 2、Wash Buffer、52%蔗糖溶液、30%蔗糖溶液和 Lysis Buffer，其配方参见 Diekmann 等[9]报道。CTAB/NaCl 溶液：10% CTAB、0.7 $mol \cdot L^{-1}$ NaCl；琼脂糖；含有 RNA 酶的 TE：200 μL TE 中加入 1 μL 50 $mg \cdot mL^{-1}$ 的 RNAase。以上所用 Tris-HCl、EDTA 均由 pH 8.0 的 1 $mol \cdot L^{-1}$ Tris-HCl 和 0.5 $mol \cdot L^{-1}$ EDTA 母液稀释。试剂组分均购自北京碧橙蓝生物科技有限责任公司。

1.1.3 仪器

低温高速离心机（SIGMA3K30，德国）；台式高速冷冻大容量离心机（Eppendorf 5810R，德国）；超高速低温离心机（Beckman L-80 XP，美国）；高速分散机（IKA® T18，德国）；电泳仪（DYY-8C，北京市六一仪器厂）；微量分光光度计（Thermo NanoDrop 2000，美国）；PCR 仪（Applied Biosystes 9700，美国）。

1.2 方法

1.2.1 叶绿体的分离

本文在 Diekmann、李西文等[9, 10]改良的方法基础上，针对龙胆科秦艽材料的特殊性，做出如下改良，一方面，匀浆过程中加入 Buffer A 的体积扩到 1:10。为比较此步的作用，提取粗茎秦艽时按照等文献中方法加入 400 mL 预冷的（4℃）Buffer A，麻花秦艽加 800 mL Buffer A。另一方面，Buffer A 配方中 BSA 和 DTT 在匀浆前加入，防止久置丧失其抗氧化作用，见图 1。

1.2.2 提取 cpDNA

加入 CTAB/NaCl 溶解 cpDNA 细胞膜过程中，加入 5%PVP40，有效去除吸取叶绿体细胞器过程中带入多糖的污染，同时去除 DNA 酚的污染见图 1。

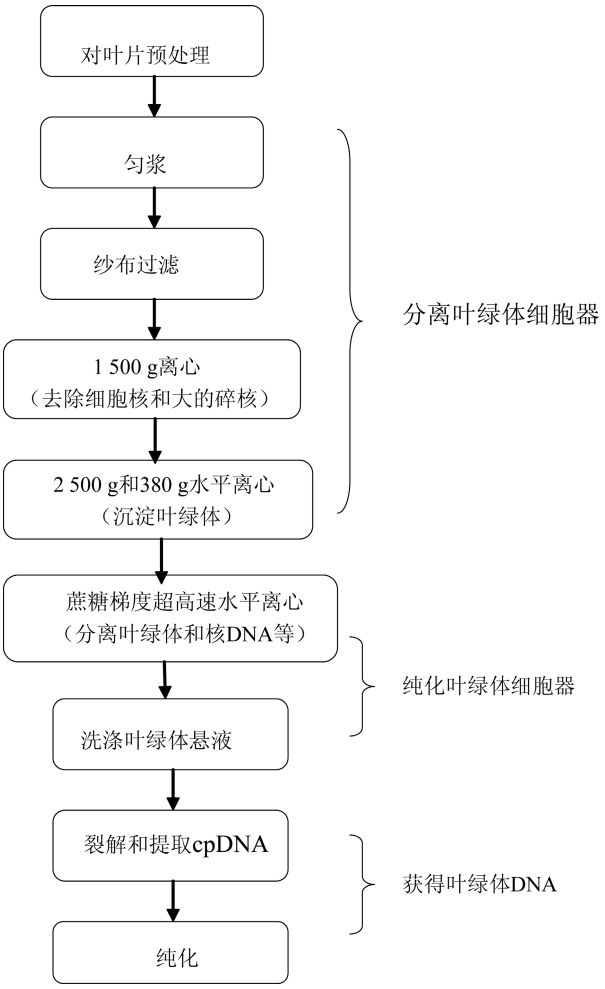

图 1 改良蔗糖密度梯度法提取叶绿体基因组 DNA 实验流程图

表 1 植物样品采集表

序号	名称	拉丁名	采集地点	采集人
1	麻花秦艽	*Gentiana straminea* Maxim.	西藏昌都地区丁青县	倪梁红
2	粗茎秦艽	*Gentiana crasicaulis* Duthie ex Burk.	西藏昌都地区丁青县	倪梁红

1.2.3 叶绿体的纯化

采用天根试剂盒 Qiagen MiniElute PCR Purification Kit (50)，按照说明书纯化 cpDNA。

1.2.4 cpDNA 质量检测

利用 NanoDrop 2000 微量分光光度计检测纯化前、后 cpDNA 的浓度、A_{260}/A_{280} 和 A_{260}/A_{230} 比值，初步判断 cpDNA 的提取效率和纯度。取 1 μL 纯化后的 cpDNA 进行 PCR 实验，扩增核基因 ITS2，以验证是否有核污染。扩增正向引物：5-GCGATACTTGGTGTGAAT-3，反向引物：5-GACGCTTCTCCA GACTACAAT-3。

PCR 反应体积为 25 μL，体系内含 2×Taq PCR Master Mix 12.5 μL、引物各 1.0 μL (2.5 μmol·L^{-1})、ddH_2O 8.5 μL、总 DNA 1 μL。PCR 扩增程序为 94℃，5 min；94℃，30 s；56℃，30 s；72℃，45 s，40 个循环；72℃，10 min。PCR 扩增产物经 1%琼脂糖电泳检测，90 V 电泳 40 min，用 BIO-RAD 公司凝胶电泳成像自动分析仪拍照记录。以 Qubit 快速荧光定量系统准确测定 cpDNA 浓度。

2 结果与分析

2.1 NanoDrop 微量分光光度计检测结果

麻花秦艽 cpDNA 得率较理想，为 25.75 μg /10 g 叶片，见表 2，与其他文献比较，叶绿体得率相对较高，如白菜[11]叶绿体得率为 5~150 μg/10 g，赤枝栲[12]和小麦[13]得率约 10 μg/10 g。而粗茎秦艽 cpDNA 得率仅为 6.25 μg/10 g 叶片。麻花秦艽比粗茎秦艽得率高，主要由于匀浆环节所加 Buffer A 体积的差异，麻花秦艽所加入 Buffer A 的体积由原来的 1:5 扩大到 1:10，而粗茎秦艽仍采用原来的比例。匀浆过程中，细胞破碎，秦艽中龙胆苦苷释放到酸性的 Buffer A 中，苷键遇酸催化水解，得到大量的糖分子。导致滤液粘稠，叶绿体细胞不易通过纱布，损失较多。因此，最终得到的叶绿体细胞器少，粗茎秦艽 cpDNA 得率较低。

2.2 cpDNA 的纯化结果

采用天根试剂盒纯化后 OD 值，浓度以 Qubit 快速荧光定量系统测得。结果表明，获得的 cpDNA OD 值 A_{260}/A_{280} 在 1.8~2.0 之间，A_{260}/A_{230} 大于 2.0，没有蛋白质和 RNA 污染，其电泳带也表明无杂质蛋白和 RNA 污染，带型无降解拖尾现象。同时 ITS 2 扩增没有显示条带，验证了没有核污染，所得 DNA 纯度很高。最终以 Qubit 测得 DNA 双链的含量为 0.82 μg 和 3.2 μg，满足后续三代测序叶绿体基因组量的要求 (建库起始量>500 ng)。

NanoDrop 微量分光光度计测得麻花秦艽和粗茎秦艽纯化前总产量分别为 206 μg 和 50 μg，而纯化后分别为 3.2 μg 和 0.82 μg，二者差距较大。一方面，这与二者原理有关。NanoDrop 微量分光光度计采用紫外吸光度检测，无法区分出 DNA、RNA、降解核酸、游离核苷酸及其它杂质，其读数不准确。而 Qubit 定量平台采用荧光染料检测特定目标分子的浓度，与紫外吸收检测法相比，具有更高的准确度和灵敏度。另一方面，纯化前 A_{260}/A_{280} 大于 2.0，纯化后 A_{260}/A_{230} 比值在 1.8~2.0 之间，并且纯化后的回收率较低 (1.5%~1.6%)，说明提取的 cpDNA 中含一部分 RNA。可能是提取过程中 RNA 酶消化不完全所致，后续实验中可增长消化时间来改进。结果见表

表 2 秦艽 cpDNA 质量检测

样品名称	起始量/g	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}	M/μg
粗茎秦艽	80	2.07	2.19	50
麻花秦艽	80	2.03	2.28	206

表 3 秦艽 cpDNA 纯化后质量检测

样品名称	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}	M/μg
粗茎秦艽	1.82	2.06	0.82
麻花秦艽	1.89	2.31	3.20

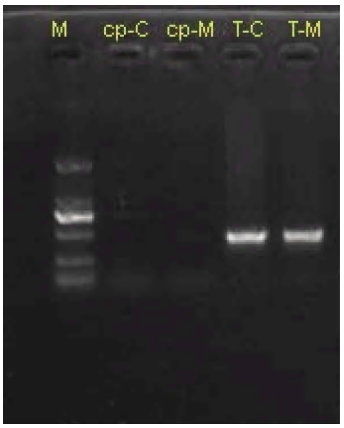

图 2 纯化后 cpDNA 与总 DNA 的 ITS 2 扩增电泳图谱

注：M：DM2000；cp-C：粗茎秦艽 cpDNA；cp-M：麻花秦艽 cpDNA；T-C：粗茎秦艽总 DNA；T-M：麻花秦艽总 DNA。

3、图 2。

由于文献大多仅采用紫外技术进行 DNA 的定量和纯度的检测[14~16]，该方法仅起到定性作用，仅能进行普通 DNA 标记实验，基因组测序则达不到目的。一方面，该方法受到多种因素的干扰，DNA 含量定量不准确，达不到建库的用量；另一方面，DNA 核序列污染难以检测，无法进行后期的生物信息学分析，得不到基因组完整序列。本研究把紫外检测、电泳技术与文库构建测序相结合，综合评价了提取流程的有效性，以保证后续实验的顺利开展。

3 讨论

足量、高纯度的 cpDNA 是进行高通量测序的先决条件。目前用于高等植物 cpDNA 提取的方法主要有 DNase I 法[17]、无水法[18]、高盐低 pH 值法[19]、Percoll 梯度法[20]、蔗糖密度梯度离心法[21]等。DNase I 法可以去除叶绿体表面附着的核 DNA，但是耗时长，并且对物种有一定局限性，赵衍等发现水稻叶绿体膜可能对 DNase I 具有较大的通透性，在消除核 DNA 的同时，叶绿体 DNA 也被大量降解；无水法耗时耗力；高盐低 pH 值法可以有效地控制核 DNA 的污染，但非 DNA 的污染往往存在，酚类物质在提取过程中氧化为醌类物质而吸附于叶绿体 DNA 上，极难除去，容易抑制叶绿体 DNA 的酶切反应；使用 Percoll 梯度法则成本较高。鉴于不同物种进行提取 cpDNA 所遇到的问题不同，如多糖、多酚等，刘少林等[22]用改进的高盐低 pH 法分离和纯化棉花叶绿体 DNA，Kerstin 等[9]发表了针对单子叶植物富含纤维的禾本科草本植物的基于质体全基因组测序的叶绿体优化提取技术流程，尽管在多个物种上效果明显，但主要集中到几个农作物相关的科属，应用不够广泛。

秦艽叶片质硬且厚，主要化学成分为龙胆苦苷，提取过程中水解为多糖等复杂的代谢物质，这些物质容易与 DNA 不可逆地粘附从而污染 DNA，给 cpDNA 的提取造成很大干扰。目前常用的叶绿体提取方法是直接通过分离核细胞提取 cpDNA，得到的 cpDNA 往往存在量少、核 DNA 或线粒体 DNA 污染等问题，限制后续研究。本实验以龙胆科秦艽为例，在原有的 cpDNA 提取方法的基础上进行了改良，对秦艽 cpDNA 的提取方法进行了优化，获得了高纯度、高质量的秦艽 cpDNA，为设计一种高效及通用性的 cpDNA 提取方法提供了研究基础，同时也为秦艽叶绿体基因组全序列的获得提供保障。叶绿体基因组研究对秦艽遗传多样性以及资源保护具有重要意义[23]。本文对获得高质量秦艽 cpDNA 的研究，将是进一步挖掘秦艽叶绿体基因组丰富的遗传信息对其资源保护研究的前提[24]。药用植物 cpDNA 提取的研究，将有利于找到一种通用而便捷药用植物 cpDNA 的提取方法，除了极大地丰富叶绿体基因组序列的数量，更重要的是进一步推动药用植物叶绿体研究在分子育种、遗传转化以及濒危物种资源保护等方面的进程。

参考文献

1 Shinozaki K, Ohme M, Tanaka M, *et al*. The complete nucleotide sequence of the tobacco chloroplast genome: its gene organization and expression. *EMBO J*, 1986, 5(9):2043~2049.

2 Craig W, Lenzi P, Scotti N, *et al*. Transplastomic tobacco plants expressing a fatty acid desaturase gene exhibit altered fatty acid profiles and improved cold tolerance. *Transgenic Res*, 2008, 17(5):769~782.

3 邢少辰. 叶绿体基因组研究进展. 生物化学与生物物理进展, 2008, 35(1):21~28.

4 Li X, Gao H, Wang Y, *et al*. Complete chloroplast genome sequence of Magnolia grandiflora and comparative analysis with related species. Science China. *Life Sci*, 2013, 56(2):189~198.

5 林小涵,刘志华,李卿,等.药用植物叶绿体基因组研究.世界科学技术-中医药现代化, 2010,12(3):442~446.

6 John E , Adrian F, Jeremy G, *et al*. Real-Time DNA Sequencing from Single Polymerase Molecules. *Science*,2009,323(5910):133~138.

7 罗焜,马培,姚辉,等.多基原药材秦艽 ITS2 条形码鉴定研究.药学学报,2012,47(12):1710~1717.

8 张得钧,高庆波,李福安,等. 青海栽培黄管秦艽的叶绿体 DNA psbA-trnH 核苷酸变异和遗传分析.安徽农业科学, 2011, 39(25):15215~15217.

9 Diekmann K, Hodkinson T R, Fricke E, *et al*. An optimized chloroplast DNA extraction protocol for grasses (Poaceae) proves suitable for whole plastid genome sequencing and SNP detection. *PLoS One*, 2008, 3(7):e2813.

10 李西文,胡志刚,林小涵,等.基于 454FLX 高通量技术的厚朴叶绿体全基因组测序及应用研究.药学学报, 2012, 47(1):124~130.

11 史公军,侯喜林,王彦华.白菜叶绿体 DNA 快速提取及分析.应用与环境生物学报, 2005, 11(3):283~285.

12 张宜辉,邹娟,连玉武,等.赤枝栲叶绿体 DNA 的提纯方法研究.厦门大学学报:自然科学版, 2003, 42(2):257~260.

13 彭隽敏,孔青,徐乃瑜.云南小麦, 西藏半野生小麦和普通小麦叶绿体 DNA 限制性内切酶图谱的研究.遗传, 1995, 17(6):4~6.

14 卢太白,曾玲,李坤,等.绿色蔬菜叶绿体 DNA 的提取和纯化.西北农业学报,2006,15(1):186~188.
15 龙兴,曾继吾,黄秉智,等. 香蕉叶绿体分离及叶绿体 DNA 提取方法.江西农业大学学报,2008, 3(30):534~538.
16 孙晓荣,易鼎杰,何桥,等.三倍体枇杷叶绿体 DNA 提取方法的优化.西南师范大学学报(自然科学版), 2012,37(2):93~96.
17 Hermanm R G. Methods in chloroplast molecular biology. *New York: Elsevier Amsterdam*, 1982.
18 Wu N H, Cote J C, Wu R. Structure of the chloroplast *psbA* gene encoding the QB protein from *Oryza sativa* L. *Develop Genet*, 1987, 8(5-6):339~350.
19 Gong X S, Yan L F. Improved procedure for purification of chloroplast DNA in higher plants. *Chin Sci Bull*, 1991, 6:467~469.
20 Heinhorst S, Gannon C G, Galup E, *et al*. Clone bank and physical and genetic map of potato chloroplast DNA. *Theor Appl Genet*, 1988, 75(2):244~251.
21 Hiral A, Ichikawa H, Lwatsuki N, *et al*. Rice chloroplast DNA: a physical map and the location of the genes for the large sub2 unit of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase and the 32 kd photosystem II reaction center protein. *Theor Appl Genet*, 1985,70:117~122.
22 刘少林,靖深容,郭立平,等.用改进的高盐低 pH 法分离和纯化棉花叶绿体 DNA.棉花学报, 1997, 9(5):239~241.
23 陈士林,苏钢强,邹健强,等.中国中药资源可持续发展体系构建.中国中药杂志,2005,30(15):1141~1146.
24 陈士林,郭宝林.中药资源的可持续利用.世界科学技术-中医药现代化,2004,6(1):1~8.

Study on Extraction of cpDNA from Endangered Medicinal Plant of *Gentiana straminea* Maxim. and *Gentiana crassicaulis* Duthie ex Burk.

Gao Huanhuan [1, 3], Ni Lianghong [2], Hu Zhigang [1], Yao Hui [3], Wu Hezhen [1], Pan Honglin [1]

(1. College of Pharmacy, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China;
2. College of Pharmacy, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China;
3. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100193, China)

Abstract: This study was aimed to show the extraction research of cpDNA in *Gentiana straminea* Maxim. and *G. crassicaulis* Duthie ex Burk., which will increase the knowledge about the chloroplast genome sequence characteristics, understand its genetic diversity and improve the efficiency of breeding schemes. *G. straminea* Maxim. and *G. crassicaulis* Duthie ex Burk. were taken as study objects. The improved sucrose-gradient centrifugation and purification methods were used to obtain the cpDNA, measure the concentration, detect the OD value, and amplify the ITS2 sequence to verify the nucleus pollution. The results showed that the high quality and purity cpDNA (0.1 - 0.4 μg/10 g) was demonstrated without other pollution after ITS2 sequence amplification, which met to the subsequent efficient sequencing of chloroplast genomes. The purity and mass have an important influence on the accuracy and credibility of the cp genome sequencing. It was concluded that this study improved the sucrose-gradient centrifugation and purification with great effect of the purity and mass of cpDNA, and guaranteed the obtaining of complete cpDNA of *Gentiana*.

Keywords: *G. straminea* Maxim., *G. crassicaulis* Duthie ex Burk., cpDNA, extraction

(责任编辑 叶丽萍 张志华,责任译审 王 晶)