

不同年代云南普洱茶 DNA 提取分离方法初探*

周 杨¹, 龚加顺^{1**}, 和志娇², 和根强³

- (1. 云南农业大学食品科学技术学院, 云南 昆明 650201;
2. 云南农业大学, 云南省植物病理重点实验室, 云南 昆明 650201;
3. 云南省潞西市农业局经济作物推广站, 云南 潞西 678400)

摘要: 以不同年代(贮藏时间)的云南普洱茶为原料,通过改进的 CTAB 方法来提取分离云南普洱茶总 DNA, 试验表明,所采用的经改进的 CTAB DNA 微量提取法,可以得到高质量的云南普洱茶 DNA。建立了适合云南普洱茶 DNA 的提取方法,为进一步研究云南普洱茶贮藏年代的遗传图谱奠定了基础。

关键词: 云南普洱茶; CTAB DNA 提取法; DNA

中图分类号: S 571.1.032 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-390X(2006)03-0396-03

Study on Extraction and Separation of DNAs of Yunnan Pu-erh Tea in Different Years

ZHOU Yang¹, GONG Jia-shun¹, HE Zhi-jiao², HE Gen-qiang³

- (1. Faculty of Food Science and Technology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China;
2. Key Laboratory for Plant Pathology of Yunnan Province, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China;
3. Station for Popularizing Economic Crops, Agricultural Bureau of Luxi, Luxi 678400, China)

Abstract: Total DNA from Yunnan pu-erh tea in different years is extracted and separated through improved CTAB method. Results indicate that the high quality DNA from Yunnan pu-erh tea can be obtained with the new method and this builds a foundation of further research of genetic map about Yunnan pu-erh tea years.

Key words: Yunnan pu-erh tea; CTAB DNA method; DNA

云南是茶树[*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze]的原产地中心,茶树种质资源的数量和质量在世界上占有绝对优势^[1]。云南茶叶中以普洱茶最为有名。“普洱茶”一词因茶叶集中在普洱境内加工、集散贸易而得名。它是以云南大叶种制成的优质晒青毛茶为原料,经渥堆后发酵和陈化工序而制得,形成了普洱茶干茶色泽褐红、条索肥壮重实、耐贮耐泡,茶汤红浓明亮、陈香显著、滋味浓醇回甘,叶底褐红柔软的品质特点^[2]。一直以来普洱茶有越陈越好的说法,在流通领域,越陈的普洱茶市场价格也越高^[3]。因此普洱茶的贮藏年代成了市场

炒作的热点,许多商人以新茶代替陈茶,谋取暴利,使普洱茶市场出现价格混乱。如何制定普洱茶质量标准 and 建立有效的品质、年代鉴定方法,帮助消费者正确认识普洱茶,规范普洱茶市场是一些急待解决的问题,也是广大茶叶科学工作者的一个努力方向。

近年来,随着分子生物学的发展,遗传物质 DNA 的检测由于简便、快捷、灵敏,不受环境条件的影响等特点广泛用于茶树的遗传研究领域。但大多数是以茶树的新鲜嫩叶为材料探讨茶树品种资源的遗传多样性方面的研究,至今未见以云南普

收稿日期: 2005-09-14

* 基金项目: 云南省自然科学基金重点项目资助(2003C0007Z)

** 通讯作者

作者简介: 周杨(1980-),男,湖南长沙人,在读硕士研究生,主要从事食品生物技术研究。

洱茶为原料,特别是以不同贮藏时间的成品普洱茶为原料,对其遗传物质变化及贮藏时间关系的研究报道。为了探讨云南普洱茶 DNA 遗传物质与贮藏年代的关系,本试验研究了不同年代(贮藏时间)的云南普洱茶遗传物质 DNA 的提取方法。

1 材料与方法

1.1 材料

云南普洱茶八级(1984年)、云南普洱茶晒青一级(1989年)、云南普洱茶晒青十级(1989年)、云南普洱茶 79072、云南普洱茶(新工艺,2001年)、云南普洱茶新茶(2004年)、云南普洱茶新茶(2004年06月19日)、云南普洱茶四翻样(发酵40 d后的第4次取样,2004)等8个样品。所用试剂均为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 总 DNA 提取

总 DNA 提取方法主要参照 AHRENS 等的方法^[4],并加以改进,改进后的 CTAB 法具体步骤如下:

(1) 样品处理:成年茶叶打磨成粉,烘箱 45℃ 烘干至衡重;

(2) 取经干燥后的茶样粉末各 0.3 g,放入预先经过冷处理的研钵中,用液氮冷冻后充分研磨;

(3) 将细粉末转移到 1.5 mL 的 Eppendorf 管中,加入 0.6 mL 预热到 60℃ 的 CTAB DNA 提取缓冲液(2% CTAB, 1.4 mol/L NaCl, 20 mmol/L EDTA, 100 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 0.2% α -巯基乙醇, 2% PVP),在 60℃ 水浴中保温提取 30 min;

(4) 从水浴中取出离心管,加入等体积氯仿:异戊醇(24:1),抽提 30 min;

(5) 12 000 r/min 离心 8 min,取上清液转移至另一新离心管中,重复(3),(4)步直至蛋白质除尽;

(6) 加入等体积氯仿:异戊醇(24:1),抽提 30 min;12 000 r/min 离心 8 min,取上清液(重复 1 次);

(7) 每管中加入 2 倍体积预冷的无水乙醇(100%)和 1/10 体积的 3 mol/L 醋酸钠,混匀, -20℃ 保持至少 30 min,使核酸沉淀,14 000 r/min 离心 10 min,弃上清液;

(8) 沉淀经 2 次 70% 乙醇洗涤,真空干燥;

(9) 沉淀溶解于 100 μ L 灭菌双蒸水中或 100 μ L TE 缓冲液中(10 mmol/L Tris-HCl pH 8.0; 1 mmol/L EDTA pH 8.0);

1.2.2 琼脂糖凝胶电泳

取 1 μ L DNA 经 0.7% 琼脂糖凝胶电泳,恒压 120 V,电流 75 A,电泳时间为 1 h。EB 染色 20 min,观察电泳结果,计算 DNA 浓度。

2 结果与分析

由于与其它作物基因组 DNA 相比,茶叶中多酚类物质含量比较丰富,加上蛋白质等会对 DNA 提取质量有影响。采用一般植物 DNA CTAB 法提取效果不是很好,条带不清晰,如图 1 所示。



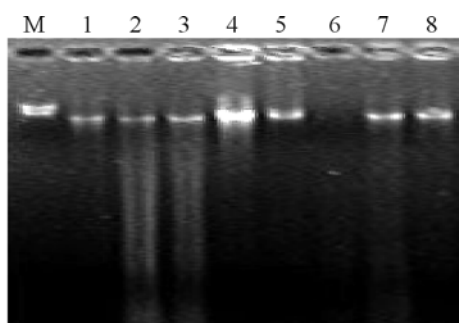
1. 云南普洱茶新茶(2004年); 2. 云南普洱茶四翻样(2004年)
1. new tea(2004); 2. tea of fourth pile(2004)

图 1 CTAB法提取的普洱茶基因组 DNA 琼脂糖凝胶电泳检测图

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis analysis of pu-erh tea DNAs extracted by CTAB method

采用改进的 CTAB 法,提取过程中重复改进的 CTAB 法中的步骤(3)和(4),提取到云南普洱茶基因组 DNA,如图 2 所示。结果表明,用一般的提取植物 DNA 的 CTAB 法提取效果不是很好,得到少量的 DNA,且条带不清晰。而采用改进的 CTAB 法来提取不同年代(贮藏时间)的云南普洱茶 DNA,可得到高相对分子量的云南普洱茶 DNA,电泳检查得到精确性高、重复性好的迁移带型。1 μ L 粗提物含有 30 ng 云南普洱茶 DNA,其中样品 6 号为 15 ng,条带相对不够亮。这符合进行遗传分析时,对 DNA 纯度的要求可以低一些,而其它要求如 DNA 的产量则显得更为重要的要求。通过改进方法提取得到的 DNA 完全可以满足进一步的随机扩

增多态性分析试验要求。本试验用的 DNA 提取方法具有以下特点:(1) 取样简单、用量少;(2) 适合大批量普洱茶样 DNA 的快速提取;(3) 与一般的提取植物 DNA 的 CTAB 法相比,提取缓冲液中加了 0.2% α -巯基乙醇,并在抽提过程中重复改进的 CTAB 法中的步骤(3)和(4),能有效的降低 DNA 粗提物中的蛋白质、多糖、单宁和色素等杂质。



M. λ DNA(30ng);

1. 云南普洱茶八级(1984年); 2. 云南普洱茶晒青一级(1989年);
3. 云南普洱茶晒青十级(1989年); 4. 云南普洱茶 79072;
5. 云南普洱茶(新工艺, 2001年); 6. 云南普洱茶新茶(2004年);
7. 云南普洱茶新茶(2004年.06.19); 8. 云南普洱茶四翻样(2004年)

M. λ DNA(30ng);

1. No eight class(1984); 2. sundried green tea of No one class(1989);
3. sundried green tea of No ten class(1989); 4. pu-erh tea 79072;
5. tea of new technology (2001); 6. new tea(2004);
7. new tea(19.06.2004); 8. tea of fourth pile(2004)

图 2 改进CTAB法提取的云南普洱茶基因组 DNA 琼脂糖凝胶电泳检测图

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis analysis of pu-erh tea DNAs extracted by improved CTAB method

3 讨论

本试验所选用的普洱茶原料有时间上的跨度,如云南普洱茶八级(1984年)、云南普洱茶新茶

(2004年),有经发酵过的茶和没有经过发酵的茶,如未发酵的云南普洱茶晒青一级(1989年)、云南普洱茶晒青十级(1989年),也有加工工艺不同的茶,如云南普洱茶(新工艺,2001年),但从图 2 可以看出普洱茶样品基因组 DNA 之间差异性不显著,也没有呈现出 DNA 降解的梯度条带,因此,用普洱茶总 DNA 电泳检测来判断普洱茶贮藏年代是不可行的,难于市场陈年普洱茶年代的鉴别。但能否通过进一步的 RAPD 技术对相同品种、不同年代的云南普洱茶基因组多态性进行研究,深入探讨遗传物质变化与贮藏年代的关系值得研究。本研究采用的改进的 CTAB 法,可为今后进一步研究 RAPD 技术应用于云南普洱茶 DNA 遗传物质与贮藏年代关系研究提供了基础。

[参考文献]

- [1] 高峻,蔡新,许明辉. 云南茶树 DNA 提取和 RAPD 分子标记初探[J]. 云南农业大学学报,2000,15(6): 126-129.
- [2] 罗龙新,吴小崇,邓余良,等. 云南普洱茶渥堆过程中生化成分的变化及其品质形成的关系[J]. 茶叶科学,1998,18(1):53-60.
- [3] 龚淑英,周树红. 普洱茶贮藏过程中主要化学成分含量及其感官品质变化的研究[J]. 茶叶科学,2002,22(1):51-56.
- [4] AHRENS U, SEEMULLER E. Detection of DNA of plant pathogenic mycoplasma-like organisms by a polymerase chain reaction that amplifies a sequence of the 16S rRNA gene[J]. Phytopathology, 1992, 82: 828-832.