不同种类中药材的 DNA 提取方法

曹琳[1],刘忠权[2],郝明干[2],王加连[2](1.江苏省药品检验所,江苏　南京 210008;2.盐城师范学院生物系,江苏　盐城 224002)

摘要:目的　根据不同种类中药材来选择 DNA 提取方法。方法　根据作者对各种药材鉴定的实践经验,结合国内外有关代表性的论文,进行归纳和整理。结果　分析了不同 DNA 提取方法适用范围和局限性。结论　根据药材种类、贮存时间,选取合适的提取方法和适当的样品量。

关键词:中药材;DNA 提取方法
中图分类号:R282.7;R917　　文献标识码:A　　文章编号:1007-7693(2004)06-0465-04

The methods for DNA extraction from various kinds of Chinese traditional medicines

CAO Lin[1], LIU Zhong-quan[2], HAO Ming-gan[2], WANG Jia-lian[2] (1. *Jiangsu Institute for Drug Control, Nanjing 210008, China*; 2. *Department of Biology, Yancheng Teachers College, Yancheng 224002, China*)

ABSTRACT: OBJECTIVE　A right method of DNA extraction was selected according to various kinds of Chinese traditional medicines. **METHOD**　The conclusion was drawn from identified experiment of authors and related to references. **RESULTS**　We analyzed the using ranges and limitation of methods of DNA extraction. **CONCLUSION**　The suitable methods and samples are chosen to both different kinds and reserved time of crude drugs.

KEY WORDS: Methods for DNA extraction; Chinese traditional medicine

中药材的鉴定标准从最初的性状鉴别,逐渐增加了显微、理化、色谱、光谱等方法。但是对一部分药材仅这些方法是难以达到鉴定目的。DNA 分子标记技术可以用于解决中药材鉴定中的难题,目前国内外运用分析药材中 DNA 的技术鉴定一些动植物药材已有大量报道[1~17]。我们在运用分子标记技术对各种药材进行鉴别时,感到能否从药材中提得 DNA 是分子技术的关键。由于商品药材多数经过加工处理,DNA 可能会出现不同程度的降解;植物药材中的多糖等次生物质,动物药材中的蛋白质,会影响 DNA 的提取和 PCR 的扩增;药材贮存时间的长短,药材的种类不同,如叶与根茎类药材,动物药材中的骨甲类与肌肉和分泌类,DNA 的提取方法相应有所不同。本实验根据我们对不同类药材分子鉴定研究的实践[1~9,16,17],探讨不同药材 DNA 的提取方法,目的是为生药分子鉴定的普及应用提供参考资料。

1　植物药材 DNA 的提取

1.1　SDS(十二烷基磺酸钠)法

参照文献[9]的方法并稍作改进。取适量样品干药材初步捣碎后,在液氮中研成粉,置 5 mL 的离心管中,加入 DNA 提取缓冲液(8 mol·L^{-1} 脲,0.35 mol·L^{-1} NaCl,0.05 mol·L^{-1} Tris-HCl,pH8.0,0.02 mol·L^{-1} EDTA,2%蔗糖,5%酚)3 mL 及 10% SDS 0.1 mL,混匀,60 ℃水浴保温 10 min,其间倒转数次。离心去除未消化沉淀,取上清,加入等体积的酚-氯仿(1∶1)、氯仿分别抽提一次,加 1/10 体积 mol·L^{-1} NaAc 和 2 倍体积无水乙醇沉淀,70%乙醇洗涤二次,晾干,加入适量 TE 或 ddH_2O 溶解,4 ℃保存。

1.2　CTAB(十二烷基溴化氨)法

参照文献[10]的方法并稍作改进。取适量样品干药材初步捣碎后,在液氮中研成粉,置 5 mL 的离心管中,加入在 60 ℃水浴中预热的 1×CTAB 提取缓冲液(0.7 mol·L^{-1} NaCl,0.05 mol·L^{-1} Tris-HCl,pH8.0,0.02 mol·L^{-1} EDTA,1% CTAB,使用前加 0.02 mol·L^{-1} β-巯基乙醇)3 mL,轻轻混匀,在 60 ℃水浴保温 10~30 min,取出冷却至室温,加入氯仿抽提一次,乙醇沉淀,70%乙醇洗涤,晾干,加入适量 TE 或 ddH_2O 溶解,4 ℃保存。

花叶类药材由于纤维含量少,DNA 相对较多,取 100 mg 的样品量,用 1.5 mL 离心管抽提。根茎类药材由于含纤维和贮藏物质等较多,需较多样品量才能提取到需要的 DNA,因此可用大的离心管(5 mL 或 15 mL)抽提。

基金项目:江苏省科技厅社会发展基金(BS2001016)资助
联系人:刘忠权,E-mail: zhongqliu@tom.com, Tel: 0515-8245097

以上两种方法通过我们的实践比较,SDS 法过程稍繁琐,而 CTAB 法经我们改进后,取消了第一步的饱和酚-氯仿的抽提、第二步的 RNA 酶的消化,只进行一次氯仿抽提,因为最后的 TE 溶解的 DNA 溶液,我们使用 DNA 纯化试剂盒纯化,能够去除色素、多糖、小片段的 RNA 等物质,所以简化了抽提过程,费时较少,效果很好(图 1 A)。而以往抽提 DNA 时,通过重复饱和酚-氯仿这一抽提过程,以去除色素、多糖等物质,但每重复一次抽提,DNA 相应的就会减少,而且并不能彻底去除这些物质,对 PCR 扩增非常不利(详见讨论)。

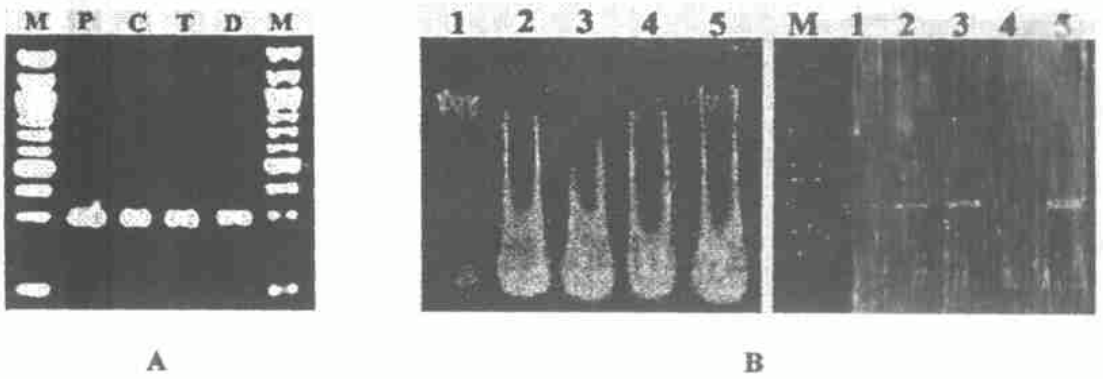

图 1　A:中药材白花蛇舌草正伪品 ITS-1 区 PCR 扩增产物琼脂糖凝胶电泳图。M:DNA Maker;P:松叶耳草,C:伞房花耳草,T:纤花耳草,D:白花蛇舌草。B:蛇胆的基因组 DNA 和 12S rRNA 基因片段 PCR 扩增结果电泳图(左为基因组 DNA,右为 PCR 扩增产物)。

Fig 1　A: Agarose gel electrophoresis of PCR amplification of ITS-1 region from Hedyotis diffusa. M: DNA Maker. P: Hedyotis pinifolia, C: Hedyotis corymbosa, T: Hedyotis tenelliflora, D: Hedyotis diffusa. B: Agarose gel electrophoresis of genemic DNA and PCR amplifications of 12S rRNA gene fragment from snake gallbladder (Genemic DNA on the left, PCR amplifications on the right).

2　动物药材 DNA 的提取

2.1　蛋白酶 K 法[11]

取捣碎的样品药材适量,用提取缓冲液(0.01 mol × L^{-1} Tris-HCl,pH8.0,0.1 mol × L^{-1} EDTA,0.1 mol × L^{-1} NaCl,SDS 0.8 %,蛋白酶 K 0.8 mg × mL^{-1})56 ℃水浴消化 8h,饱和酚、酚-氯仿(1∶1)、氯仿各抽提一次,加 1/10 体积 mol·L^{-1} NaAc 和 2 倍体积无水乙醇沉淀,70 %乙醇洗涤二次,晾干,TE 溶解,4 ℃保存。

2.2　加酶洗衣粉法[11]

取捣碎的样品药材适量于离心管中,与 40 mg 普通家用加酶洗衣粉和 1.5 mL 超纯水混合后,在 37 ℃水浴过夜消化,酚-氯仿-异丙醇(25∶24∶1)抽提,加 NaAc 和无水乙醇沉淀 DNA,乙醇洗涤,晾干后溶解。

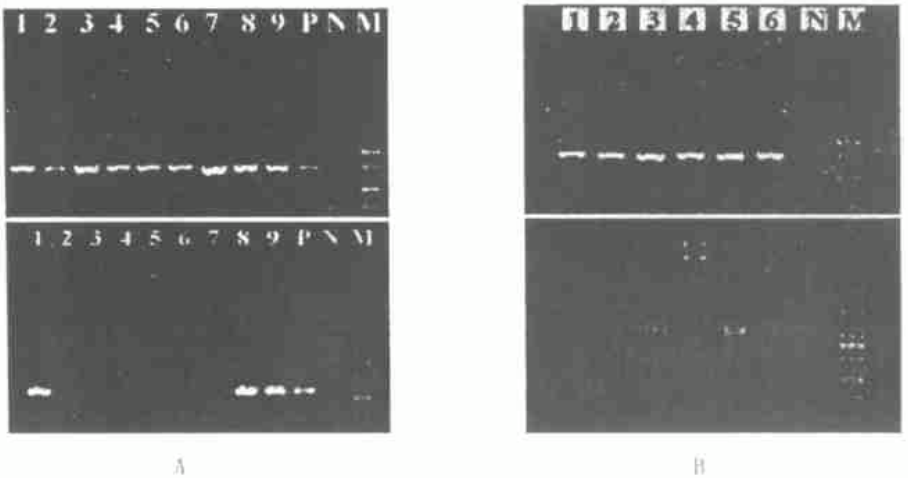

图 2　A:蛤蚧的线粒体 12S rRNA 基因片段鉴定电泳图(上为阳性对照;下为位点特异性 PCR 鉴定结果,1,8,9 号药材为正品,详见文献[17])。B:鳖甲的基因组 DNA 和线粒体 12S rRNA 基因片段 PCR 扩增结果电泳图(上为 PCR 扩增结果;下为基因组 DNA)。

Fig 2　A: Agarose gel electrophoresis of Gekko gecko's authentication by using mitochondrial 12S rRNA gene fragment (Positive control at the top, Authentication result of allele-specific PCR at the down, 1, 8, 9: genuine medicinal materials, see ref. 17). B: Agarose gel electrophoresis of genemic DNA and PCR amplifications of mtDNA 12S rRNA gene fragment from turtle shell (PCR amplifications at the top, Genemic DNA at the down).

动物肌肉类药材如海龙、蛇类、蛤蚧、蛤蟆油等,在消化前需进行紫外杀菌处理,充分捣碎,可以用1.5 mL离心管微量抽提。含有脂类较多的动物内脏器官如蛤蟆油,消化前取适量用不含蛋白酶K和SDS的缓冲液浸泡,在消化缓冲液中SDS含量需稍多加一些,有利于脱去脂类,但不能太多,否则会影响缓冲系统中的pH值,酚-氯仿抽提时将不分层[1~2,6,8,16,17](图2A)。

骨甲类药材如龟甲、鳖甲、鹿茸和塞龙骨等,这类药材由于DNA含量稍少,样品量需增大,一般用大的离心管(5 mL或15 mL)抽提。在消化前还需进行脱钙处理。方法是取骨甲约0.5~1.0g,用解剖刀细心将表面一层刮去,家用洗涤剂和超纯水清洗后,烘干,在离20 W紫外灯20cm处正反面各照射0.5h。用铜药臼捣成粉末,转入15mL离心管中。加入约20倍体积的0.5mol×L^{-1} EDTA(pH 8.0),56℃脱钙48h,其间换2次EDTA溶液。离心倒去EDTA溶液,加入5mL提取缓冲液(成分同上述肌肉提取)进行消化[3,4,7](图2B)。

动物胆汁等分泌类药材,在消化前同样需进行必要的处理。如干蛇胆用双蒸水浸泡6h,其间更换水数次,使其软化并洗去表面污染物;乙醇浸泡蛇胆,用流水浸泡1d,以除去酒精及表面污染物[5](图1B)。

3 注意点

DNA的提取必须做到:首先植物药材必须破坏细胞壁,以便释放细胞的物质。干药材先初步捣碎,然后用液氮研磨成粉末,动物药材由于没有细胞壁,捣碎后可直接消化。其次必须破坏细胞膜,使DNA能够释放到抽提液中。使用去污剂可以达到此目的,常见的如SDS或CTAB。同时去污剂和EDTA可以使内源性的核酸酶变性,EDTA可以螯合镁离子(镁离子对大多数核酸酶是必须的协同因子),从而保护DNA。最后尽量减少剧烈震荡,以免造成大片段DNA的断裂。

由于大多数商用洗衣粉都含有去污剂,酶(如蛋白酶、脂酶等)和螯合物(如EDTA)也是最常用的,用加酶洗衣粉法能快速提取DNA,并且不象其他缓冲系统,洗衣粉没有有害成分,因此既经济又简便快捷。

4 讨论

以上几种方法提得的药材DNA,与新鲜组织提取的DNA不同,一般都需要用DNA产物纯化试剂盒纯化。因为其中常常含有大量的RNA,蛋白质,多糖,植物药材DNA还含有鞣酸、色素等次生物质,这些很难与DNA分开。大多数的蛋白质可以通过变性和沉淀来去除,用酚、氯仿/异丙醇抽提。中药材中多糖是相当多的,与DNA一起沉淀象凝胶一样,很难去除,并抑制随后PCR中DNA多聚酶的活性。通过DNA纯化的方法可以去除这些物质,如一次不能去除,可多次重复纯化。

任何提取方法应注意保证DNA的长度和产量,同时提取过程应该尽量快速、简便和便宜,还要避免使用有害化学物质。目前市场上已有DNA提取试剂盒,这种试剂盒比较适合新鲜的植物叶和动物肌肉类DNA的微量提取;由于中药材的特殊性,DNA有大量降解,有时要根据药材本身的特点,如植物药材的根茎,动物药材的骨甲,胆囊等,药材的提取量要有所不同;同时试剂盒的价格也很昂贵,因此实际中并不太适用。

药材的选择要注意避免霉变、虫蛀,以防DNA的污染。另外,还应注意从中药材提取的DNA用5μL点样电泳,在紫外灯下检测,有时并不能看见DNA,但并不意味着没有DNA,可以继续PCR扩增,将DNA模板适当增多,只有不能PCR扩增,才能确定没有提到DNA。总之,中药材DNA的提取,要根据药材种类、贮存时间,选取合适的提取方法和适当的样品量。

参考文献

[1] 王义权,周开亚,徐珞珊,等. 金钱白花蛇及其伪品的Cyt b基因片段序列分析和PCR鉴别研究[J]. 药学学报,1998,33(12):941.

[2] 王义权,周开亚. 蛇类药材的分子遗传标记鉴别的初步研究[J]. 药学学报,1997,32(5):384.

[3] 刘中权,王义权,周开亚. 从高温高压蒸煮过的中华鳖甲和骨骼中提取及扩增DNA[J]. 中草药,2000,31(5):343.

[4] 刘中权,王义权,周开亚等. 中药材龟甲及原动物的高特异性PCR鉴定研究[J]. 药学学报,1999,34(12):941.

[5] 刘向华,王义权,刘忠权,等. 中药材蛇胆的DNA分子标记鉴定研究[J]. 药学学报,2001,36(3):229.

[6] 杨学干,王义权,周开亚,等. 中药材蛤蟆油PCR鉴定的初步研究[J]. 应用与环境生物学报,2000,6(2):166.

[7] 吴平,周开亚,徐珞珊,等. 用聚合酶链式反应产物直接测序技术鉴定中药材鳖甲[J]. 中国药科大学学报,1998,29(1):28.

[8] 吴平,周开亚,张朝晖,等. 海马类药材分子遗传标记鉴定研究[J]. 药学学报,1998,33(3):226.

[9] 蔡金娜,周开亚,徐珞珊,等. 中国不同地区蛇床的rDNA ITS序列分析[J]. 药学学报,2000,35(1):56.

[10] 蔡朝晖,李萍,董婷霞,等. 贝母的分子生物学鉴定方法的研究[J]. 药学学报,2000,35(4):309.

[11] Bahl A, Pfenninger M. A rapid method of DNA isolation using laundry detergent[J]. Nucleic Acids Res, 1996, 24(7):1587.

[12] Cheung KS, Kwan HS, But PPH, *et al*. Pharmacognostical identification of American and Oriental ginseng roots by genomic fingerprinting using arbitrarily primed polymerase chain reaction (AP-PCR)[J]. J Ethnopharmacol, 1994, 42:67.

[13] Fushimi H, Komatsu K, Isobe M, *et al*. Application of PCR-RFLP and MASA analyses on 18S ribosomal RNA gene sequence for the identification of three ginseng drugs[J]. Biol Pharm Bull, 1997, 20:765.

[14] Mizukami H, Hao BS, Tanaka T. Nucleotide Sequence of 5S-rRNA intergenic spacer region in angelica acutiloba[J]. Natural Medicines, 1997, 51(4):376.

[15] Shaw PC, But PPH. Authentication of *Panax species* and their adulterants by random-primed polymerase chain reaction[J].

Planta Med, 1995, 61:466.

[16] Wang YQ, Zhou KY, Xu LH, *et al*. Authentication of an animal crude drug, Zaocys, by diagnostic PCR[J]. Biol. Pharm Bull, 2000, 23(5): 585.

[17] Liu ZQ, Wang YQ, Zhou KY, *et al*. Authentication of Chinese Crude Drug, Gecko, by Allele-Specific Diagnostic PCR[J]. Planta Med, 2001, 67(4): 385.

收稿日期:2003-11-31