

角类动物药 DNA 提取方法研究

张小慧, 席啸虎, 王世伟, 刘霞*

山西省中医院, 山西 太原 030012

摘要: **目的** 建立角类动物药材的 DNA 提取方法, 使提取的 DNA 质量满足 PCR 及测序要求, 同时可用于陈旧动物角类样品的 DNA 提取。**方法** 为避免取骨塞部位用 EDTA 脱钙造成 DNA 提取不完全或 DNA 被破坏, 取角质层部位, 采用二硫苏糖醇(DTT)结合化学试剂盒中的细胞裂解液及蛋白酶 K 处理角质层样本, 其余按试剂盒操作提取 DNA。考察了取样量、DTT 用量对角质部位 DNA 质量的影响。**结果** 确定了取样量为 25 mg, DTT 用量为 20 μ L, 角质细胞裂解完全, 所有样品的 DNA 质量均可满足 PCR 要求。**结论** 建立的 DNA 提取方法, 提取 DNA 完全, 可标准化操作, 可应用于多种动物角的提取。

关键词: 角类动物药; DNA 提取; 角质层; EDTA; PCR

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2017)24-5242-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.24.028

Study on extraction of DNA from animal cornu

ZHANG Xiao-hui, XI Xiao-hu, WANG Shi-wei, LIU Xia

Shanxi Province Hospital of Traditional Chinese Medicine, Taiyuan 030012, China

Abstract: Objective To establish the method of DNA extraction for animal cornu, ensuring the quality of extracted DNA to meet the requirement of PCR and sequencing, which can be used in DNA extraction for the old animal horn samples. **Methods** To avoid incomplete DNA extraction or damaged DNA by using EDTA decalcify when drawing material from bone, DTT, cell lysis solution and proteinase K were used to treat horn cells when drawing material from horny layer, other steps of DNA extraction were operated according to the reagent kit instructions. The effects of sampling amount and DTT dosage on the quality of DNA from horny layer were also investigated. **Results** The sampling amount was 25 mg, DTT dosage was 20 μ L, horn cells can be lysed completely, and the quality of DNA of all samples can meet the requirements of PCR. **Conclusion** The method of DNA extraction from animal cornu established in this study can extract DNA completely, ensure standardized operation, and could be applied to the extraction of various animal horns.

Key words: animal cornu; DNA extraction; horny layer; EDTA; PCR

在祖国医学中, 一些动物角有显著的临床疗效。如羚羊角具有平肝熄风、清肝明目、散血解毒的功效; 水牛角具有清热凉血、解毒、定惊的功效^[1]。因角类动物药材资源有限, 价格昂贵, 易混品较多, 传统鉴定方法主要依赖经验丰富的鉴定专家, 一般中药材质量验收人员缺乏性状鉴别经验, 难以确保用药有效性。现代分子生物学技术不受样品状态影响, 可通过分析其遗传物质 DNA 的差异实现对动物物种的鉴定。存在于动物线粒体的 CO1 基因已在鱼类、鸟类等分类中得到成功的运用, 能有效识别新物种, 被认为是全球动物物种鉴定的通用条形码, 其片段序列可作为种内多样性和种间特异性的一种

新的身份识别系统^[2-5]。目前, 对于动物药及混伪品的鉴定多通过聚合酶链反应 (PCR) 技术扩增线粒体上的 CO1 基因, 通过序列比对、计算遗传距离、构建系统发育树等来分析正品及混伪品。该技术已用在多种动物药材的不同组织样本 (如肌肉、血液) 的 DNA 扩增, 并取得较好的研究结果。然而, 对于具有角质层及骨塞的羊角类及牛角类等坚硬样品的 DNA 提取, 若取角质层部位, 用通用动物组织 (肌肉、血液) 的 DNA 提取方法, 存在角质细胞裂解不彻底, 尤其对于长时间放置的降解样品, 提出的 DNA 模板浓度低, 无法进行 PCR 及测序, 满足不了序列比对及序列结果分析, 达不到鉴定的目的。

收稿日期: 2017-05-12

基金项目: 山西省中医药研究院院级项目 (201509)

作者简介: 张小慧 (1981—), 女, 主管药师, 研究方向为中药材质量研究。Tel: (0351)4668317 E-mail: xhz0929@sohu.com

*通信作者 刘霞 Tel: (0351)4668308 E-mail: liuxia650829@126.com

而取骨塞部位时,需用 EDTA 脱钙预处理,因脱钙次数和时间不好掌握,时间过短造成 DNA 提取不完全,过长及次数过多造成 DNA 被破坏,不适合于低浓度模板样品的 DNA 提取研究。为将 PCR 技术用于角类动物药的鉴定上,最大程度提取角类药材的 DNA,本研究取角质层部位,根据角蛋白的化学特征,采用二硫苏糖醇 (DTT) 结合通用动物组织 (肌肉、血液) 的 DNA 提取方法提取角质层的 DNA,对影响提取结果的关键因素如取样量、DTT 的用量等进行了考察,取得了较好的结果。

1 材料与仪器

收集河北安国药材市场和安徽亳州药材市场及民间收藏的角类动物药材,包括羚羊角 *Saiga Tatarica Cornu*、藏羚羊角 *Pantholops hodgsonii Cornu*、黄羊 *Procapra gutturosa* Pallas 角、山羊角 *Capra Hircus Cornu*、绵羊角 *Ovis Aries Cornu*、牦牛角 *Bos Grunniens Cornu*、黄牛 *Bostaurus domesticus* Gmelin 角、水牛角 *Bubalus Bubalis Cornu*, 样品基原由山西省药品检验所高天爱主任药师鉴定。样品信息见表 1。

表 1 样品信息

Table 1 Information of samples

编号	样品名称	样品存放时间/年	产地
1	羚羊角 (个子)	15	西伯利亚
2	羚羊角 (丝)	5	中国安徽
3	羚羊角 (块)	13	俄罗斯
4	藏羚羊角 (个子)	12	中国新疆
5	黄羊角 (个子)	3	中国内蒙古
6	山羊角 (个子)	2	中国新疆
7	绵羊角 (个子)	3	中国内蒙古
8	牦牛角 (个子)	7	中国西藏
9	黄牛角 (个子)	5	中国湖南
10	水牛角 (个子)	3	中国湖南

血液/细胞组织基因组 DNA 提取试剂盒 (离心柱型), 目录号: DP304, 天根生化科技有限公司; DL 2 000 DNA Marker, 6×Loading Buffer 宝生物工程 (大连) 有限公司; 2×Easy Tag SuperMix 全式金; Gold View I 型核酸染色剂、DTT、葡聚糖凝胶、TRIS、EDTA Na₂, 北京索来宝生物科技有限公司; 其他试剂均为分析纯。

BSA124S 电子天平, 赛多利斯科学仪器有限公司; CHB-100A 恒温金属浴, 杭州博日科技有限公司; XW-80A 旋涡混合器, 上海精科实业有限公司; LX-200 迷你离心机, 海门市其林贝尔仪器; T960

型 PCR 热循环仪, 杭州晶格科学仪器有限公司; DYY-6B 型稳压稳流电泳仪, 北京市六一仪器厂; ZF-258 全自动凝胶成像仪, 上海嘉鹏科技有限公司; Nano Drop 2000 DNA 浓度测试仪。

2 方法和结果

2.1 样品的处理

2.1.1 个子样品处理 先将样品用电锯切割横截面, 将样品切割成片状, 然后将片状样品用刀片刮去角质层的外层污染, 取内层, 削成细薄片; 块状样品: 用刀片刮去角质层的外层污染, 取内层, 削成细薄片。

2.1.2 丝状样品处理 用 75%乙醇清洗 3 次, 双蒸水冲洗至无醇味, 紫外光下照射, 晾干, 消毒剪成碎片, 备用。

2.2 羊角类和牛角类样品角质层 DNA 的提取方法

2.2.1 取样量的考察 称取刀片刮取的羚羊角细薄片 (样品 1) 25、40、55、70 mg, 加入 DTT 100 μL、Proteinase K 20 μL 及裂解缓冲液 GA 200 μL 后, 56 °C 金属浴酶解 3 h 后, 按试剂盒提取步骤提取 DNA, Nano Drop 2000 测定 DNA 的质量浓度及纯度, 主要以 A_{260}/A_{280} 的比值考察提取 DNA 的质量, 纯 DNA 的 $A_{260}/A_{280} \approx 1.8$, $A_{260}/A_{280} < 1.8$, 提示有蛋白质或苯酚污染, 会抑制后续的 PCR 反应; $A_{260}/A_{280} > 1.8$, 说明样品中含有 RNA, 一定程度上不会影响后续 PCR 反应。结果见表 2。

表 2 取样量考察

Table 2 Survey of sampling

取样量/mg	DNA 质量浓度/(ng·μL ⁻¹)	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}
25	17.6	2.14	0.05
40	23.2	1.68	0.04
55	25.8	1.42	0.04
70	27.4	1.35	0.04

由表 2 知, 取样量增大时, 提取浓度增大, A_{260}/A_{280} 值较低, 提示有蛋白质污染, 进一步 PCR 扩增也显示, 蛋白污染的样品扩增出的条带较暗, 取样量为 25 mg 时, 提取的 DNA 纯度较高, 确定取样量为 25 mg。

2.2.2 DTT 加入量的考察 称取刀片刮取的羚羊角细薄片 (样品 1) 25 mg 5 份, 分别加入 20、40、60、80、100 μL 的 DTT, 加入 40 μL 的 Proteinase K 及裂解缓冲液 GA 400 μL 后, 56 °C 金属浴酶解, 考察样品在 10 h 内的酶解情况。结果见表 3。为减少 DTT 用量, 避免浪费, 确定 DTT 加入量为 20 μL, 可使样品在 4 h 内完全裂解。

表 3 DTT 加入量考察

Table 3 Survey of amount of adding DTT	
DTT 加入量/ μL	4 h 裂解情况
20	4 h 内裂解透彻
40	3 h 内酶解透彻
60	2 h 内酶解透彻
80	1.5 h 内酶解透彻
100	0.5 h 内酶解透彻

2.2.3 所有样品的 DNA 提取 将上述优选的 DNA 提取方法, 取样量 25 mg, DTT 用量 20 μL , 用于所收集的编号为 1~10 的样品 DNA 提取。提取的 DNA 浓度及纯度结果见表 4。

表 4 1~10 号样品 DNA 提取结果

Table 4 DNA extraction results of ten samples			
编号	DNA 质量浓度/($\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$)	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}
1	17.6	1.73	0.06
2	22.6	3.48	0.06
3	16.2	4.72	0.05
4	15.8	4.38	0.05
5	19.8	1.79	0.05
6	10.5	2.36	0.06
7	14.5	2.13	0.05
8	16.0	4.90	0.05
9	19.5	2.26	0.06
10	15.1	5.45	0.04

2.3 PCR 扩增

2.3.1 所有角类样品的 PCR 扩增 上述所有提取的 DNA 样本 (样品编号 1~10), 用于 PCR 扩增, 扩增引物为 CO1 基因的通用引物^[5], 正向引物 LCO1490: 5'-ggTCAACAAATCATAAAgATATTgg-3', 反向引物 HCO2198: 5'-TAAACTTCaggTgACCA-AAAAATCA-3', 25 μL 反应体系, 模板用量为 150~180 ng, 达不到 150~180 ng, 模板取样定为 10 μL ; 正向、反向引物各 1 μL (浓度为 10 mmol/L); 2 $\times$ EasyTag SuperMix 12.5 μL ; 双蒸水补足至 25 μL 。PCR 扩增程序参考文献方法^[1]: 94 $^{\circ}\text{C}$ 、1 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 、1 min, 45 $^{\circ}\text{C}$ 、1.5 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 、1.5 min, 5 个循环; 94 $^{\circ}\text{C}$ 、1 min, 50 $^{\circ}\text{C}$ 、1.5 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 、1 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 、5 min。用含有 GoldView I 型核酸染色剂的 1.5% 琼脂糖凝胶点样, DL 2 000 DNA Marker 为对照, 样品 5 μL 与 2 μL 6 $\times$ Loading Buffer 混合均匀点样, TBE 缓冲液中电泳, 凝胶成像仪成像。割取 750 bp 处的 DNA 条带, 胶回收纯化 PCR 产物, 上海桑尼生物公司测序。上述提取样品的 PCR 结果见图 1 (点样顺序对应样品编号)。

2.3.2 低浓度样品的二次扩增 针对图 1 中点样序号为 6、7 的样品 (对应样品编号为 6、7) 存在浓度低, 无法完成测序。为解决这一问题, 在紫外灯下割取 750 bp 处的条带, 切成碎块, 100 μL 双蒸水溶解, 60 $^{\circ}\text{C}$ 温育, 取适量, 进行 2 次扩增。模板用量分别为 2、5、10 μL ; 正、反向引物各 1 μL (浓度为 10 mmol/L); 2 $\times$ EasyTag SuperMix 12.5 μL ; 双蒸水补足至 25 μL 。扩增程序为 95 $^{\circ}\text{C}$ 、1 min, 40 $^{\circ}\text{C}$ 、1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 、1.5 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 、1.5 min, 35 个循环, 72 $^{\circ}\text{C}$ 、保存 7 min。1.5% 琼脂糖点样, TBE 缓冲液电泳, 凝胶成像仪成像, 结果见图 2。由图 2 可知, 二次扩增时模板取样量 5 μL 时, 效果最好, 可用于测序; 10 μL 模板抑制了 PCR 反应; 2 μL 模板条带亮度适中。割取 750 bp 处的 DNA 条带, 胶回收纯化 PCR 产物, 上海桑尼生物公司测序。

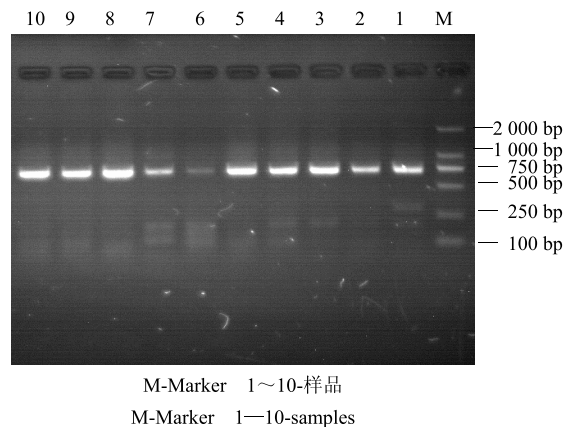


图 1 所有样品的 PCR 图

Fig. 1 PCR figure of all samples

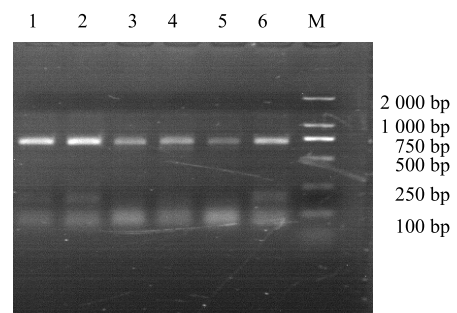


图 2 低浓度样品 2 次扩增图

Fig. 2 Secondary amplification of low concentration sample

2.4 通用方法与 DTT 结合通用方法的比较

采用保存 10 年以上陈旧羊角样品,分别按通用试剂盒处理方法与 DTT 结合通用方法处理,通用试剂盒处理方法参照试剂盒步骤,DTT 结合通用方法在样品裂解步骤中另加 DTT,其余步骤按试剂盒操作,2 种提取方法见表 5。

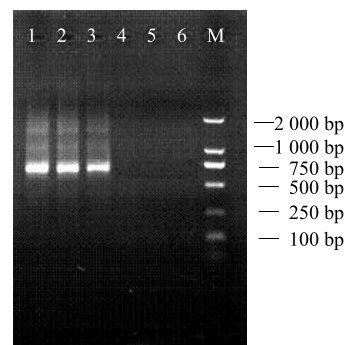
表 5 通用方法与 DTT 结合通用方法提取 DNA 的浓度结果
Table 5 DNA extraction results of general method and DTT combined general method

样品	存放时间/年	通用方法	DTT 通用方法
		DNA 质量浓度/(ng μ L ⁻¹)	DNA 质量浓度/(ng μ L ⁻¹)
羚羊角(个子)	15	3.5	18.3
羚羊角片	13	2.7	20.2
藏羚羊角(个子)	12	5.4	23.5

由表 5 得知,通用方法对放置 10 年以上的样品,提出的 DNA 模板质量浓度低,DTT 结合通用方法可明显提高 DNA 质量浓度,进一步取 10 μ L 模板,用 25 μ L 反应体系,扩增方法同“2.3.1”,2 种方法的 PCR 凝胶成像结果见图 3,由图 3 表明,通用试剂盒方法在 750 bp 处的扩增条带为阴性,而 DTT 结合通用方法扩增出的 DNA 条带明显。

2.5 序列的比对结果

以上所有样品均测序 CO1 的基因序列,将序列与 NCBI 数据库上的序列比对,可得出具体物种信息,比对结果见表 6,从表 6 可知,收集的样品除



1~3-DTT 结合通用方法 4~6-常规试剂盒方法
1-羚羊角个子 15 年 2-羚羊角块 13 年 3-藏羚羊角个子 12 年 4-羚羊角个子 15 年 5-羚羊角片 13 年 6-藏羚羊角个子 12 年 M-Marker
1—3-DTT combined general method 4—6-conventional Kit method
1-The whole horn of *Saiga tatarica* for 15 years 2-Part of horn of *Saiga tatarica* for 13 years 3-The whole horn of *Pantholops hodgsonii* for 12 years 4-The whole horn of *Saiga tatarica* for 15 years 5-Part of horn of *Saiga tatarica* for 13 years 6-The whole horn of *Pantholops hodgsonii* for 12 years M-Marker

图 3 2 种方法处理陈旧样品的 PCR 图

Fig. 3 PCR figure of obsolete samples

表 6 样品序列比对结果

Table 6 Results of samples sequence alignment

样品编号	样品名称	鉴定结果	拉丁学名
1	羚羊角(个子)	赛加羚羊角	<i>Saiga tatarica</i>
2	羚羊角(丝)	赛加羚羊角丝	<i>Saiga tatarica</i>
3	羚羊角(块)	赛加羚羊角块	<i>Saiga tatarica</i>
4	藏羚羊角(个子)	藏羚羊角	<i>Pantholops hodgsonii</i>
5	黄羊角(个子)	普氏原羚角	<i>Procapra gutturosa</i>
6	山羊角(个子)	山羊角	<i>Capra hircus</i>
7	绵羊角(个子)	绵羊角	<i>Ovis aries</i>
8	牦牛角(个子)	牦牛角	<i>Bos grunniens</i>
9	黄牛角(个子)	牦牛角	<i>Bos grunniens</i>
10	水牛角(个子)	水牛角	<i>Bubalus bubalis</i>

黄牛角比对结果为牦牛角外(可能依据性状鉴定会出现差错),其余样品与比对结果一致,说明收集样品的物种信息是正确的,确定了传统方法不能鉴定的羚羊角丝与羚羊角块。

3 讨论

本研究从角蛋白的化学特性考虑,角蛋白含有较多的半胱氨酸,二硫键的量特别多,其在蛋白质

肽链中起交联作用,因此角蛋白化学性质特别稳定,有较高的机械强度,它们不易粉碎、不易溶解和消化,常用的动物细胞裂解液无法裂解,预实验时采用通试剂盒方法提取 DNA,取少量角质层样品,在加入 Proteinase K 及动物组织裂解缓冲液 GA 后 56 $^{\circ}$ C 过夜酶解,样品几乎无变化,而另外加入 DTT 时,样品裂解情况有较大改善,在 25 mg 的取样量

下,可在 3~4 h 后裂解透明,是影响 DNA 提取完全的关键因素。DTT 是一种强还原剂,可阻止蛋白质中的半胱氨酸之间所形成的蛋白质分子内或分子间二硫键。本实验取角质层部位研究动物角的 DNA 提取,不仅证明动物角的角质层含有 DNA,而且可保证最大程度提取,无需设计巢式 PCR 引物提高 DNA 模板,无需加大取样量,无需进口痕量 DNA 提取试剂盒,可满足陈旧的动物角类样品,避免取骨塞部位(牛角类和羊角类样品含有骨塞)时,用 EDTA 脱钙预处理,因脱钙次数和时间不好掌握,造成 DNA 的提取不完全或 DNA 被破坏。取材上近乎无损取样,无需液氮研磨,仅需用电锯依据需要将个子样品切片取样,继用刀片刮取细薄片,避免用钢锉锉粉或电动研磨器磨粉难以完成坚硬样品的取样。对于低质量浓度模板的样本,可减少溶解 DNA 的溶剂用量,提高初始浓度,或切胶纯化,进行二次扩增,最终完成所有样品的 DNA 提取,满足 PCR 及测序要求,依据序列

比对确定具体物种,可防止黄羊角、山羊角、绵羊角冒充羚羊角,防止牦牛角冒充水牛角,是中药鉴定技术的另一有效手段。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] Heber P D N, Cywinska A, Ball L, *et al.* Biological identifications through DNA barcodes [J]. *Proc R Soc Lond B*, 2003, 270(1512): 313-321.
- [3] Heber P D N, Ratnasingham S, Dewaard J R. Barcoding animal life: Cytochrome c oxidase subunit I divergences among closely related species. [J]. *Proc Roy Biol Sci*, 2003, 270: 96-99.
- [4] 张龙霏, 陈绍民, 田景振, 等. 利用 DNA 条形码检验中药制剂中的羚羊角药材 [J]. *中草药*, 2014, 45(23): 3467-3471.
- [5] Folmer O, Black M, Hoeh W, *et al.* DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome C oxidase subunit I from diverse meta-zoan invertebrates [J]. *Mol Mar Biol Biotechnol*, 1994, 3(5): 294-299.