

从高温高压蒸煮过的中华鳖甲和骨骼中提取及扩增 DNA

南京师范大学遗传资源研究所(210097) 刘中权* 王义权** 周开亚

摘要 为验证经高温加工过的鳖甲是否可以用 DNA 分子标记鉴定,选取经高温高压蒸煮过的中华鳖甲和骨进行 DNA 提取,并用通用引物 L1091 和 H1478 扩增。结果表明经高温高压蒸煮过的鳖甲也可以提得较高质量的 DNA,与从肌肉和药材鳖甲中提取的 DNA 比较没有明显差异,并可用作模板进行 PCR 扩增,得到约 400 bp 基因片段;同时还讨论了 DNA 提取和扩增过程中应注意的问题,为分子遗传标记技术广泛应用于同类药材的鉴定积累了基础资料。

关键词 中华鳖甲和骨骼 DNA 提取 PCR 扩增

Extraction and Amplification of DNA from Autoclaved Chinese Soft-Shell Turtle (*Trionyx sinensis*) Shell and Bone

Institute of Genetic Resources, Nanjing Normal University (Nanjing 210097) Liu Zhongquan, Wang Yiquan and Zhou Kaiya

Abstract In order to ascertain whether autoclaved *Trionyx sinensis* Wiegmann could be authenticated by DNA molecular technology, DNA from boiled, steamed, and autoclaved shells and bones of the turtle were extracted and the template DNA amplified by universal primers L-1091 and H-1478. The results showed that there were no differences between the DNA obtained from the autoclaved material in comparison with those obtained from the boiled, steamed or traditionally processed crude drug. A 400 bp DNA fragment was amplified successfully from both boiled bone and muscles of crude drug under standard PCR conditions using the universal primers. The issue of DNA extraction and amplification were also discussed.

Key words Chinese soft-shelled turtle (*Trionyx sinensis* Wiegmann) shell and bone DNA extraction PCR amplification

中华鳖 *Trionyx sinensis* Wiegmann 鳖甲是常用中药材。王亚明等从保存 10 年的药材龟甲和鳖甲中提得 DNA,并用扩增线粒体 DNA Cyt b 基因片段的通用引物进行 PCR 扩增^[1],但未说明药材鳖甲是否经高温蒸煮过。而实际收购的药材中,有许多鳖甲经过高温蒸煮。对于这些鳖甲能否用于提取 DNA,所提得的 DNA 结构是否被破坏,最终能否用于 PCR 扩增,也就是说 DNA 分子标记鉴定是否适用于经高温蒸煮过的鳖甲?对于其它经高温蒸煮加工过的药材,如用 DNA 分子标记鉴定也存在着类似问题。为此本文选取高温高压蒸煮过的中华鳖甲和骨骼进行实验研究。

1 材料和方法

1.1 实验材料:经砂锅用水煮过的中华鳖甲 2 块和骨骼 2 件;蒸过的中华鳖甲 5 块(分别蒸 0.5, 1, 2 h),高压灭菌锅蒸过(126.8 °C, 0.148 MPa)的鳖甲

2 块(分别蒸 0.5, 1 h),洗净烘干备用。-20 °C 保存的原动物标本 1 只,药材鳖甲 1 只,用于对照。

1.2 试剂:蛋白酶 K, dNTPs, *Taq* 聚合酶为 Promega 公司产品, SDS 为 Serva 产品, DNA 为 Marker 和引物为 Takara 公司合成产品,其它试剂均为国产分析纯。

1.3 DNA 的提取:取原动物肌肉约 0.1 g 于 1.5 mL 离心管中,加入裂解液(Tris-HCl 0.01 mol/L pH 8.0, EDTA 0.01 mol/L, NaCl 0.01 mol/L)0.4 mL,另加入 SDS 和蛋白酶 K 至终浓度分别为 1% 和 0.8 μg/mL,55 °C 水浴保温 8 h,然后用等体积饱和酚、等体积酚-氯仿、氯仿、氯仿-异戊醇(24:1)各抽提 1 次,乙醇沉淀 DNA,室温下干燥,加 TE 缓冲液 100 μL 溶解 DNA 沉淀。鳖甲的 DNA 抽取过程除饱和酚抽提 2 次外,余同文献^[1]。

1.4 PCR 扩增:所用引物为 L1091(5'-AAAAAG

* Address: Liu Zhongquan, Institute of Genetic Resources, Nanjing Normal University, Nanjing.
刘中权 硕士,讲师,研究方向为动物分子生物学,现从事中药材分子鉴定研究,在《药学报》等刊物上发表论文 10 余篇。
** 联系人, Tel: (025) 3729111-3328, Fax: (025) 3738174, E-mail: yqw@pine.njnu.edu.cn
国家自然科学基金(No. 39870913)、江苏省教委科学基金(98KJB360010)和江苏省“333 工程”人才培养基金资助

CTTCAAACCTGGGATTAGATACCCCACTAT-3'}, H1478(5'-TGACTGCAGAGGGTGACGGGC GGTGTGT-3'), L、H 分别为轻链和重链, 数字与人 mtDNA 序列对应。该引物用于扩增第三区和部分第二区的约 400 bp 的线粒体 12S rRNA 基因片段。PCR 扩增总体积为 30 μ L 反应液中含 10 mmol/L Tris-HCl, pH 8.3, 50 mmol/L KCl, 1.5 mmol/L MgCl₂, 0.1% Triton X-100, *Taq* 酶 1.5 U, 4 种 dNTP 各 150 μ mol/L, 两个引物各 10 pmol/L, DNA 模板约 100 ng。

反应在 PE2400 或 PTC200 型 PC 仪上进行。循环参数为 95 预变性 4 min, 然后进行 95 变性 40 s, 55 复性 40 s, 72 延伸 60 s 共 30 个循环, 最后 7 min 延伸补齐。

1.5 DNA 的检测: 取 DNA 的提取液或扩增产物 5 μ L 在 1.0% 加入 EB 的琼脂糖凝胶上电泳, 在 UVP-Whiter/Ultraviolet Transilluminator 上紫外扫描检测, 并自动成相。

2 结果和讨论

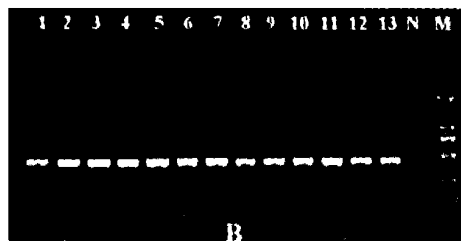
从高温高压蒸煮过的鳖甲或骨骼中可以提取到 DNA。从图 1 可见, 煮过的鳖甲(3, 4 号)和骨骼(5, 6 号)、电饭煲蒸过的鳖甲(7~11 号)与冰冻肌肉(1 号)和药材鳖甲(2 号)所提的 DNA 相比较, 没有明显差异, 大多数在 1 000 bp 以上。高压锅蒸过的鳖甲(12, 13), DNA 片段略有降解, 大多在 2 000 bp 以下。从经电饭煲和高压锅蒸时间长短不同(0.5, 1, 2 h)的鳖甲中, 得到 DNA 没有明显的区别。空白对照中没有 DNA, 说明提取过程无 DNA 污染。



1-肌肉 2-药材鳖甲 3, 4-煮过的鳖甲 5, 6-煮过的骨骼 7 和 8, 9 和 10, 11-分别用电饭煲蒸 0.5, 1, 2 h 12, 13-分别用高压灭菌锅蒸 0.5, 1 h N-阴性对照 M-Marker, DL2000

图 1 从鳖甲和骨骼中提得的 DNA 琼脂糖凝胶电泳图

用上述提得的 DNA 模板进行 PCR 扩增, 所有鳖甲和骨骼样品均能扩增出约 400 bp 的 DNA 片段, 而空白对照无扩增产物, 可见提取过程和 PCR 扩增过程中都无外源 DNA 的污染。图 2 为 PCR 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳图谱。



(样品编号同图 1)

图 2 PCR 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳图谱

中药材 DNA 分子标记鉴定, 一般要求药材 DNA 提取和扩增过程中必须严防外源 DNA 的污染。本实验用去污剂洗涤和紫外线照射样品, 彻底去除样品表面外源 DNA, 所有实验过程都在超净台上进行。捣碎鳖甲的铜臼每用一次, 用洗涤剂和超纯水清洗后, 倒入酒精烧烤灭菌, 以确保实验的准确性。在 DNA 提取和扩增过程中均设立了空白对照。

鳖甲和骨骼中含有大量的 Ca²⁺ 和其它矿物离子, DNA 提取时, 它们的存在不利于裂解液的消化作用, 在随后的 PCR 反应中也有抑制作用, 因此必须将 Ca²⁺ 去除。一般肌肉或血液的 DNA 提取裂解液中 EDTA 浓度为 10 mmol/L, 本研究中除裂解液中的 EDTA 的浓度提高为 100 mmol/L 外, 还在裂解液消化之前, 用 0.5 mol/L EDTA 脱钙 72 h, 并在中间换两次新鲜 EDTA 溶液, 达到去除 Ca²⁺ 的目的。然后再用蛋白酶 K 和 SDS 消解已软化的鳖甲或骨骼粉末, 用苯酚氯仿抽提, 一次抽提往往不够彻底, 可以采取两次或多次抽提的办法解决, 以提高模板 DNA 的纯度, 便于随后的扩增。

王亚明等从药材龟板和鳖甲中提取的 DNA 模板, 用常规方法进行 PCR 扩增时, 得不到 DNA 扩增产物, 再次用苯酚氯仿抽提、乙醇沉淀、透析模板 DNA, 甚至用 DNA 纯化试剂盒纯化模板 DNA 后, 也未能扩增出目的 DNA 片段, 认为 DNA 提取液中含有某种抑制 PCR 反应的抑制剂, 通过加入 BSA (小牛血清白蛋白) 和过量的 *Taq* 酶, 便可得到目的 DNA 片段, 有无 BSA 并不影响扩增结果。可见 DNA 提取中杂质去除的是否彻底是影响 PCR 反应的关键。此外 PCR 反应中加入 DNA 模板量的多少对扩增也有一定影响, 特别是从动物的甲和骨骼中所提的 DNA, 模板量过多复性时会与引物竞争, 从而大大地抑制引物结合到 DNA 链上, 同时也增加了其它抑制因素; 模板量过少, 减少了引物与 DNA 链结合的机会, 也影响扩增反应的结果。因此在初次扩增时可选择不同浓度梯度的模板量, 从中选择最

适的浓度。

近年来,分子遗传标记技术逐渐应用于中药材的鉴定^[2~8]。这一技术的应用,首先必须能够从药材中抽提出 DNA。在中药材加工过程中,许多药材经过高温蒸煮、炮制、煎制等过程,能否从这些药材中提得 DNA,是分子遗传标记技术能否广泛用于中药材真伪鉴定的关键。研究表明,经高温高压蒸煮过的鳖甲或骨骼中仍含有大量的 DNA,用一般的 DNA 提取方法,即能从少量的鳖甲样品中提得足够的 DNA,用扩增线粒体 12S rRNA 基因片段,通过用引物进行 PCR 扩增,能获得稳定的阳性产物。从而给我们一个重要的启示,即经过高温、高压蒸煮过

的中药材也可以获得用于 PCR 扩增的微量 DNA,本实验的结果为分子遗传标记技术广泛应用于中药材的真伪鉴定提供了基础资料。

参考文献

- 1 王亚明,等.药学报,1996,31(6):472
- 2 吴平,等.药学报,1998,33(4):304
- 3 王义权,等.药学报,1997,32(5):384
- 4 Hashimoto A, *et al.* Natural Medicines, 1998, 52(1):38
- 5 Fushimi H, *et al.* Phytomedicine, 1996, 3: 387
- 6 吴平,等.中国药科大学学报,1998,29(1):28
- 7 王建云,等.中国药科大学学报,1996,27(8):471
- 8 王义权,等.药学报,1998,33(12):941

(1999-04-02 收稿)

HPLC 法测定汉丹肝乐胶囊中芍药苷的含量

贵阳制药厂(550004)

冯艳明* 叶丽梅

贵阳医学院

杨继红

摘要 采用 HPLC 法测定汉丹肝乐胶囊中芍药苷的含量。色谱柱 C₁₈柱,流动相甲醇-水(28:72),检测波长 230 nm,流速 1 mL/min,柱温室温,灵敏度 0.04 AUFS。结果芍药苷在 0.049~0.868 μ g 范围线性良好, $r=0.9999$,平均回收率为 99.3% ($n=5$), $RS D=2.09\%$ 。

关键词 汉丹肝乐胶囊 芍药苷 HPLC 法

汉丹肝乐胶囊系由汉防己、丹参、赤芍、黄芪、银杏叶等 5 味中药制成的复方制剂,具有活血化瘀、舒肝理气的功能,用于治疗各种病因所致的肝纤维化及肝硬化。为了更好地控制质量,我们采用 HPLC 法对君药之一的赤芍主要成分芍药苷进行含量测定。经方法学考察,认为本法简便、准确、无干扰,可用于本品质量控制。

1 仪器、试剂与药品

IC-9A 高效液相色谱仪(日本岛津),SPD-6AV 检测器,C-R6A 积分仪;GQ 250 超声波清洗器(上海超声仪器厂);751 紫外分光光度计(日本岛津)。

芍药苷对照品(中国药品生物制品检定所 0736-9608, HPLC 归一化法测得含量为 97.06%);汉丹肝乐胶囊及其缺赤芍空白样品(自制);试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件: YWG-C₁₈柱(4.6 mm $\times$ 250 mm, 粒

径 10 μ m), 流动相甲醇-水(28:72), 检测波长 230 nm, 柱温室温, 流速 1 mL/min, 灵敏度 0.04 AUFS, 进样量 10 μ L。此条件下, 样品中芍药苷与其他组分峰达到基线分离, 理论塔板数按芍药苷峰计算为 4 619, 芍药苷保留时间为 14.44 min, 空白试验表明无干扰。

2.2 实验条件选择: ①检测波长: 据文献值^[1], 并对芍药苷的 50% 乙醇溶液进行紫外波长扫描, 结果表明芍药苷在 230 nm 处呈最大吸收, 以此为检测波长, 经 HPLC 试验, 图谱分离效果好。②流动相: 据文献值^[2,3], 大都采用甲醇-水系统, 我们采用不同比例的甲醇-水进行试验, 结果表明选用甲醇-水(28:72)为流动相, 分离效果好。③提取溶剂与方法: 曾采用水和 50% 乙醇为溶剂, 分别以浸润后提取与直接提取、回流法与超声波振动法进行对比试验, 结果差异不明显, 以 50% 乙醇超声波振荡提取法较为简便, 效果好。④提取时间: 将供试品用 50% 乙醇进行

* Address: Feng Yanming, Guiyang Pharmaceutical Factory, Guiyang

冯艳明 女, 工程师。1982 年毕业于华西医科大学化学制药专业, 学士学位。从事制药工程工艺设计、生产技术管理及天然药物开发研制。曾在《中国中药杂志》、《中成药》等杂志上刊登论文数篇。

贵州省“九·五”攻关项目, 黔科合计字(1996)1028 号