

- [3] Williams J G K, Kubelik A R, Livak K L *et al.* DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers[J]. *Nucleic Acid Research*, 1990, 18 (22): 6531-6535.
- [4] Sobral B W S, Honeycutt R J. High output genetic mapping of polyploids using PCR-generated markers [J]. *Theor Appl Genet*, 1993, 86 105-112.
- [5] Chalmers K J, Waugh R, Sprent J I, *et al.* Detection of genetic variation between and within populations of *Gliricidia sepium*, and *G. maculata* using RAPD markers [J]. *Heredity*, 1992, 69 465-472.
- [6] Dawson I K, Chalmer K J, Waugh R, *et al.*, Detection and analysis of genetic variation in *Hordeum spontaneum* populations from Israel using RAPD markers [J]. *Mol Ecol*, 1993, 2 151-159.
- [7] Virk P S, Ford-Iloyd B V. Use of RAPD for the study of diversity within plantgermplasm collection [J]. *Heredity*, 1995, 74 170-179.
- [8] Wei J Z, Campbell W F, Wang R R C. Genetic variability in Russian wildrye (*Psathyrostachys juncea*) assessed by RAPD [J]. *Genet Resources Crop Evol*, 1997, 44 117-125.
- [9] Chen H, Zhu L H, Xu J C, *et al.* Construction of rice RAPD molecular linkage map [J]. *Acta Bot Sin*, 1995, 37 667-684.
- [10] Zhou Y H, Yang J L, Zheng Y L, *et al.* RAPD study on interspecies relationships in *Roegneria* [J]. *Acta Bot Sin*, 1999, 41 1076-1081.

植物药材总 DNA 提取

李晓波^{1,2}, 冯波², 张朝晖³, 王峥涛², 徐璐珊^{2*}

(1. 上海交通大学药学院, 上海 200030; 2. 中国药科大学中药学院, 江苏 南京 210038; 3. 第二军医大学南京军医学院, 江苏 南京 210099)

摘要:目的 为获得高质量的 DNA, 研究木质部较发达的根、根茎类以及茎木类药材的 DNA 提取方法。方法 总 DNA 的提取过程包括用 Tris 缓冲液洗净, CTAB 抽提和纯化。结果 对升麻、苏木、木香、乌药、芍药和木通等进行了 DNA 提取, 能较好的去除色素、多糖等干扰 PCR 物质。结论 本法使用常用试剂, 成本低, 易于推广, 为药材 DNA 分子鉴别的应用奠定了基础。

关键词: DNA 提取; 中药材; 升麻

中图分类号: R282. 710. 3 文献标识码: A 文章编号: 0253- 2670(2002)07- 0652- 03

Isolation of total DNA from Plant Chinese medicinal materials

LI Xiao-bo^{1,2}, FENG Bo², ZHANG Zhao-hui³, WANG Zheng-tao², XU Luo-shan²

(1. School of Pharmacy, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200030, China; 2. College of Chinese Materia Medica, China Pharmaceutical University, Nanjing 210038, China; 3. Nanjing Military Medical College, Second Military Medical University, Nanjing 210099, China)

Abstract Object To explore the method for high-quality DNA extract from plant Chinese medicinal materials containing developed xylem. **Methods** The process of DNA includes wash with Tris-buffer, extract with CYAB-buffer and purification mainly. **Results** Using this method, the total DNA was isolated from *Cimicifugae foelida* L., *Arlia chinensis* L., *Paeoniae lactiflora* Pall., *Aucklandia lappa* Decne., *Lindera aggregata* (Sm) Kostern., and *Akebia quinata* Decne. etc. This method is preferable in removing pigments, polysaccharides, substance disturbing PCR. **Conclusion** In this process, common reagents are used, lower cost is of advantage to popularize. This study provides the applying foundations for the DNA identification of plant Chinese medicinal materials.

Key words DNA extract; plant Chinese medicinal materials; *Cimicifugae foelida* L.

DNA 分子鉴别的第一步就是要获得高质量的可作为 PCR 模板的 DNA。药材不同于新鲜的动植物材料, 药材的干燥、加工、贮藏等过程均造成了

DNA 不同程度的降解; 同时药材中的蛋白质、多糖以及多酚类化合物等都是影响 PCR 成败的因素。因此, 针对不同药材采用不同的 DNA 提取方法才

* 收稿日期: 2001-11-06

基金项目: 中国博士后科学基金 (1998年)

作者简介: 李晓波 (1963-), 女, 回族, 博士, 1991-1998年赴日留学攻读学位, 主要从事生药学、分子生物学研究。Tel (021) 62933467
E-mail: xlb@mail.sjtu.edu.cn

是科学、合理的。

升麻 *Cimicifuga foetida* L. 为根茎类药材,但不同于薄壁细胞较丰富的人参、黄精等药材,其木质部较发达,另外在升麻中多酚类物质又极其丰富,按常规的植物 DNA 提取方法^[1]所获得的 DNA 溶液呈褐色,无法进行 PCR。为获得高质量的药材 DNA,结合升麻药材的特点探讨了木质部发达的根及根茎类药材的总 DNA 提取方法。

1 材料和方法

1.1 实验材料:供试升麻样品分别购自浙江、山东、河南、江苏省,详细来源见表 1,保存于中国药科大学中药标本馆。木 *Arlia chinensis* L.、木香 *Aucklandia lappa* Decne.、乌药 *Lindera aggregata* (Slms) Kostern.、芍药 *Paeoniae lactiflora* Pall.、木通 *Akebia quinata* Decne. 为第二军医大学南京军区医学院标本馆馆藏标本。样品用 70% 乙醇擦洗表面,或轻轻刮去表面的污染物后,切成小碎块备用。

表 1 升麻实验材料的来源

编号	来源(省份)	时间
J1	南京市百信药房(江苏)	2000-09
J2	南京市健康中药店(江苏)	2000-09
ZH	海宁市药材公司(浙江)	2000-04
ZD	东阳市中药房(浙江)	2000-04
SW	潍坊医药公司(山东)	2000-04
HZ	郑州医药公司医药大厦(河南)	2000-04

1.2 试剂: 100 mmol/L Tris-HCl, 7.5 mol/L NH₄OAc, 20% PV P (polyvinylpyrrolidone), 100 mmol/L NaOAc (pH 6.0), 3 mol/L NaOAc, 5 mol/L NaCl

1.3 药材总 DNA 的提取:全提取过程主要由洗净、抽提和纯化 3 部分组成。

洗净:称取药材 100 mg,用液氮研磨成细粉后,放入 2 mL 离心管中,加入 1 mL 100 mmol/L Tris-HCl 缓冲液混匀,室温静置 10 min, 12 000 r/min 离心 5 min,弃上清,重复 1~2 次。

抽提:在洗净处理过的样品中加入 1/2 倍体积(约 500 μL)的 CTAB 提取液(2% CTAB, 50 mmol/L Tris-HCl) (pH 8.0), 20 mmol/L EDTA (pH 8.0), 1.4 mol/L NaCl,充分混合,56℃ 温育 40~60 min 加入 20% PV P 使终浓度达到 6%,再加入 1/10 倍体积的 7.5 mol/L NH₄OAc 并于 -20℃ 放置 30 min 后,12 000 r/min 离心 5 min 取上清,加入等体积的苯酚-氯仿-异丙醇(25:24:1)颠倒混匀,4 000 r/min 离心 15 min 后,再用 12 000 r/min 离心 10 min 在离心所得上

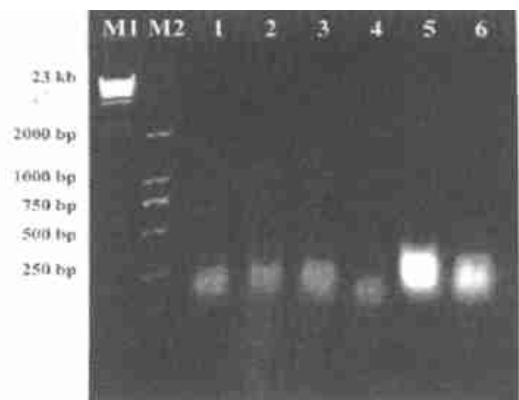
清中加等体积的异丙醇,-20℃ 培养 1~2 h, 12 000 r/min 离心 10 min

纯化:用 400 μL 100 mmol/L (pH 6.0) NaOAc 溶解沉淀,缓缓加入 1/10 体积的无水乙醇,12 000 r/min 离心 10 min 上清再加入 2.5 倍体积的无水乙醇沉淀 DNA 沉淀用 450 μL TE 缓冲液 A (pH 8.0, 10 mmol/L Tris-HCl, 0.1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L NaCl) 溶解后,再加入 1/10 体积的 10% CTAB 1/10 体积的 5 mol NaCl 1/3 体积的 CHCl₃ 混合抽提,轻轻颠倒混匀 5 min 后 12 000 r/min 离心 5 min 加入 1/10 体积 3 mol/L NaOAc 和 2.5 倍体积 100% EtOH 沉淀 DNA, 20~30 μL 的 TE 缓冲液 B (pH 8.0, 10 mmol/L Tris-HCl, 0.1 mmol/L EDTA) 或 ddH₂O 溶解备用。

1.4 DNA 的检测:取 DNA 溶液 5~10 μL 点样于 1% 的加入 EB 琼脂糖凝胶上电泳,紫外观察并拍照。

2 结果和讨论

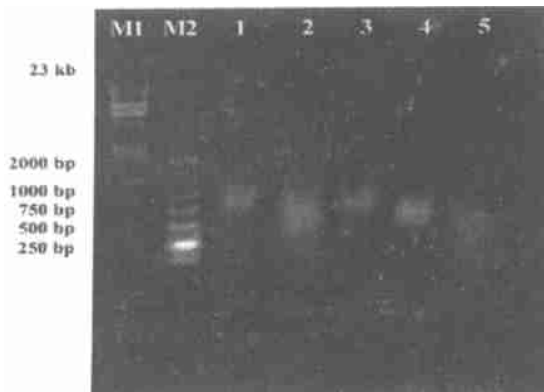
采用上述方法提取升麻药材样品的总 DNA,结果见图 1 此外对药材性状上质地较硬、组织解剖学上为木质部所占横断面的比例较大的根类药材、茎木类药材应用上述提取方法进行了 DNA 提取实验,实验药材分别为木、木香、乌药、芍药和木通,提取结果见图 2



1~6 分别为样品 ZD、ZH、J1、J2、HZ 和 SW; M1 和 M2 分别为 λ-HindIII digest 和 DL 2000

图 1 从 6 个升麻样品中提取的总 DNA 的电泳结果

植物中的多酚类化合物和多糖对于 DNA 质量的影响,是植物分子生物学研究中最常遇到、必须解决的问题,许多学者对于不同的植物作过研究报道^[2~4]。中药材的特性又使得这一问题更为突出,即从药材中提取高质量的 DNA 并非易事。本提取方



1~6分别为木、木香、乌药、芍药和木通的总DNA; M1和M2分别为 λ -HindIII digest和DL 2000

图2 从生药中提取的总DNA的电泳结果

法能较好的除去色素、多糖等干扰PCR的物质,获得DNA可直接用于PCR扩增(升麻的DNA分子鉴定另行发表)

首先,本法采用100 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0)进行前洗净操作。该操作可在DNA溶出前去掉水溶性和部分脂溶性色素以及部分多糖,比在DNA溶出后进行分离去除效果更佳

一般对于新鲜的植物材料采用加入 β -巯基乙醇防止多酚类物质的氧化(褐变),但由于对于药材中的多酚类物质已被氧化,因此参照Couth^[5]的方法,采用加入6% PV P及7.5 mmol/L NH₄OAc分离已被氧化的多酚类,获得DNA溶液的颜色明显变浅。

获得的DNA溶液常常粘度大乃至呈胶状,是植物DNA提取中最常见的现象,其原因是DNA沉淀过程中多糖也同时被沉淀下来。植物DNA的提取不同于动物细胞,如何更能有效的去除植物中特有的多糖,是获得高质量植物DNA的关键。

CTAB即可裂解细胞,又能有效的沉淀多糖,是最常采用的植物DNA提取方法。但对于多糖极为丰富的材料,单靠CTAB还不能获得高质量的DNA。本研究通过以下两步操作,可明显去除多糖:1) DNA沉淀用100 mmol/L NaOAc溶解后,利用在低浓度乙醇中多糖可被沉淀而DNA保留在溶液中的原理,分离出多糖;2)采用1/10倍体积10% CTAB 1/10倍体积的5 mol NaCl 1/3倍体积的CHCl₃抽提。

Mizukami^[6]曾报道了从生药中提取DNA的方法,在对提取液进行一次氯仿抽提后,使用DNA纯化试剂盒获得总DNA。Fu^[7]等报道采用两步离心法可获得长片段的DNA,从文章的电泳图可见DNA片段达20 kb以上,从生药中获得如此长片段的DNA,可能是值得进一步验证的。

此外,本方法所用的试剂均为常用、低价格,为药材DNA分子鉴定法的应用奠定了基础。

参考文献:

- [1] Clark M S. 植物分子生物学——实验手册[M]. 北京:高等教育出版社,施普林格出版社,1998.
- [2] 罗志勇,周钢,陈湘辉,等. 高质量植物基因组DNA的分离[J]. 湖南医科大学学报,2001,26:178-180.
- [3] Green M J, Thompson D A, Mackenzie D J. Easy and efficient DNA extraction from woody plants for the detection of phyto-plasmas by polymerase chain reaction [J]. Plant Disease, 1999, 83:482-485.
- [4] Kim C S, Lee C H, Shin J S, et al. A simple and rapid method for isolation of high quality genomic DNA from fruit trees and conifers using PV P[J]. Nucleic Acids Res, 1997, 25:1085-1086.
- [5] Couchu J A, Fritz P J. Isolation of DNA from plants high in polyphenolics [J]. Plant Mol Biol Rep, 1990, 8:8-12.
- [6] Mizukami H, Okabe Y. A simple and rapid protocol for preparation of crude drug DNA suitable for PCR [J]. Biol Pharm Bull, 1999, 22:765-766.
- [7] Fu R Z, Wang J, Sun Y R, et al. Extraction of Genomic DNA suitable for PCR analysis from dried plant rhizomes/roots [J]. Biotechniques, 1999, 25:797-801.

八角属药用植物资源

林 祁*

(中国科学院植物研究所,北京 100093)

摘要:目的 报道世界性八角属药用植物资源状况。方法 根据对18个国家121个标本馆收藏的10 000余份

* 收稿日期:2002-01-21

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39370056);中国科学院知识创新工程资助项目(KSCX2-I-06B);中国科学院生物分类区系学科发展特别支持项目部分内容

作者简介:林 祁(1957-),男,湖南长沙人,博士,研究员,从事植物分类学研究。Tel (010) 62591431-6476 Fax: (010) 62590296
E-mail: lingq@ns. ibcas. ac. cn