

氢钾、乙腈-1%磷酸、乙腈-0.02 mol/L 磷酸二氢钾作为流动相进行试验,结果表明以乙腈-0.02 mol/L 磷酸二氢钾线性梯度洗脱为最佳,谱图上各色谱峰(230 nm)分离度较好,保留时间适中,峰形好。因此选此洗脱系统作为痛安注射液的 HPLC 指纹图谱检测的流动相。

3.2 检测波长的选择:按照前述色谱条件,精密吸取供试品溶液进样,得 200~400 nm 波长 DAD 扫描图谱,结果在 230 nm 测定的信息量多,特征最为明显,图谱中的各指纹峰信号强,分离效果较好。因此选用该波长作为检测波长。

3.3 色谱柱的选择:选用大连依利特 Hypersil ODS2 色谱柱(250 mm ×4.6 mm, 5 μm)、兰州化物所 ODS 色谱柱(250 mm ×4.6 mm, 5 μm)、Dikma 公司 Diamonsil C₁₈ 柱(250 mm ×4.6 mm, 5 μm)进行试验筛选,比较分离度和柱效,结果 Dikma 公司 Diamonsil C₁₈ 较为合适。

本实验采用 HPLC 法所建立的痛安注射液指纹图谱可以在一个色谱条件下,同时实现整体定性、多指标成分定量的功能,为复方中药的质量控制及稳定性评价提供了新的方法模式。

改良 SDS 法快速提取赤芍干叶片 DNA 的研究

徐芳^{1,2},王丽萍³,陈波^{1*},姚守拙¹

(1. 湖南师范大学 化学生物学及中药分析省部共建教育部重点实验室,湖南 长沙 410081; 2. 长沙医学院,湖南 长沙 410219; 3. 湖南省分析测试中心,湖南 长沙 410007)

摘要:目的 从富含多糖和小分子杂质的赤芍干叶片中快速分离出适用于各生物技术分析的高质量基因组 DNA,为赤芍的鉴定研究提供实验基础。方法 以常规的 SDS 法为基础,进一步优化 DNA 提取各步骤,获得了一种快速可行的提取高质量赤芍干叶片 DNA 的方法。结果 使用该方法从 4 个不同产地的赤芍干叶片中分离的 DNA A₂₆₀/A₂₈₀ 分别为 1.90、1.88、1.91、1.93,所需时间均小于 2.5 h,所得 DNA 分别直接用于 PCR 分析,结果满意。结论 该方法用于提取赤芍干叶片 DNA 快速可行,可有效地从富含多糖和小分子杂质的组织中分离出高质量 DNA,方法简便、快速,成本低。

关键词:赤芍;DNA 提取;改良 SDS 法;PCR

中图分类号:R284.2

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2009)04-0571-03

中药现代化生产的基本要求是中药材来源纯正、地道,快速、准确地鉴别中药原植物及药材是中药生产标准化的关键。随着分子生物学技术运用于中药材鉴定研究的发展,DNA 分子标记技术已成为中药材鉴定中极其重要的鉴定方法之一^[1,2]。袁菊红等^[3]采用 RAPD 分析法分别对不同采集地的 37 份石蒜属植物的基因组 DNA 的遗传多样性进行检测;张杰等^[4]对半夏栽培品遗传差异进行 AFLP 分析;陈大霞等^[5]对黄连药材 DNA 进行提取并对 RAPD 反应体系的优化。高质量植物组织 DNA 的提取是整个鉴定实验成功的基本保证。植物 DNA 的提取研究中,多采用新鲜或冷冻的材料,但对于野外,特别是远距离采样时受条件限制,植物材料只能以干燥方式保存,其 DNA 提取方法虽然与新鲜材

料相近,但提取的条件差别较大,因此本实验寻找一种从干燥植物药材中快速提取完整、高质量 DNA 的方法具有重要意义。

赤芍为毛茛科植物芍药 *Paeonia lactiflora* Pall. 的干燥根,具有清热凉血,活血散瘀的功能,还具有镇静、镇痛、解痉、抗炎等作用^[6]。赤芍为野生,但不同产地野生赤芍的成分存在很大差异,因此有必要对赤芍野生资源品种进行分类、鉴定和良种选择。本实验通过对 DNA 提取各步骤的优化,获得了一种快速的赤芍干叶片完整、高质量 DNA 的提取方法,并应用于 4 个产地赤芍 DNA 的比较,为毛茛科植物 DNA 分子标记技术研究提供参考。

1 材料

赤芍干叶片分别采自内蒙古自治区额尔古纳

* 收稿日期:2008-06-11

基金项目:国家 973 课题(2006CB504701)

作者简介:徐芳(1981—),女,湖南常宁人,硕士研究生,研究方向:现代色谱分离分析。E-mail: xufang6789@163.com

*通讯作者 陈波 Tel:(0731)8865515 E-mail: dr-chenpo@vip.sina.com

县、黑龙江省呼玛县、吉林省延吉县、山西省汾阳县,由湖南师范大学生命科学院刘林翰教授鉴定为毛茛科植物赤芍 *P. lactiflora* Pall.,经硅胶干燥后,室温下保存 2~3 个月,洗净凉干直接用于提取 DNA。

SDS、PVP、 β -巯基乙醇、Tris 购自长沙市天恒科技有限公司;5 U/ μ L Taq DNA 聚合酶、5 mmol/L $MgCl_2$ 、10 $\times$ PCR Buffer、10 mmol/L dNTP 购自上海生工生物工程公司;DGL 2000 DNA Marker、DL 2000 PCR Marker、溴化乙锭(EB)购自宝泰克生物科技有限公司;琼脂糖(agrose)购自 Gene 公司;其他试剂均为分析纯。

Hybrid 基因扩增仪(英国 Hybrid 公司),Gradient Cycler PTC-200 基因扩增仪(美国 M.J. Research 公司),DYY—型电泳仪、电泳槽(北京六一仪器厂)。

2 方法与结果

2.1 DNA 提取方法:以常规 SDS 法为基础,经优化各提取步骤,得到改良 SDS 法。(1)在 50 mL 离心管中,加入 15 mL 提取缓冲液(100 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0; 50 mmol/L EDTA pH 8.0; 500 mmol/L NaCl; 2% 巯基乙醇)和 1 mL 0.15% mg/mL SDS,混匀,于 65 $^{\circ}C$ 预热。(2)称取去除中脉的赤芍干叶片 1 g,加入 0.35 g PVP 干粉,置液氮中迅速研磨成粉状。(3)将冻粉迅速转入上述离心管中,混匀,65 $^{\circ}C$ 保温 25 min,其间摇动 2 次。(4)4

条件下,10 000 r/min 离心 3 min 后,将上部溶液倒入另一离心管,向离心管中加入 5 mol/L 乙酸钾 5 mL,混匀,置冰浴中 20 min。(5)4 $^{\circ}C$ 条件下,10 000 r/min 离心 5 min,上清液转入另一离心管中,加入 5 mL 氯仿-异戊醇,轻轻颠倒离心管,混匀,静置 10 min 分层。(6)取上清液重复加入 5 mL 氯仿-异戊醇,轻轻颠倒离心管,混匀,静置 10 min 分层。(7)取上清液,加入 2/3 上清液体积的预冷异丙醇,轻轻颠倒离心管,混匀,静置 5 min 至出现絮状物。(8)迅速用干净玻棒轻轻挑出沉淀,用 75%乙醇洗沉淀物 3 次后,用氮气吹干。(9)溶于适量的 TE 缓冲液中,4 $^{\circ}C$ 贮存备用。

2.2 DNA 的鉴定方法

2.2.1 紫外检测:将所提取 DNA 分别稀释 100 倍,测定 230、260、280 nm 处的吸光度(A 值)。根据 A_{260}/A_{280} 和 A_{260}/A_{230} 分别判断 DNA 的纯度。每个样品测定 3 次,取其平均值。

2.2.2 电泳检测:分别取 2 μ L DNA 于 0.8%的琼脂糖凝胶中,4 V/cm 稳压电泳 2~2.5 h 后,EB 染

色 40 min,用水冲净后,用凝胶成像系统保存图像,分别判别 DNA 分子的大小和纯度。

2.2.3 PCR 扩增:25 μ L 反应体系组成为 2.5 μ L 10 $\times$ PCR Buffer,10 mmol/L dNTP 0.5 μ L,引物组合(CSF: 5' CGCCCCA GGT TTT TTT TCTTCAAG 3'; CSR: 5' TGCTGAAA TAA GAAA GGCCAAT-GA 3') (50 ng/ μ L) 1 μ L, 25 mmol/L $MgCl_2$ 1.5 μ L, Taq DNA 聚合酶 1 单位,基因组 DNA 模板 1 μ L (10~100 ng),加去离子水至 25 μ L。上述反应体系置于 Express Gradient PCR 仪上执行如下反应程序:94 $^{\circ}C$ 预变性 3 min;94 $^{\circ}C$ 变性 30 s;57 $^{\circ}C$ 退火 30 s;72 $^{\circ}C$ 延伸 30 s,35 个循环;72 $^{\circ}C$ 后延伸 5 min;10 $^{\circ}C$ 保存产物。产物用 1%琼脂糖凝胶电泳检测,EB 染色后照相。

2.3 结果与分析

2.3.1 不同产地的赤芍干叶片 DNA 提取结果比较:见表 1 和图 1。用本法所提取的 DNA,不论是哪个产地的材料,DNA 颜色、 A_{260}/A_{280} 和 A_{260}/A_{230} 值都达到了要求(A_{260}/A_{280} 值为 1.75~1.95, A_{260}/A_{230} 值应大于 2.0^[7]),说明所提取的 DNA 杂质去除较干净,且提取所需时间短(<2.5 h),比其他方法快速。电泳结果显示:4 个产地的赤芍干叶片提取的 DNA,条带都较清晰,几乎没有降解,说明该方法提取的 DNA 完整、无杂质污染。

表 1 不同产地的赤芍干叶片 DNA 提取比较结果

Table 1 Comparison of DNA extracted from dry leaves of *Radix Paeoniae Rubra* in four different habitats

编号	来源地	DNA 颜色	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}	所需时间/h
1	内蒙古额尔古纳县	浅黄色	1.90	2.14	<2.5
2	黑龙江呼玛县	浅黄色	1.88	2.07	<2.5
3	吉林延吉县	浅黄色	1.91	2.22	<2.5
4	山西汾阳县	浅黄色	1.93	2.19	<2.5

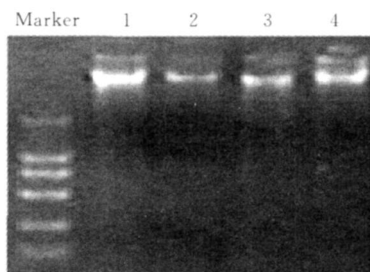


图 1 4 个产地赤芍干叶片提取的总 DNA 电泳结果

Fig. 1 Electrophoretogram of total DNA extracted from dry leaves of *Radix Paeoniae Rubra* in four different habitats

2.3.2 不同产地赤芍干叶片提取 DNA 的 PCR 扩增结果:见图 2。可见不同产地赤芍干叶片用本研

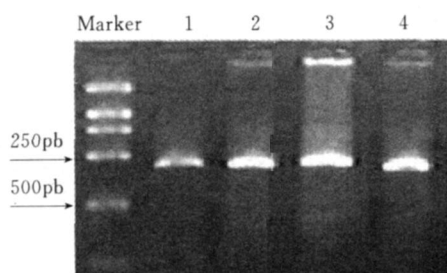


图2 4个产地赤芍干叶片提取DNA的PCR扩增电泳谱图

Fig. 2 Electrophoretogram of DNA extracted from dry leaves of *Radix Paeoniae Rubra* in four different habitats by PCR amplification

究方法提取的DNA做PCR扩增时,结果都较清晰,稳定效果好,说明该方法提取的DNA能用于PCR等生物技术,适用于毛茛科植物的遗传多样性分析。

3 讨论

高质量DNA的快速提取是决定分子生物学实验成败的关键因素。由于不同植物所含化学成分差异较大,因此对不同植物DNA提取应采取不同的方法。有时受条件限制,植物材料只能以干燥方式保存,其提取方法又应不同。由于要对不同产地的赤芍作比较,赤芍叶片只能以干燥方式保存,且因其含较多多糖、蛋白质和小分子杂质,常规方法不能很好地将杂质去除干净,影响后续的分子生物学实验结果。因此本研究在常规SDS法基础上,优化各提取步骤,获得了一种快速提取赤芍干叶片DNA的方法。用该方法所提取的DNA完全能够达到分子生物学实验要求,应用于PCR分析,结果满意。说明如果受野外采集条件限制,用硅胶干燥叶片保存后带回实验室再提取也不失为一种补充手段,但硅胶干燥叶片不宜久存,否则DNA得率会降低。本

方法的一大特点就是快速,因为提取时间越长,DNA越易受环境污染,快速有利于提高纯度。结果表明:该方法可快速地从富含多糖、蛋白质和小分子杂质的毛茛科药用植物干叶片中分离出高质量的DNA。

使用此方法时应注意:PVP以固体形式加入最好,PVP与样品在液氮环境中共研要迅速和充分,磨碎后要尽快加入预热的提取缓冲液,以防止氧化;高浓度SDS可去除多糖,改良方法中提高了SDS浓度,多糖去除较干净;离心速度不宜太快,时间和次数也要尽量减少,以保证DNA的完整性;沉淀DNA不采用离心,而采用玻棒直接挑出也有利于提高DNA纯度;沉淀时间也要尽量缩短以防小分子盐共沉淀和DNA颜色变深而影响提取结果;用乙醇反复沉淀3次减少了RNA的污染;纯化后的DNA用氮气吹干以减少乙醇污染。

参考文献:

- [1] Stelions S, Sean T M. Authentication of coffee by means of PCR-RFLP analysis and Lab-on-a-chip capillary electrophoresis [J]. *J Agric Food Chem*, 2006, 54: 7466-7470.
- [2] Barbara A S, Kimberly A O. Genetic fingerprinting of grape plant (*Vitis vinifera*) using random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis and dynamic size-sieving capillary electrophoresis [J]. *J Agric Food Chem*, 2000, 48: 5903-5912.
- [3] 袁菊红,孙 视,彭 峰,等.石蒜属植物遗传多样性的ISSR和RAPD标记比较研究[J]. *中草药*, 2007, 38(10): 1555-1561.
- [4] 张 杰,徐 涛,张建光,等.半夏栽培品遗传差异的AFLP分析[J]. *中草药*, 2007, 38(12): 1884-1889.
- [5] 陈大霞,李隆云,钱 敏,等.黄连药材DNA提取及RAPD反应体系的优化[J]. *中草药*, 2006, 37(8): 1233-1237.
- [6] 中国药典[S].一部. 2005.
- [7] 邵鹏著,曹 晖.中药分子鉴定[M].上海:复旦大学出版社, 2004.

吴茱萸多糖的分离和组成研究

徐继华^{1,2},刘文英^{1*},屠旦来¹

(1.中国药科大学 药物分析教研室,江苏 南京 210009; 2.江苏省南通市药品检验所,江苏 南通 226006)

摘 要:目的 对吴茱萸中多糖进行提取、分离和纯化,进一步研究吴茱萸多糖主要组分的单糖组成。方法 采用水提醇沉法提取粗多糖, H₂O₂ 脱色、Sevag 法除蛋白、透析制备精制品,用DEAE-32纤维素阴离子交换柱、Sephacryl S-400 SF型凝胶柱分离纯化多糖,经酸水解后,1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮(PMP)柱前衍生化HPLC法分析单糖组成。结果 从吴茱萸中分离纯化得两个主要多糖组分 ERPS2a、ERPS3,二者的单糖组成均为甘露糖、鼠

* 收稿日期:2008-07-04

作者简介:徐继华(1978—),男,江苏南通人,硕士研究生。Tel: 13912274510 E-mail: xujihua45@hotmail.com

* 通讯作者 刘文英 Tel: (025) 83271251 E-mail: lwcpu@126.com