

中成药 DNA 提取技术优化及其在人参类制剂分子鉴定中的应用

程春松^{1,2}, 谭天琪¹, 龙泽¹, 刘智祖¹, 吴文如³, 王英平⁴, 刘良^{1,2}, 周华^{1,2*}

1. 澳门科技大学中医药学院, 澳门特别行政区 氹仔

2. 中药质量研究国家重点实验室(澳门科技大学), 澳门特别行政区 氹仔

3. 广州中医药大学中药学院, 广东 广州 510000

4. 中国农业科学院特产研究所, 吉林 长春 132109

摘要: **目的** 建立并完善从中成药及保健品中提取 DNA 的有效方法, 并在人参类制剂中进行验证。**方法** 使用中成药和保健品中常用的辅料(如淀粉、蔗糖、葡萄糖等)模拟 CTAB 法提取 DNA 过程, 用以筛选影响提取 DNA 效率的因素; 使用甲醇作为沉淀试剂优化传统的 CTAB 法, 并使用 MAS-PCR 方法对市场上人参类中成药及保健品进行分子鉴定, 以验证优化的技术。**结果** 中成药及保健品中的淀粉(包括药源性淀粉和辅料添加的淀粉)通过 CTAB 反应后生成极性较大的复合物, 其与 70%乙醇不能互溶, 而且在碱性条件下对 DNA 有强烈的溶解作用, 从而影响了 CTAB 法提取 DNA 的提取效率; 利用甲醇作为沉淀试剂能够有效去除 CTAB 裂解过程中产生的高极性复合物的影响, 70%甲醇-醋酸钠溶液能够有效提取中成药及保健品的 DNA; 利用优化的 DNA 提取方法和 MAS-PCR 法实现了 11 种市售人参类制剂的快速分子鉴定, 结果显示 8 种与商品描述一致、1 种有掺伪情况、2 种为伪品。**结论** 使用甲醇作为沉淀试剂优化传统的 CTAB 法, 可以较好地克服中药制剂中淀粉对 DNA 提取的不利影响, 可以有效地实现基于 DNA 的中药制剂分子鉴定。

关键词: 中成药; DNA; 分子鉴定; 人参类制剂; CTAB 法; 淀粉; 蔗糖; 葡萄糖

中图分类号: R284.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2015)17-2549-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.17.008

Optimization of DNA extraction for Chinese patent medicine and its application on molecular identification of ginseng preparations by MAS-PCR

CHENG Chun-song^{1,2}, TAN Tian-qi¹, LONG Ze¹, LIU Zhi-zu¹, WU Wen-ru³, WANG Ying-ping⁴, LIU Liang^{1,2}, ZHOU Hua^{1,2}

1. Faculty of Chinese Medicine, Macau University of Science and Technology, Taipa, Macau Special Administrative Region, China

2. State Key Laboratory of Quality Research in Chinese Medicine, Macau University of Science and Technology, Taipa, Macau Special Administrative Region, China

3. College of Chinese Medicines, Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510000, China

4. Institute of Special Wild Economic Animal and Plant, Chinese Academy of Agriculture Science, Changchun 132109, China

Abstract: **Objective** To establish an optimized method for extracting DNA from Chinese patent medicine (CPM) and health-care products and assuring the quality of DNA for successful molecular identification in ginseng preparations. **Methods** Commonly-used pharmaceutical excipients, such as starch, sucrose, and glucose in CPM and health-care products were employed to discover the potential cause of low quality of DNA extraction in classic CTAB method. Methanol was used to precipitate and purify the DNA extracted with the classic CTAB method in order to improve the quality and quantity of DNA thus extracted. Finally, thus extracted DNA was employed to conduct the molecular identification of CPM and health-care products with ginseng herbs and validate the optimized method. **Results** Starch in CPM and health-care products may react with CTAB and thus form a high polar complex that is insoluble in 70% ethanol but can strongly dissolve DNA, resulting a very low DNA extraction rate in classic CTAB method. Methanol is able to dissolve the high polar complex and thus the application of 70% methanol and NaAc solution guaranteed the successful

收稿日期: 2015-05-22

项目基金: 澳门科学技术发展基金 (071/2011/A3)

作者简介: 程春松, 博士研究生, 从事中药鉴定与中药质量控制研究。Tel: (+853)88972772 13360602718 E-mail: cscheng@must.edu.mo

*通信作者 周华, 教授, 从事中药质量研究。Tel: (+853)88972458 Fax: (+853)28825886 E-mail: hzhou@must.edu.mo

extraction of DNA with high quality and quantity from CPM and health-care products. With the optimized CTAB method, the DNA samples of 11 kinds of CPM and health-care products containing ginseng or American ginseng were extracted and applied for molecular identification with MAS-PCR method. The results showed that the identified herb complied with the label description in eight samples, but did not in three samples, in which one would be adulteration and two would be counterfeits. **Conclusion** Application of 70% methanol as a purification and precipitation reagent in classic CTAB method effectively overcome the negative influence of starch contained in Chinese herbal preparations to DNA extraction and can make the DNA molecular identification of Chinese herbal preparations successful.

Keywords: Chinese patent medicine; DNA; molecular identification; ginseng preparations; starch; sucrose; glucose

中成药及其保健品（以下简称成药制剂）都是以中药材为原料，按照规定的处方、生产工艺和质量标准生产的制剂^[1-2]。其加工过程中主要添加的辅料有淀粉、蜂蜜、葡萄糖、蔗糖等^[3]。由于深加工的原因，DNA 大多数已经分解^[4]，但是部分片段尚存在，因此可以对其药材基原进行分子鉴定。

中药材分子鉴定技术已经成为了中药鉴定研究的新方向^[5-6]，由于成药制剂在制剂过程中基原药物的化学成分发生了改变，形态学特征多数也已经丢失，难以成为鉴定依据，所以基于 DNA 的分子鉴定技术对于成药制剂的鉴别有着独特的优势。目前已经有部分报道显示成药制剂分子鉴别具有一定的可行性^[7-8]，但是相对于中药材的分子鉴定，成药制剂的分子鉴定研究报道还是太少，高质足量的 DNA 获取困难是其重要原因。成药制剂主要分为 2 大类，一类为有原粉末入药的散剂、丸剂、搽剂等，另一类是药材经过深加工入药的颗粒剂、片剂、液体制剂等。由于制剂时通常会添加大量糖，因此 DNA 的提取经常选择 CTAB 法^[9]。少量第 1 类成药制剂因为含有大量的淀粉或多糖在一定程度上给 DNA 的提取造成困难，第 2 类成药制剂 DNA 尤其难以获得。在使用传统 CTAB（Hexadecyltrimethyl ammonium Bromide）法提取人参类成药制剂 DNA 进行分子鉴定时，发现第 2 类成药制剂的 DNA 提取尤其困难，无法获得预期结果。进一步研究发现造成这种困难的原因不仅仅与深加工制剂工艺有关，更与添加的辅料有关。故本实验以人参类成药制剂为例，探索了影响传统 CTAB 法提取成药制剂 DNA 效率的可能原因，并提出优化了的技术方案。随后利用这个优化的方法和已经成熟的基于 ETS 基因 SNP 分子标记，采用 MAS-PCR 技术鉴定了市售的 11 种人参类制剂的真伪及掺伪情况。

1 仪器与材料

Pro-Flex PCR 仪，美国 Life-technologies 公司；50×TAE 电泳液，美国 Bio-Rad Laboratories 公司；

Agarose G-10，香港 Gene 公司；SYBR[®] Safe DNA Gel Stain，美国 Invitrogen 公司；冷冻离心机及移液枪，德国 Eppendorf 公司；微量分光光度计，美国 Life-technologies 公司；凝胶成像系统，美国 Bio-Rad 公司；化学及荧光分析仪，Molecular Devices 公司。所用试剂均为分析纯。

5 年生人参嫩叶（大马牙，由中国农业科学院特产研究所赠送，经中国农业科学院特产研究所王英平研究员鉴定为五加科人参属植物人参 *Panax ginseng* C. A. Mey.）用于提取标准 DNA；人参类成药制剂购买于广州市场或互联网商家，均标注为正规厂家生产，样品保存于中药质量研究国家重点实验室（澳门科技大学），样品的制剂信息见表 1。

表 1 实验用人参类成药制剂情况
Table 1 Ginseng preparations for test

编号	名称	制剂类型	实验室留样编号	类别
1	人参蜜丸 1	全粉末入药	2014101101	蜜丸
2	人参蜜丸 2	全粉末入药	2014101102	蜜丸
3	人参蜜丸 3	全粉末入药	2014101103	蜜丸
4	西洋参茶 1	提取后加辅料	2014101104	颗粒剂
5	西洋参茶 2	提取后加辅料	2014101105	颗粒剂
6	红参茶 1	全粉末入药	2014101106	颗粒剂
7	白参茶 1	全粉末入药	2014101107	颗粒剂
8	红参茶 2	提取后加辅料	2014101108	颗粒剂
9	西洋参片 1	提取后加辅料	2014101109	片剂
10	红参饮品	提取后加辅料	2014101110	粉剂
11	西洋参茶 3	提取后加辅料	2014101111	片剂

2 方法与结果

2.1 标准 DNA 的提取

采用传统的 CTAB 法提取 DNA，取人参嫩叶少许，液氮研磨，随后置于 2 mL EP 管中，加入 65℃预热的 2×CTAB 提取缓冲液 800 μL 以及巯基乙醇 16 μL，置于 65℃水浴裂解 2 h，期间常震荡，随后加等体积氯仿-异戊醇（24：1）颠倒混匀 5 min，

12 000 r/min 离心 15 min; 取上清液加等体积 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预冷的异丙醇, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 沉淀 2 h, 12 000 r/min 离心 15 min; 取沉淀用无菌水 600 μL 溶解, 随后加入乙醇 1 200 μL 及 3 mol/L 醋酸钠溶液 60 μL , 混匀, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 沉淀 1 h, 12 000 r/min 离心 15 min, 重复此过程 2~3 次; 沉淀置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 烘箱温育 1 h, 直至乙醇挥发干; 加无菌水 200 μL 溶解, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷冻备用。

2.2 人参类成药制剂的分子鉴定方法

使用 Wang 等^[10]建立的 MAS-PCR 方法, 基于 SNP 方法针对人参 ETS 基因设计特征性引物 ETSR (5-TTTGCAAGTCGTGTGAGTTG-3); AgF (5-GTGTTGGCATAGTGACGTTA-3); PgF (5-AGAGCAGTAAGCCTTGAAAAT-3)。使用 50 μL 体系, DNA 模板 10 ng、引物各 0.5 μL 、以及 10 μL 2 $\times$ Premix DNA polymerase, 补水至 50 μL ; $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 4 min, 然后 $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 解链 30 s、 $63\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s、 $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s 进行 35 次循环, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存, 通过 10% 琼脂糖凝胶检测。

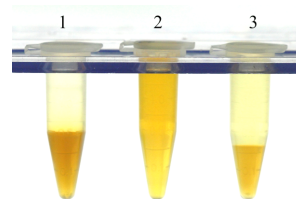
2.3 CTAB 法提取不同成药制剂 DNA 的差异

成药制剂如前所述主要分 2 大类, 第 1 类为药材全粉末入药, 第 2 类为深加工者。全粉末入药的剂型, 如大蜜丸等通常和中药材一样可以较容易提取 DNA, 第 2 类则很难提取获得理想的 DNA。一般来说, 研究人员大多数将第 2 类的原因归结为 DNA 在制剂过程中的降解。但是, 本课题组发现在使用 CTAB 法提取第 2 类制剂时, 会产生极性较大的物质, 其与异丙醇、70% 乙醇不能互溶, 且密度大于异丙醇和乙醇, 如图 1 所示, 在提取第 2 类成药制剂时, 2 $\times$ CTAB 抽提物加等体积异丙醇出现的溶液分层现象 (图 1 第 1 管); 在提取第 1 类成药制剂时, 则不出现分层现象 (图 1 第 2 管); 在提取第 2 类成药制剂出现分层现象后, 将下层收集并加乙醇至 70% (含 10% 3 mol/L 醋酸钠) 后, 依然出现分层现象, 不能沉淀 DNA (图 1 第 3 管)。出现此种现象的样品按照传统的 CTAB 法只能获得微量 DNA, 且 DNA 质量很差, 难以适应分子鉴定的要求, 用于 PCR 也不能成功扩增出目标 DNA 片断。

使用微量分光光度计检测上述 2 类制剂的吸光度 (A) 值, 计算 DNA 的量, 结果见表 2 (试验类别 A)。

2.4 中成药中的成分对 DNA 提取的影响

由图 1 可知 DNA 提取困难的主要原因是出现了与异丙醇和乙醇不相溶的未知物, 其能溶解 DNA,



1-提取第 2 类成药制剂时 2 $\times$ CTAB 抽提物加等体积异丙醇出现的溶液分层现象 2-提取第 1 类成药制剂时, 则不出现分层现象 3-在提取第 2 类成药制剂出现分层现象后, 将下层收集并加乙醇至 70% 依然出现分层现象

1-stratification appeared when an equal volume of ethanol were mixed with extraction of 2 $\times$ CTAB in the extract process of the second category patent medicine 2-no stratification appeared when an equal volume of ethanol were mixed with extraction of 2 $\times$ CTAB in the extract process of the first category patent medicine 3-stratification appeared again when mixed with ethanol to 70% in the lower solution in process of the second category patent medicine

图 1 传统 CTAB 法提取不同类型成药制剂 DNA 的差异
Fig. 1 Difference of DNA extracted by classic CTAB method in different types of CPM preparation

从而阻碍了 DNA 沉淀。由此可见, 优化传统 CTAB 法提取成药制剂 DNA 的目标在于了解该物质的性质, 并设计物理或者化学方法消除该物质所造成的影响。本实验考察了中成药中常用的辅料以及赋型剂对标准 DNA (50 μL) 提取的影响, 分别将人参粗提液、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、乳糖、5% 淀粉溶液、淀粉标准 DNA 混合后再按“2.1”项方法 (至第 1 次异丙醇沉淀为止) 进行提取, 以模拟 CTAB 法提取 DNA 中的裂解和异丙醇萃取过程, 所得结果分别在自然光和紫外光下拍照 (图 2), 并使用微量分光光度计检测 A 值, 计算 DNA 的量, 结果见表 2 (试验类别 A)。

含 DNA 的样品与 CTAB 在 $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ 反应 2 h 后, 加入等体积异丙醇, 正常情况下溶液互溶, DNA 则成絮状沉淀。而由图 2 可知, 第 7 管出现了与第 2 类成药制剂提取 DNA 时类似的分层现象, 即提取液与异丙醇不能互溶, 推测可能是淀粉与 CTAB 发生了反应, 会影响 DNA 沉淀过程。同样, 使用 70% 乙醇沉淀继续处理此分层时, 仍然会出现分层, 不能沉淀 DNA (图 1 第 3 管)。由此判断在 CTAB 裂解过程中, 产生了一种物质, 极性较大, 介于水和乙醇之间, 且不能与乙醇和异丙醇互溶。

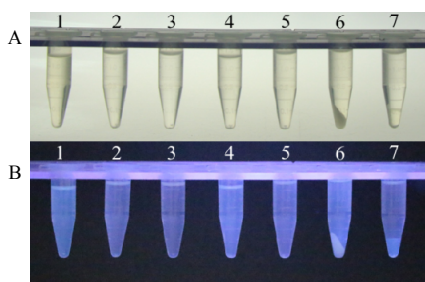
为了分析这种物质, 采用傅里叶变换红外光谱 (FTIR) 对淀粉 (1) 和淀粉与 CTAB 反应物 (2) 进行比较分析 (图 3), 发现与 CTAB 反应后淀粉原有的两处红外吸收峰有发生变化, 即 $1\ 084\text{ cm}^{-1}$ 处

表2 不同DNA提取试验微量分光光度计检测值 ($n=3\sim6$)Table 2 Micro spectrophotometer test values of different DNA extraction ($n=3\sim6$)

试验类别	试验内容	DNA/(ng·μL ⁻¹)
A	1. 传统CTAB法提取第1类成药制剂	39.8±3.0
	2. 传统CTAB法提取第2类成药制剂	4.1±2.2**
	3. 传统CTAB法重提2法下层溶液	2.2±0.4**
B	1. 传统CTAB法提取人参提取物	14.4±0.7
	2. 传统CTAB法提取标准DNA+葡萄糖	6.7±1.1
	3. 传统CTAB法提取标准DNA+蔗糖	8.8±1.9
	4. 传统CTAB法提取标准DNA+麦芽糖	8.4±0.1
	5. 传统CTAB法提取标准DNA+乳糖	7.4±0.1
	6. 传统CTAB法提取标准DNA+淀粉溶液	10.5±0.4
	7. 传统CTAB法提取标准DNA+淀粉	3.4±0.2**
C	1. 异丙醇沉淀之前使用甲醇沉淀1次	10.2±0.1
	2. 异丙醇沉淀之前使用乙醇沉淀1次	1.7±0.1**
	3. 不使用甲醇或乙醇	1.0±0.2**

A-成药制剂的种类对传统CTAB法提取DNA的影响实验; B-成药制剂所含的常用不同辅料对传统CTAB法提取DNA的影响实验; C-使用甲醇、乙醇处理对成药制剂(西洋参茶2)用CTAB法提取DNA的影响实验。 ** $P<0.01$ (t -test) 与同实验的第1组比较具有显著差异

A-influence of types of CPM on DNA extraction with classic CTAB method; B-influence of various commonly-used excipients of CPM on DNA extraction with classic CTAB method; C-influence of methanol in ethanol precipitation processes on DNA extraction of CPM with CTAB method. ** $P<0.01$ (t -test), significant difference compared with the 1st group in respective experiments



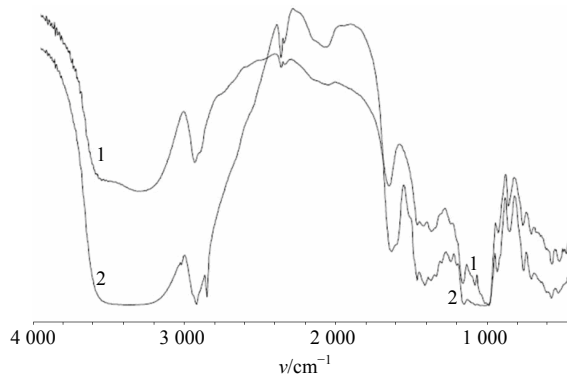
1~7 分别是人参粗提液、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、乳糖、淀粉溶液、淀粉单独与 2% CTAB 在 65 °C 反应 2 h 后加等体积异丙醇结果。图片分别在自然光 (A) 和紫外光 (B) 下拍照所得

Tubes 1~7 showed the results when ginseng extract, glucose, sucrose, maltose, lactose, starch solution, and starch, respectively, mixed with 2% CTAB at 65 °C for 2 h and then precipitate by equal volume of isopropanol. The photos were taken under sunlight (A) and UV light (B)

图2 不同辅料对传统CTAB法提取标准DNA的影响

Fig. 2 Effect of different excipients on extraction of standard DNA by classic CTAB method

的 C-O-C 伸缩振动消失, 2851 cm⁻¹ 处的 -CH₂ 反对称伸缩振动加强。另外, 本实验发现, 淀粉与 CTAB 在常温及 65 °C 下均可以发生反应 (不再与碘液不发生颜色反应, 图 4 第 2~4 管), 但是常温反应并不会产生分层现象 (图 4 第 3' 和 4' 管), 只有通过加热后才能形成高极性的淀粉-CTAB 复合物并引起分层 (图 4 第 2' 管)。由于 CTAB 为含有大量 -CH₂-



1-淀粉傅里叶变换红外光谱图 2-淀粉与CTAB反应物的傅里叶变换红外光谱图

1-FTIR spectrum of starch 2-comparison on FTIR spectrum of starch and CTAB

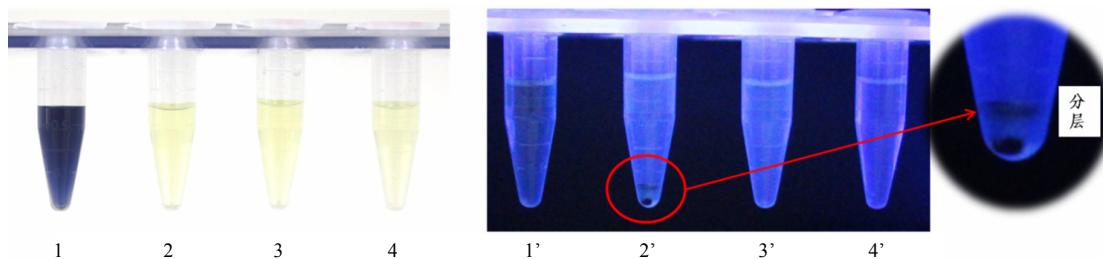
图3 淀粉及淀粉-CTAB反应物的FTIR图谱比较

Fig. 3 Comparison on FTIR charts of starch and starch-CTAB reacted products

而无-C-O-C-的季铵盐类物质, 由此推测该条件下淀粉 α-1,4 苷键在碱性条件下水解, 并与 CTAB 生成了极性较大的复合物, 由于 CTAB 带正电荷, 所以极易与带负电荷的 DNA 互溶, 从而阻止 DNA 沉淀。

2.5 甲醇、乙醇沉淀DNA效率比较

分别取制备好的标准DNA样品50 μL于2 mL EP管中, 加入无菌水600 μL、3 mol/L 醋酸钠溶液



1-淀粉在 65 ℃ 加热 2 h 后稀碘液显色 2-淀粉与 CTAB 在 65 ℃ 反应 2 h 后稀碘液显色 3-淀粉与 CTAB 在常温反应 2 h 后稀碘液显色 4-淀粉 65 ℃ 加热 2 h 冷却后与 CTAB 在常温反应 2 h 后稀碘液显色 1'-淀粉在 65 ℃ 加热 2 h 后用异丙醇沉淀 2'-淀粉与 CTAB 在 65 ℃ 反应 2 h 后用异丙醇沉淀 3'-淀粉与 CTAB 在常温反应 2 h 后用异丙醇沉淀 4'-淀粉 65 ℃ 加热 2 h 冷却后与 CTAB 在常温反应 2 h 后用异丙醇沉淀
1-starch heated for 2 h at 65 ℃ and colorized with I₂ solution 2-starch reacted for 2 h at 65 ℃ with CTAB and colorized with I₂ solution 3-starch reacted for 2 h at room temperature with CTAB and colorized with I₂ solution 4-starch heated for 2 h at 65 ℃ and then cooled down for reaction with CTAB for 2 h and finally colorized with I₂ solution 1'-starch heated for 2 h at 65 ℃ and precipitated with isopropanol 2'-starch reacted for 2 h at 65 ℃ with CTAB and precipitated with isopropanol 3'-starch reacted for 2 h at room temperature with CTAB and precipitated with isopropanol 4'-starch heated for 2 h at 65 ℃ and then cooled down for reaction with CTAB for 2 h and finally precipitated with isopropanol

图 4 淀粉与 CTAB 的颜色反应和分层现象

Fig. 4 Colorreaction and stratification between starch and CTAB

60 μL 以及等体积 -20 ℃ 预冷的异丙醇, -20 ℃ 放置 2 h, 12 000 r/min 离心 15 min, 取沉淀, 加无菌水 600 μL、3 mol/L 醋酸钠溶液 60 μL 并分别加入梯度甲醇和乙醇溶液 (梯度分别为 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%), 12 000 r/min 离心 15 min, 取沉淀 37 ℃ 烘干, 用无菌水 100 μL 溶解, 并使用微量分光光度计检测 A 值, 计算 DNA 的量并计算提取率 (图 5); 取上清液 198 μL, 按顺序加入 96 孔板, 分别加入稀释 100 倍的 SYBR Safe DNA Gel Stain 2 μL, 置于暗处 10 min, 放入化学及荧光分析仪, 设置激发波长和发射波长 $E_x/E_m = 485/538$ nm, 检测其相对荧光强度 (图 6)。

由结果可知, 甲醇、乙醇沉淀 DNA 的效果 (提取率) 与其浓度相关, 当工作浓度低于 60% 时, 甲醇沉淀 DNA 效果较乙醇差, 但两者的总体提取率均低于 70%; 当工作浓度高于 60% 时, 甲醇沉淀处

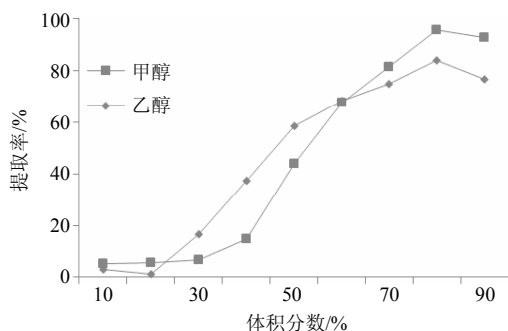


图 5 甲醇及乙醇沉淀 DNA 效率分析

Fig. 5 Analysis on DNA extraction rate between methanol and ethanol precipitation

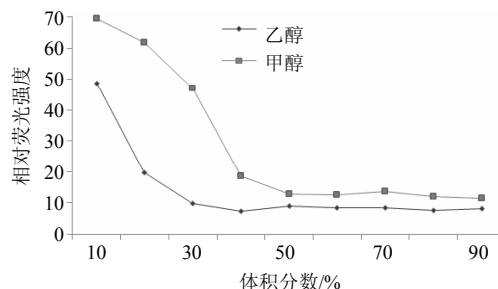


图 6 甲醇及乙醇沉淀 DNA 上清液残留荧光分析

Fig. 6 Analysis on fluorescence remained in supernatants of DNA extraction in methanol and ethanol precipitation

理的提取率达到了 80%, 也超过了乙醇。从上清液的 DNA 残留荧光来看, 也反映了类似的情况。虽然使用高浓度的甲醇作为工作浓度时, 提取率还会继续轻微的增加, 但这会导致操作体系显著增大, 导致不必要的试剂浪费, 因此, 本实验使用 70% 甲醇作为 DNA 沉淀试剂可以产生理想的效果。

2.6 甲醇、乙醇对淀粉-CTAB 复合物的溶解作用及成药制剂 DNA 的提取

通过“2.5”项下的比较, 确定 70% 的甲醇沉淀效果较优, 在此基础上, 本实验对于经过 CTAB 反应后的中成药中的 DNA 情况进行进一步分析。采用 70% 甲醇或乙醇在 CTAB 法中异丙醇沉淀步骤之前先处理样品, 观察两者效果的区别, 结果如表 2 (试验类别 C) 所示。使用甲醇沉淀处理后 DNA 提取量比直接使用异丙醇提取高 10 倍以上, 而使用乙醇沉淀处理效果则不明显。在中成药的提取过程中, 使用 70% 甲醇在异丙醇沉淀之前先处理, 比乙醇处

理 DNA 提取效率高近 2.5 倍。

2.7 优化方法的验证——人参类成药制剂的分子鉴别

基于前面的研究结果确定的成药制剂 DNA 提取方法为分别取样品约 2 g 置于 10 mL 离心管中, 加 65 °C 预热的 2×CTAB 提取缓冲液 2.5 mL 及巯基乙醇 100 μL, 于 65 °C 水浴裂解 2 h, 期间常震荡, 8 000 r/min 离心 5 min; 取上清液加甲醇 5 mL, -20 °C 沉淀 1 h, 8 000 r/min 离心 5 min; 取沉淀转移到 2 mL EP 管中, 加入 65 °C 预热的 2×CTAB 提取缓冲液 600 μL 及巯基乙醇 16 μL, 置于 65 °C 裂解 20 min, 期间常震荡, 随后加等体积氯仿-异戊醇(24:1)颠倒混匀 5 min, 12 000 r/min 离心 15 min; 取上清液加等体积-20 °C 预冷的异丙醇, -20 °C 沉淀 2 h, 12 000 r/min 离心 15 min; 取沉淀用无菌水 600 μL 溶解, 随后加入乙醇 1 200 μL 及 3 mol/L 醋酸钠溶液 60 μL, 混匀, 置-20 °C 沉淀 1 h, 12 000 r/min

离心 15 min, 根据 DNA 的质量重复本操作 2~3 次; 沉淀置于 37 °C 烘箱温育 1 h, 直至乙醇挥干, 随后加无菌水 200 μL 溶解, -20 °C 冷冻备用。

取上述 DNA, 采用“2.2”项下的方法进行分析, 结果如图 7 所示, 人参的特征条带为 388 bp, 西洋参的特征条带为 501 bp, 与文献一致。结果发现 11 种商品中, 序号为 1、2、3、4、6、7、8、10 的样品与商品描述相符合; 序号为 11 的样品(标签成分为西洋参)除了出现西洋参特征条带, 也出现了人参特征条带, 提示有掺伪情况; 序号为 5、9 的样品(标签成分为西洋参), 只出现了人参特征条带, 提示商品中只含有人参而无西洋参, 这与商品标签中所述的成分描述并不相符。

上述结果也说明本研究建立的优化方法可以提取得到 DNA, 并成功用于成药制剂的分子鉴定, 使本优化方法的效果得到了验证。

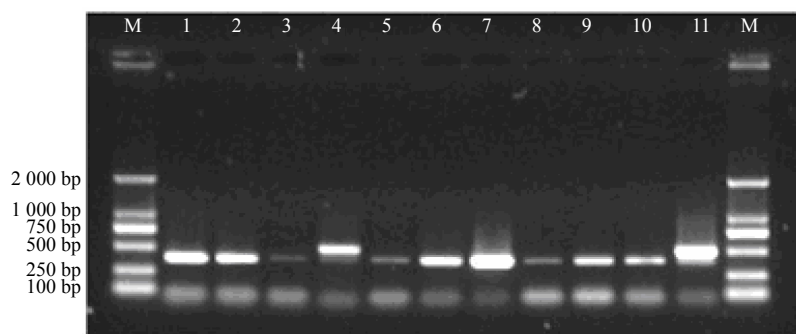


图 7 人参成药制剂 MAS-PCR 琼脂糖凝胶分析

Fig. 7 MAS-PCR agarose gel analysis on ginseng preparations

3 讨论

3.1 创新的实验方法设计

CTAB 法提取中成药或含中药材保健品的 DNA 过程中遇到困难, 是一个已经被关注但没有被解决的问题。本研究在使用传统 CTAB 法提取人参类成药制剂并对其进行分子鉴定时, 因为 DNA 提取困难, 无检测结果, 其剂型主要为颗粒剂、粉剂。经过分析, 发现其原因在于中成药中所含的淀粉与 CTAB 在加热条件下反应生成高极性富含正电荷的复合物, 并影响了 DNA 沉淀效果, 进一步发现采用甲醇处理可以有效去除这种复合物的影响。以人参类成药制剂为例阐述成药制剂 DNA 提取技术优化过程, 最终建立的优化方法有效避免传统 CTAB 法用于中成药时, 因为提取得到的 DNA 量少质差而无法跑出理想 DNA 电泳条带的缺陷, 采

用该优化方法提取得到的 DNA 可成功用于含人参中成药的人参药材分子鉴定, 使得该 DNA 提取技术更有说服力。

3.2 优化的 CTAB 法 DNA 提取技术的应用前景

CTAB 法提取 DNA 主要优势在于能够很好的去除多糖^[11], 且操作步骤简单, 所以植物样品的 DNA 提取多选用此法。对于成药制剂来说, 多种糖类辅料的添加及深加工, 也是影响其 DNA 提取质量的重要影响因素, 因此 CTAB 法还是首选方案。崔光红等^[4]于 2006 年就发现了淀粉和多糖影响 DNA 的提取, 但当时只是从改变氯化钠的浓度来降低其对 DNA 提取的影响。本研究首次发现淀粉与 CTAB 缓冲液在 DNA 提取过程中发生反应, 生成了 CTAB 淀粉复合物, 其极性较大且不溶于 70% 乙醇及异丙醇, 但能与水互溶, 其在碱性溶液中能与

带负电荷的 DNA 大量结合并溶解, 所以极大地影响了成药制剂 DNA 的提取。本实验首次使用甲醇作为沉淀剂, 比较了其与伦醇的沉淀效果, 证明了使用 70% 甲醇作为沉淀剂, 能够解决 CTAB 淀粉复合物的影响, 其 DNA 沉淀效果更优于乙醇。

通过统计《中国药典》2010 年版一部^[12]收载的 943 种粉末剂、颗粒剂、胶囊剂、丸剂、片剂、口服剂等 6 种剂型的中成药, 发现其中添加了淀粉辅料或原药材中含有大量淀粉 (如山药^[13]、粉葛^[14]、天花粉^[15]、白芷^[16]等) 的剂型数 (以下称为目标数) 共有 203 种, 占总数的 21.53%, 其中颗粒剂则占到了 77.69%, 不同剂型中目标数占总数的具体情况如表 3 所示。

表 3 各剂型中目标数占总数的比例

Table 3 Percentage of targets in each preparation form

剂型	目标数	总数	比例/%
粉末	1	59	1.70
胶囊	34	142	23.94
颗粒	94	121	77.69
丸	10	311	3.22
口服液	3	115	2.61
片	61	195	31.28
总计	203	943	21.53

由表 3 可知, 基于甲醇沉淀 DNA 开发出简单易行且安全无毒的方法用于成药制剂 DNA 提取, 并用于成药制剂的分子鉴定, 有很广的应用面, 也有助于提高中药质量评价技术的准确性, 这将产生积极的社会效益, 也能产生很好的经济价值, 具有很好的应用前景。

参考文献

[1] 梁晓春. 合理使用中成药规避不良反应 [J]. 中华全科医师杂志, 2009, 8(5): 292-294.

[2] 颜杰, 刘志强, 程振田. 中成药及中药保健食品中非法添加化学药品现状与对策 [J]. 中国药学杂志, 2007, 42(9): 716-718.

[3] 张海燕, 郭伟魁, 宋民宪, 等. 《中国药典》2010 年版药用辅料标准探讨 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011,

17(11): 289-291.

[4] 崔光红, 唐晓晶, 黄璐琦. 利用多重等位基因特异 PCR 鉴别人参、西洋参 [J]. 中国中药杂志, 2006, 31(23): 1940-1943.

[5] 陈士林, 姚辉, 宋经元, 等. 基于 DNA barcoding (条形码) 技术的中药材鉴定 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2007, 9(3): 7-12.

[6] 夏至, 李贺敏, 张红瑞, 等. 紫苏及其变种的分子鉴定和亲缘关系研究 [J]. 中草药, 2013, 44(8): 1027-1032.

[7] 崔占虎, 蒋超, 李旻辉, 等. 连翘败毒丸中原料药材的分子鉴别 [J]. 药学学报, 2013, 48(4): 590-596.

[8] Coghlan M L, Haile J, Houston J, *et al.* Deep sequencing of plant and animal DNA contained within traditional Chinese medicines reveals legality issues and health safety concerns [J]. *PLoS Genet*, 2012, 8(4): e1002657.

[9] 崔光红, 唐晓晶, 黄璐琦. 含淀粉及多糖类中药材 DNA 的提取方法研究 [J]. 中国中药杂志, 2006, 31(16): 1365-1367.

[10] Wang H T, Kim M K, Kwon W S, *et al.* Molecular authentication of *Panax ginseng* and ginseng products using robust SNP markers in ribosomal external transcribed spacer region [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2011, 55(5): 972-976.

[11] Amani J, Kazemi R, Abbasi A R, *et al.* A simple and rapid leaf genomic DNA extraction method for polymerase chain reaction analysis [J]. *Iran J Biotechnol*, 2011, 9(1): 69-71.

[12] 中国药典 [S]. 一部. 2010.

[13] 李丹, 吕洪艳, 陆海民. 不同品种怀山药中山药多糖和淀粉积累动态比较 [J]. 中草药, 2009, 40(增刊): 250-253.

[14] Wang Q, Xu H H, Shen S. Leaflet morphology of *Pueraria* (Leguminosae) from the miocene Shanwang formation of Shandong Province and its palaeoecological implications [J]. *Bot Res*, 2012, 1(2): 13-22.

[15] 王宁. 天花粉的本草考证 [J]. 中医文献杂志, 2006(3): 19-22.

[16] 王晖, 张艳军. 半夏和白芷分别与生川乌合煎过程中淀粉类成分对生川乌生物碱类成分溶出的影响 [J]. 中草药, 2014, 45(11): 1545-1550.