

## 新型快速中药材 DNA 提取方法的探索与应用

杨璐<sup>1</sup>, 吴文如<sup>1\*</sup>, 付菲<sup>1</sup>, 周华<sup>2</sup>, 吴小燕<sup>1</sup>, 黄祖波<sup>1</sup>, 安鑫<sup>1</sup>

1. 广州中医药大学中药学院, 广东 广州 510006

2. 澳门科技大学 中药质量研究国家重点实验室, 中国澳门特别行政区 000853

**摘要:** **目的** 建立一种无设备快速 30 s 提取中药材 DNA 的方法。**方法** 使用常规定性滤纸作为核酸吸附的载体, 通过裂解液的裂解, 释放核酸并吸附在滤纸上, 利用洗脱液进行核酸纯化, 即可完成不到 30 s 的整个核酸提取过程, 吸附核酸的滤纸可直接放入反应体系进行扩增。**结果** 此方法可以成功提取不同药用部位的中药材核酸, 提取得到的核酸经扩增验证, 可获得与传统提取方法相一致的检测结果。**结论** 此新型快速中药材 DNA 提取方法简单易行、速度快、成本低, 可使核酸提取变得越来越大众化, 不再局限于专业人员和实验室环境, 为分子生药学的应用和发展提供了新思路。

**关键词:** 快速提取; DNA 提取; 中药材; 核酸; 滤纸

中图分类号: R282.12

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2019)02-0502-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.02.032

## Exploration and application of a new method for rapid extraction of DNA from Chinese medicinal materials

YANG Lu<sup>1</sup>, WU Wen-ru<sup>1</sup>, FU Fei<sup>1</sup>, ZHOU Hua<sup>2</sup>, WU Xiao-yan<sup>1</sup>, HUANG Zu-bo<sup>1</sup>, AN Xin<sup>1</sup>

1. School of Pharmaceutical Sciences, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China

2. State Key Laboratory of Quality Research in Chinese Medicine, Macau University of Science and Technology, Macau 000853, China

**Abstract: Objective** To build an equipment-free nucleic acid extraction dipstick methodology that can obtain amplification-ready DNA from Chinese medicinal materials in 30 s. **Methods** A new rapid DNA extraction method which was suitable for traditional Chinese medicine, with equipment-free nucleic acid extraction dipstick methodology that can obtain amplification-ready DNA from Chinese medicinal materials in 30 s was verified. The filter paper strip or disk for the adsorbed nucleic acid can be directly amplified by the reaction system. **Results** This method can extract the nucleic acid successfully. The extracted DNA was amplified, and the results were consistent with the traditional extraction methods. **Conclusion** The new rapid DNA extraction method is simple, fast, and low cost, which will make nucleic acid extraction become more and more popular, and no longer confined to professional and laboratory environment. This study provides a new idea for the application and development of molecular pharmacology.

**Key words:** rapid extraction; DNA extraction; Chinese medicinal materials; nucleic acid; filter paper

随着蕲蛇<sup>[1]</sup>、乌梢蛇<sup>[1]</sup>、川贝母<sup>[2]</sup>的特异性分子鉴别方法引入《中国药典》2010、2015 年版, 分子鉴定法成为中药鉴定工作中的一大发展趋势, 其高特异性、高灵敏度的优点也日益呈现。核酸的提取是中药分子鉴定中必不可少的步骤, 但由于中药材多为干品, 其 DNA 降解严重且富含大量的次生代谢产物, 相对于新鲜样品往往更难提取<sup>[3-4]</sup>。传统的 DNA 提取

方法如 CTAB 法<sup>[5]</sup>、试剂盒法<sup>[6]</sup>等往往耗时长、操作复杂繁琐, 严重制约了分子鉴定方法的使用和推广。简便、快速的 DNA 提取方法一直是分子生药学研究者追寻的目标, 尽管现有的快速提取方法如碱裂解法<sup>[7]</sup>、直接 PCR 法<sup>[8]</sup>等可将提取时间缩短至 10 min 左右, 但这些方法仍需要加热、离心沉淀等操作, 具有一定的局限性。

收稿日期: 2018-09-09

基金项目: 澳门科技大学中药质量研究国家重点实验室开放课题 (MUST-SKL-2016-07); 国家中医药管理局全国中药特色技术传承人培训项目 (2015481601003); 广州中医药大学 2018 年校级大学生创新创业训练计划项目 (201810572172)

作者简介: 杨璐 (1993—), 女, 硕士研究生, 从事中药分子鉴定研究。Tel: (020)39358296 E-mail: 1084730732@qq.com

\*通信作者 吴文如 (1976—), 男, 博士, 副教授, 硕士生导师, 从事中药分子鉴定研究。Tel: (020)39358296 E-mail: wuwenru@gzucm.edu.cn

滤纸纯化法由 Zou 等<sup>[9]</sup>报道, 利用 Whatman NO.1 等富含纤维素的试纸可以在 30 s 内从植物、动物和微生物中快速地完成核酸的提取和纯化, 不需要任何实验仪器, 操作十分简便。基于中药现场、快速分子检测的构想, 本研究首次将滤纸纯化法用于中药材的 DNA 提取并结合 DNA 条形码检测、《中国药典》2015 年版收载的分子鉴定等研究, 探索其在中药材 DNA 提取和分子鉴定中的可行性, 从而

建立一种无设备快速提取中药材 DNA 的方法, 为中药分子鉴定技术的发展和普及提供技术支持。

## 1 材料与仪器

### 1.1 材料

材料分别采集自广州中医药大学药圃、或购买于药材公司及网络, 样品均由广州中医药大学吴文如副教授鉴定。新鲜样品保存于-80 °C 冰箱, 干燥样品保存于-20 °C 和 4 °C 冰箱。样品信息见表 1。

表 1 样品信息

Table 1 Information of samples

编号	名称	类别	来源
WZMT	五指毛桃 <i>Ficus simplicissima</i>	新鲜叶片	广州中医药大学时珍山药圃
TPSH1	铁皮石斛 <i>Dendrobium officinale</i>	新鲜叶片	云南铁皮石斛科技发展有限公司
TPSH2	铁皮石斛 <i>D. officinale</i>	新鲜叶片	云南铁皮石斛科技发展有限公司
TPSH3	铁皮石斛 <i>D. officinale</i>	新鲜叶片	云南
XYS	西洋参 <i>Panax quinquefolium</i>	根	广州采芝林药业连锁店
RS	人参 <i>Panax ginseng</i>	根及根茎	广州采芝林药业连锁店
SQ	三七 <i>Panax notoginseng</i>	根及根茎	广州至信药业有限公司
DS	党参 <i>Codonopsis pilosula</i>	根	广州百和堂大药房第 18 分店
BZ	白芷 <i>Angelica dahurica</i>	根	广州采芝林药业连锁店
AZBM	暗紫贝母 <i>Fritillaria unibracteata</i>	鳞茎	四川新荷花川贝母种植基地
WBBM	瓦布贝母 <i>Fritillaria unibracteata</i>	鳞茎	四川新荷花川贝母种植基地
RCR	肉苁蓉 <i>Cistanche deserticola</i>	肉质茎	广州至信药业有限公司
ZJS	竹节参 <i>Panax japonicus</i>	根茎	四川
JG	桔梗 <i>Platycodon grandiflorum</i>	根	广州采芝林药业连锁店
BHSSC	白花蛇舌草 <i>Hedyotis diffusa</i>	全草	广州至信药业有限公司
BSZ	山楂 <i>Crataegus pinnatifida</i>	果实	广州至信药业有限公司
SR	砂仁 <i>Amomum villosum</i>	果实	广州至信药业有限公司
TLZ	葶苈子 <i>Lepidium apetalum</i>	种子	广州至信药业有限公司
CP	陈皮 <i>Citrus reticulata</i>	果实	广州至信药业有限公司
HH	红花 <i>Carthamus tinctorius</i>	花	广州至信药业有限公司
HH	槐花 <i>Sophora japonica</i>	花	广州至信药业有限公司
ZZ	紫芝 <i>Ganoderma sinense</i>	子实体	广州至信药业有限公司
CZ	赤芝 <i>Ganoderma lucidum</i>	子实体	广州至信药业有限公司
ZL	猪苓 <i>Polyporus umbellatus</i>	菌核	广州至信药业有限公司
FL	茯苓 <i>Poria cocos</i>	菌核	广州至信药业有限公司
GDL	广地龙 <i>Pheretima aspergillum</i>	动物药	广州至信药业有限公司
TBC	土鳖虫 <i>Eupolyphaga sinensis</i>	动物药	广州至信药业有限公司
JC	僵蚕 <i>Bombyx mori</i>	动物药	广州至信药业有限公司
CT	蝉蜕 <i>Cryptotympana pustulata</i>	动物药	广州至信药业有限公司
WSS	乌梢蛇 <i>Zaocys dhumnades</i>	动物药	广州固生堂药业

### 1.2 仪器与试剂

BSA224S 电子分析天平 (日本 ViBRA 公司); Water Bath SY-1210 恒温水浴锅 (美国 Crystal 公司); 水平电泳仪 (美国 BioRad 公司); T100 梯度 PCR 仪 (美国 BioRad 公司); Nano Drop 2000 超微量紫外分光光度计 (美国 Thermo 公司); Tanon 2500 凝胶成像仪 (上海天能科技有限公司)。

聚乙烯吡咯烷酮 40 (PVP 40) 购自 Amresco

公司; Triton X-100 购自 Sigma 公司; 植物组织直接 PCR 试剂盒购自上海翊圣生物科技有限公司; 新星牌定性滤纸购自杭州富阳特种纸业; 石蜡购自莱卡公司; 扩增试剂 (PrimeSTAR HS Premix) 购自宝生物工程 (大连) 有限公司; 低熔点琼脂糖, 50×TAE buffer、凝胶染料 (SYBR Safe DNA Gel Stain), 6×Loading buffer 等均购自美国 Life Technologies 公司; D2000 DNA Marker 购自天根生化科技 (北

京)有限公司;引物由上海生工有限公司及深圳华大基因科技有限公司合成;其他试剂为国产分析纯。

## 2 方法

### 2.1 滤纸条、滤纸圆盘的制备

**2.1.1 滤纸条制备** 用剪刀将滤纸裁剪成 44 mm×2 mm 的长方形滤纸条,将其一端浸入加热融化的石蜡中,待晾干后便形成了 40 mm×2 mm 的疏水手柄区域,以便转移滤纸条,前端未浸渍石蜡的部分则为核酸结合区,用于后续的核酸吸附。

**2.1.2 滤纸圆盘制备** 使用打孔机制备直径 3 mm 的小圆盘,用于核酸的吸附。设计示意图见图 1。

### 2.2 滤纸法试剂配制

**2.2.1 植物药材裂解液配方** 20 mmol/L Tris (pH 8.0)、25 mmol/L NaCl、2.5 mmol/L EDTA、0.05% SDS。

**2.2.2 动物药材裂解液配方** 1.5 mol/L 盐酸胍、100 mmol/L NaCl、1% 聚山梨酯-20、50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0)、5 mmol/L EDTA;清洗液配方:

10 mmol/L Tris (pH 8.0)、0.1% 聚山梨酯-20。

### 2.3 滤纸法 DNA 提取

**2.3.1 滤纸条法** 称取经液氮研磨后的新鲜或干燥药材粉末 0.05~0.20 g,置于 2 mL 离心管中,加入 500 μL 裂解液裂解样品 7 s,将滤纸条核酸结合区浸入裂解液中 3 s 以吸附核酸,之后将滤纸条转移至 1 750 μL 清洗液中 3 s 以清洗表面吸附的杂质。最后将滤纸条转移至配制好的扩增反应体系中 3 s,以洗脱表面吸附的核酸,扩增体系即配制完成。具体操作流程见图 2。

**2.3.2 滤纸圆盘法** 称取经液氮研磨后新鲜或干燥药材粉末 0.05~0.20 g,置于 2 mL 离心管中,或将新鲜植物叶片置于离心管中研磨,加入 500 μL 裂解液裂解样品 7 s,将滤纸圆盘浸入裂解液中 3 s 以吸附核酸,之后将圆盘转移至 1 750 μL 清洗液中 3 s 以清洗表面吸附的杂质。最后将圆盘转移至配制好的反应体系中。此方法与滤纸条法不同之处在于圆盘是保留在扩增体系中(图 2)。

### 2.4 PCR 扩增及电泳

植物类药材主要选择 ITS2 序列进行方法学考察,并选择了 *matK*、*psbA-trnH*、*rbcL* 序列进行扩增效果验证;动物类中药选择 COI 序列进行扩增。50 μL 反应体系:25 μL PrimeSTAR HS Premix,20 mmol/L 引物各 0.7 μL,ddH<sub>2</sub>O 补足至 50 μL。同时,还将滤纸法所提取的川贝母、乌梢蛇 DNA 进行了《中国药典》2015 年版收载方法的应用考察。扩增反应程序见表 2。反应结束后取 5 μL 反应液,用 SYBR<sup>®</sup> Safe DNA Gel Stain 染色的 1% 琼脂糖凝胶电泳,Tanon 2500 型凝胶成像系统检测拍照。

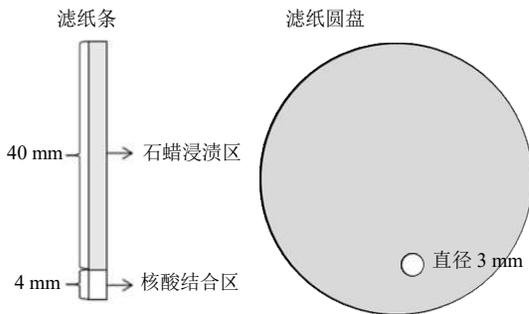


图 1 滤纸条及圆盘制作示意图  
Fig. 1 Filter paper strip and disk

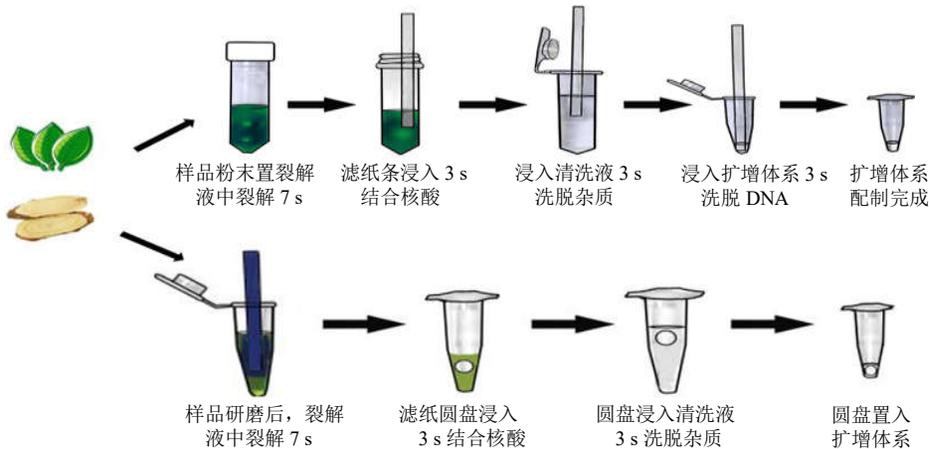


图 2 滤纸条和滤纸圆盘法提取 DNA 操作流程示意图  
Fig. 2 DNA extraction using filter paper strip or disk

表 2 引物序列及 PCR 反应程序  
Table 2 Primer sequences and PCR reaction program

序列	引物	引物序列 (5'→3')	PCR 反应条件
ITS2	S2F	ATGCGATACTTGGTGTGAAT	94 °C、2 min; 98 °C、10 s, 56 °C、10 s, 72 °C、30 s, 38 个循环; 72 °C、5 min
	S3R	GACGCTTCTCCAGACTACAAT	
rbcL	1f	ATGTCACCACAAACAGAAAC	95 °C、2 min; 94 °C、1 min, 55 °C、30 s, 72 °C、1 min, 38 个循环; 72 °C、7 min
	724r	TCGCATGTACCTGCAGTAGC	
psbA-trnH	fwd	GTTATGCATGAACGTAATGCTC	95 °C、4min; 94 °C、30 s, 55 °C、1 min, 72 °C、1 min, 38 个循环; 72 °C、10 min
	rev	CGCGCATGGTGGATTACAATCC	
matK	KIM_3F	CGTACAGTACTTTTGTGTTTACGAG	94 °C、1 min; 94 °C、30 s, 52 °C、20 s, 72 °C、50 s, 38 个循环; 72 °C、5 min
	KIM_1R	ACCCAGTCCATCTGGAAATCTTGGTTC	
COI	LCOI490	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG	94 °C、1 min; 94 °C、1 min, 45 °C、1.5 min, 72 °C、1.5 min, 5 个循环; 94 °C、1 min, 50 °C、1.5 min, 72 °C、1 min, 35 个循环; 72 °C、5 min
	HCO2198	TAAACTTTCAGGGTGACCAAAAAATCA	
川贝母改良药典法	CBM-F	CGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAA	94 °C、2 min; 98 °C、10 s, 58 °C、10 s, 72 °C、30 s, 40 个循环; 72 °C、5 min; PCR 产物 30 °C 酶切 7 min
	CBM-R	GCTACGTTCTTCATCGAT	
乌梢蛇药典法	WSS-F	GCGAAAGCTCGACCTAGCAAGGGGACCACA	95 °C、5 min; 95 °C、30 s, 63 °C、45 s, 35 个循环; 72 °C、5 min
	WSS-R	CAGGCTCCTCTAGGTTGTTATGGGGTACCG	

### 3 结果与分析

#### 3.1 最适投料量考察

以五指毛桃新鲜叶片和人参饮片为例, 分别投料 0.01~0.25 g, 考察投料量对扩增结果的影响。结果表明投料量在 0.01~0.25 g 内对于扩增无明显影响, 均可以扩增成功。但投料量过多会使裂解液变得过于黏稠成糊状, 不利于后续操作, 因此建议投料量控制在 0.05~0.20 g (图 3)。

#### 3.2 滤纸形状大小对扩增结果影响考察

为了考察滤纸的形状、大小、是否保留于扩增体系对扩增效果的影响, 以五指毛桃为样品, 进行了 DNA 提取和 ITS2 序列扩增。结果表明, 滤纸的形状、大小、是否保留于扩增体系对扩增结果无明显影响, 均可扩增成功 (图 4)。

#### 3.3 扩增体系中加入最适圆盘数量考察

为了考察滤纸圆盘数量对扩增效果是否有影响, 以五指毛桃为样品, 进行了 DNA 提取和 ITS2 序列扩增。在扩增体系中分别加入 1~6 个圆盘, 以考察加入最适圆盘数, 结果表明 (图 5), 圆盘数量增加并不能提高扩增效率, 反而会抑制扩增, 加入 1~2 个圆盘较为合适。

#### 3.4 裂解液可扩增样品数量考察

制备了 50 个滤纸圆盘, 分别浸入 500 μL 裂解液中进行五指毛桃样品核酸的吸附, 选择以 5 为间隔的圆盘进行 ITS2 序列扩增, 实验结果表明 (图 6), 1~50 个圆盘均可扩增成功, 制备好的每瓶裂解液可以做 50 次以上的扩增, 有效减少了样品的浪费, 使得操作更为简化。

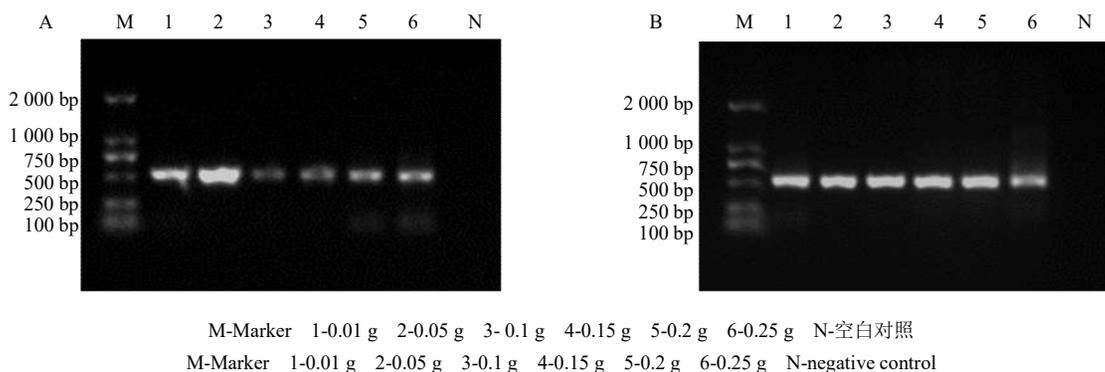
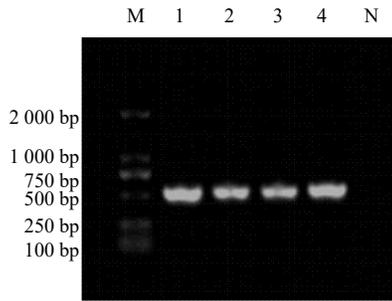


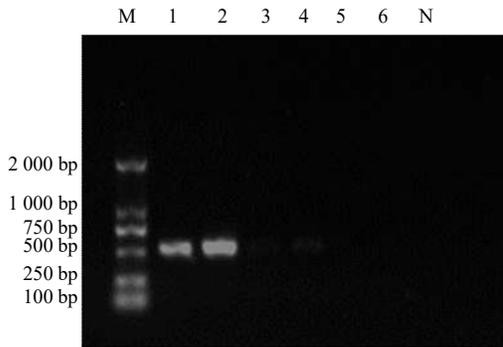
图 3 滤纸法提取不同投料量五指毛桃新鲜叶片 (A) 和人参饮片 (B) 进行 ITS2 序列扩增结果  
Fig. 3 Investigation on optimum dosage of fresh medicinal plants (A) and *Ginseng Radix* slices (B)



1-直径 1.5 mm 圆盘 2-直径 3 mm 圆盘 3-滤纸条保留于扩增体系  
4-滤纸条不保留于扩增体系 N-空白对照  
1-1.5 mm disk 2-3 mm disk 3-filter paper in 4-filter paper out  
N-negative control

图 4 不同形状大小滤纸提取五指毛桃 DNA 的 ITS2 序列扩增结果

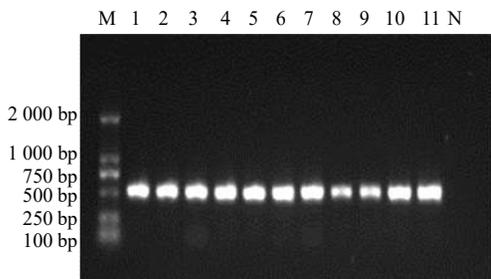
Fig. 4 ITS2 amplification results of DNA extracted using different shapes and sizes of filter paper



1~6-1~6 个圆盘 N-空白对照  
1-6-1-6 disks N-negative control

图 5 扩增体系中加入 1~6 个滤纸圆盘的 ITS2 序列扩增结果

Fig. 5 ITS2 amplification results of DNA extracted using 1-6 filter paper disks



1~11-第 1、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50 个圆盘  
N-空白对照  
1-11-1st, 5th, 10th, 15th, 20th, 25th, 30th, 35th, 40th, 45th, 50th filter paper disk N-negative control

图 6 500 μL 裂解液中第 1~50 个滤纸圆盘进行 ITS2 序列扩增结果

Fig. 6 ITS2 amplification results of DNA extracted from 1st to 50th filter paper disks treated by 500 μL lysate

### 3.5 DNA 溶出时效考察

滤纸法所提取的 DNA 均吸附在滤纸上, 无法直接用电泳或者紫外分光光度计来检测质量。因此, 制备了 20 个滤纸圆盘, 进行五指毛桃样品核酸提取, 经吸附和清洗后放置于 200 μL TE 缓冲液中, 分别以 1 min、30 min、1 h、2 h、24 h、48 h、72 h 为时间点, 进行核酸电泳, 并利用 Tanon 2500 全自动数码凝胶成像分析系统扫描条带面积, 建立溶出曲线, 考察 1 min~72 h 内 DNA 溶出时效。结果表明(图 7-A)溶出的 DNA 质量浓度较低, 仅约 2.5 ng/μL, 且随时间在 48 h 内呈现逐渐增加趋势, 而后质量浓度无明显变化。将溶出的 DNA 作为模板, 进行 ITS2 序列的扩增, 均可扩增成功(图 7-B)。分析其原因可能为滤纸在清洗液中洗脱杂质的步骤有效地去除了大量 PCR 扩增抑制剂, 提高了扩增效率。

### 3.6 快速提取方法提取新鲜样品所得 DNA 扩增效果的比较

为了考察滤纸法是否可以取得与其他快速提取扩增方法相同的扩增效果, 进行了与试剂盒直接 PCR 法<sup>[8]</sup>、碱裂解法<sup>[7]</sup>所得 DNA 进行 PCR 扩增效果的比较。结果表明, 以五指毛桃和铁皮石斛为例, 4 种方法所取得新鲜样品 DNA 扩增 ITS2 序列均可以扩增成功(图 8)。

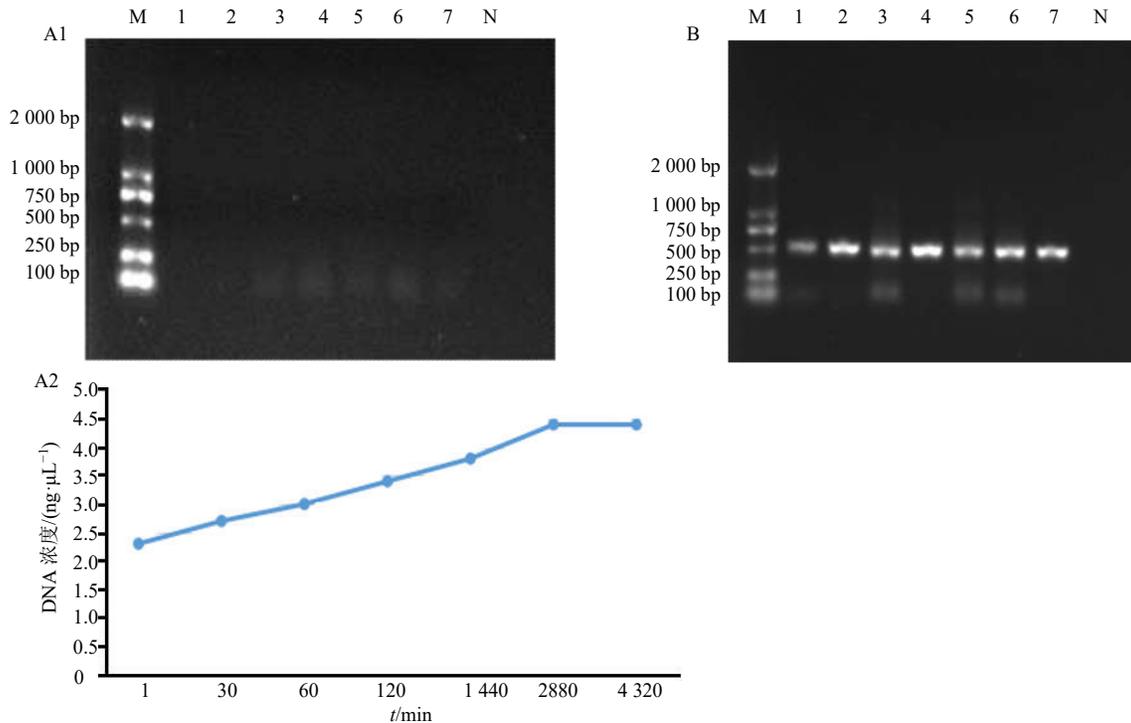
### 3.7 快速提取方法提取药材所得 DNA 不同条形码扩增效果的比较

分别选择了人参、西洋参进行 ITS2、matK、psbA-trnH、rbcL 序列扩增, 以比较 4 种快速提取扩增方法对药材 DNA 不同条形码的扩增效果。结果表明(图 9), 4 种方法进行 4 段条形码序列的扩增均成功, 滤纸条法和滤纸圆盘法均可以取得与其他快速提取扩增方法同样的扩增效果。

### 3.8 应用范围考察

为了考察滤纸法提取药材 DNA 是否具有普适性, 以及是否适合用于多种分子检测, 进行了如下实验考察。

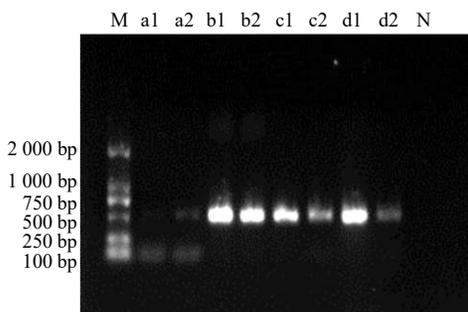
**3.8.1 滤纸法对药品标准中分子鉴别品种的适用性分析** 《中国药典》记载了乌梢蛇、蕲蛇、川贝母的高特异性 PCR 鉴别研究<sup>[1-2]</sup>, 然而该法操作时间长, 花费比较高昂。为考察滤纸法对《中国药典》记载品种分子鉴别的适用性, 使用滤纸法提取植物药材川贝母(暗紫贝母、梭砂贝母)及动物药材乌梢蛇 DNA, 并按照《中国药典》中所记载的分子



1-1 min 2-30 min 3-1 h 4-2 h 5-24 h 6-48 h 7-72 h N-空白对照 A1-五指毛桃 DNA 在 TE 中溶出 1 min~72 h 电泳结果 A2-1 min~72 h 溶出曲线 B-圆盘提取的 DNA 在 TE 中 1 min~72 h 溶出 DNA 进行 ITS2 序列扩增结果  
1-1 min 2-30 min 3-1 h 4-2 h 5-24 h 6-48 h 7-72 h N-negative control A1-*Ficus simplicissima* DNA dissolution electrophoresis results from 1 min to 72 h A2-1 min~72 h dissolution curve B-DNA dissolution from 1 min to 72 h extracted by filter paper disk for ITS2 amplification

图 7 五指毛桃 DNA 从滤纸圆盘中 1 min~72 h 溶出情况和 ITS2 序列扩增结果

Fig. 7 DNA dissolution from 1 min to 72 h extracted by filter paper disk and ITS2 amplification



a1-五指毛桃叶片碱裂解法 a2-铁皮石斛叶片碱裂解法 b1-五指毛桃叶片直接 PCR 法 b2-铁皮石斛叶片直接 PCR 法 c1-五指毛桃叶片滤纸圆盘法 c2-铁皮石斛叶片滤纸条法 d1-五指毛桃叶片滤纸条法 d2-铁皮石斛叶片滤纸条法 N-空白对照  
a1-alkaline lysis of *Ficus simplicissima* a2-alkaline lysis of *Dendrobium officinale* b1-direct PCR of *Ficus simplicissima* b2-direct PCR of *Dendrobium officinale* c1-filter paper disk of *Ficus simplicissima* c2-filter paper disk of *Dendrobium officinale* d1-cellulose dipstick of *Ficus simplicissima* d2-cellulose dipstick of *Dendrobium officinale* N-negative control

图 8 4 种快速提取方法提取新鲜样品所得 DNA 扩增效果的比较 (ITS2 序列)

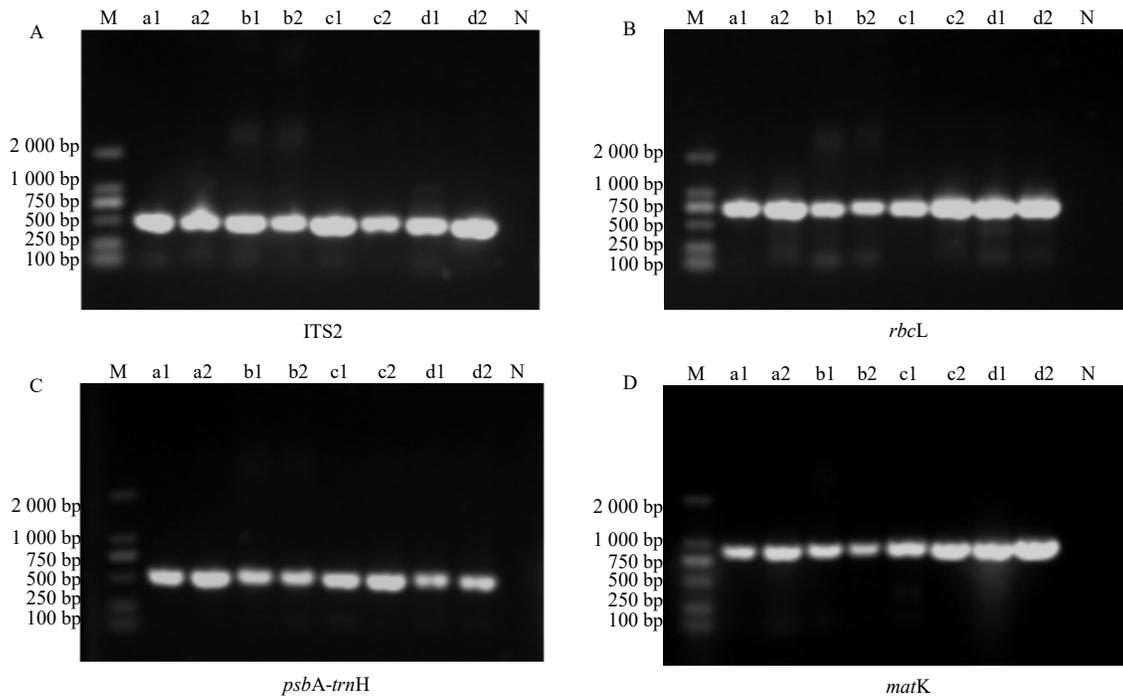
Fig. 8 Comparison of ITS2 sequence amplification from fresh samples by four rapid DNA extraction methods (ITS2)

检测步骤进行重复试验。结果表明,川贝母 PCR 产物经酶切后在 100~250 bp 有 2 条 DNA 条带,证明酶切成功(图 10-A);乌梢蛇 PCR 产物在 300~400 bp 有 1 条单一 DNA 条带(图 10-B)。以上结果均与《中国药典》中描述的一致,本研究表明,利用滤纸法可在 30 s 内提取出动、植物药材样品的 DNA,并可保障《中国药典》收载川贝母、乌梢蛇鉴别方法的推广实施。

**3.8.2 不同药用部位药材扩大范围考察** 本研究选择了代表性的根及根茎类、全草类、果实种子类、花类、菌类、动物类药材分别进行 ITS2 和 COI 序列的扩增,结果如图 11 所示,不同药用部位的药材经滤纸法提取后均扩增成功,说明滤纸法具有良好的普适性,可适合多种不同药用部位的动、植物药材的 DNA 提取和分子检测。

#### 4 讨论

核酸提取是分子生药学研究的首要环节,快速有效地进行核酸提取是后续核酸扩增以及分子检测的前提和基础。本方法可以在 30 s 内成功提取动、植物、菌类药材饮片的 DNA,且纯度较好,可

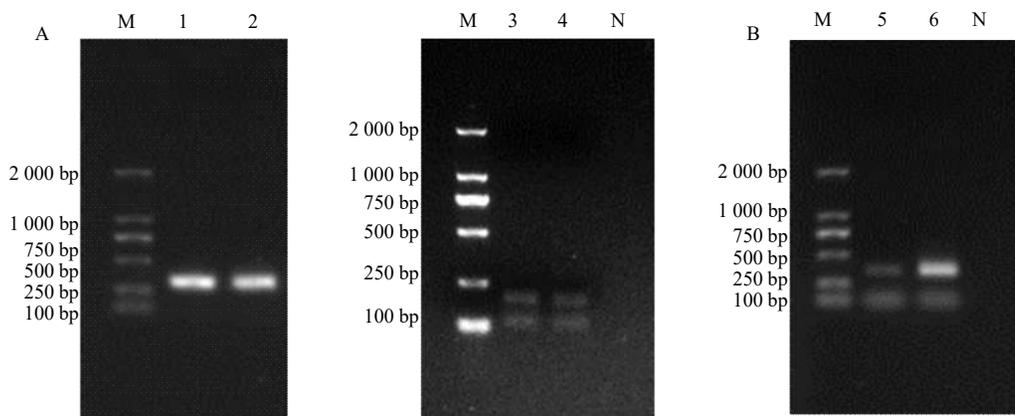


A-ITS2 序列 B-*rbcL* 序列 C-*psbA-trnH* 序列 D-*matK* 序列 a1-西洋参碱裂解法 a2-人参碱裂解法 b1-西洋参直接 PCR 法 b2-人参直接 PCR 法 c1-西洋参滤纸圆盘法 c2-人参滤纸圆盘法 d1-西洋参滤纸条法 d2-人参滤纸条法 N-空白对照

A-ITS2 sequence B-*rbcL* sequence C-*psbA-trnH* sequence D-*matK* sequence a1-alkaline lysis of *P. quinquefolium* a2-alkaline lysis of *P. ginseng* b1-direct PCR of *P. quinquefolium* b2-direct PCR of *P. ginseng* c1-filter paper disk of *P. quinquefolium* c2-filter paper disk of *P. ginseng* d1-cellulose dipstick of *P. quinquefolium* d2-cellulose dipstick of *P. ginseng* N-negative control

图 9 快速提取方法提取药材所得 DNA 的不同条形码扩增效果的比较

Fig. 9 Comparison of different DNA barcode amplification of Chinese herbal medicines obtained from three kinds of rapid extraction methods

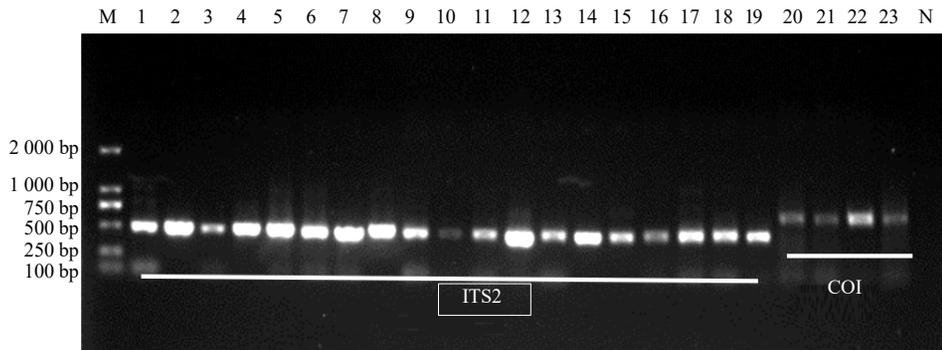


A-川贝母的药典法鉴别 B-乌梢蛇的药典法鉴别 1-暗紫贝母 PCR 产物 2-瓦布贝母 PCR 产物 3-暗紫贝母酶切产物 4-瓦布贝母酶切产物 5、6-乌梢蛇 PCR 产物 N-空白对照

A-identification of *Fritillaria unibracteata* B-identification of *Zaozys dhumnades* by method of Chinese pharmacopoeia 1-*Fritillaria unibracteata* PCR products 2-*Fritillaria unibracteata* PCR products 3-*Fritillaria unibracteata* enzyme digestion products 4-*Fritillaria unibracteata* PCR products 5-*Zaozys dhumnades* PCR products 6-*Zaozys dhumnades* PCR products N-negative control

图 10 滤纸法对药品标准中分子鉴别品种的适用性分析

Fig. 10 Applicability analysis of filter paper method in molecular identification of Chinese Pharmacopoeia



1-三七 2-党参 3-白芷 4-暗紫贝母 5-瓦布贝母 6-肉苁蓉 7-竹节参 8-桔梗 9-白花蛇舌草 10-北山楂 11-砂仁 12-葶苈子 13-陈皮 14-红花 15-槐花 16-紫芝 17-赤芝 18-猪苓 19-茯苓 20-广地龙 21-土鳖虫 22-僵蚕 23-蝉蜕 N-空白对照

1-*Panax notoginseng* 2-*Codonopsis pilosula* 3-*Angelica dahurica* 4-*Fritillaria unibracteata* 5-*Fritillaria unibracteata* 6-*Cistanche deserticola* 7-*Panax japonicus* 8-*Platycodon grandiflorum* 9-*Hedyotis diffusa* 10-*Crataegus pinnatifida* 11-*Amomum villosum* 12-*Lepidium apetalum* 13-*Citrus reticulata* 14-*Carthamus tinctorius* 15-*Sophora japonica* 16-*Ganoderma sinense* 17-*Ganoderma lucidum* 18-*Polyporus umbellatus* 19-*Poria cocos* 20-*Pheretima aspergillum* 21-*Eupolyphaga sinensis* 22-*Bombyx mori* 23-*Cryptotympana pustulata* N-negative control

图 11 不同药用部位药材的 ITS2 和 COI 序列扩增结果

Fig. 11 Electrophoresis results of amplified products of ITS2 and COI sequences from different medicinal parts after DNA extraction by filter paper

成功用于多种分子鉴定研究，并取得与其他常用 DNA 提取方法相当的扩增结果。此方法对样品投料量、滤纸形状大小、是否保留于扩增体系无严格要求，扩增效率较高。Zou 等<sup>[9]</sup>验证了滤纸中的纤维素能在裂解液中快速地吸附 DNA，且 DNA 在清洗液中不会被快速洗脱下来，但扩增抑制剂可以很快被清洗液洗脱。因此短时间吸附和清洗获得的 DNA 质量足够好，适合用于后续的 PCR 扩增。

本提取方法无需任何设备，只需要使用普通定性滤纸自制一条滤纸条和 2 个分别装有裂解液和清洗液的 EP 管即可完成核酸提取，平均每个样品提取成本在 0.1 元左右，与使用 Whatman NO.1 滤纸和现有常见的 DNA 提取方法，如 CTAB 法<sup>[5]</sup>、试剂盒法<sup>[7]</sup>等相比，可大大降低样品提取成本，使得此法更加容易推广，更易被科研工作者接受。

在本实验中发现滤纸条法、滤纸圆盘法均可成功提取 DNA 并进行扩增，但是滤纸条法更容易制作成商业试剂盒应用于快检领域，具更不易受污染、操作更简便等优点，并可与快速 PCR、荧光目视法等快速扩增、快速检测技术结合在一起，开发出多种现场鉴别试剂盒。真正实现从提取到观察检测结果在数十分钟内完成，可使药材快速检测将变得越来越大众化，不再局限在专业人员和实验室环境，使中药材现场鉴别、野外鉴别成为可能。

参考文献

[1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.  
 [2] 中国药典 [S]. 一部. 2015.  
 [3] 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): 1365-1369.  
 [4] Chen S L, Pang X H, Song J Y, et al. A renaissance in herbal medicine identification: From morphology to DNA [J]. *Biotechnol Adv*, 2014, 32(7): 1237-1246.  
 [5] Doyle J J, Doyle J L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue [J]. *Phytochem Bull*, 1987, 19(1): 11-19.  
 [6] Zhao M M, Shi Y H, Wu L, et al. Rapid authentication of the precious herb saffron by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) based on internal transcribed spacer 2 (ITS2) sequence [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: e25370.  
 [7] 蒋超, 黄璐琦, 袁媛, 等. 使用碱裂解法快速提取药材 DNA 方法的研究 [J]. 药物分析杂志, 2013, 33(7): 1081-1089.  
 [8] 张金家, 徐红, 赵淑娟. 应用直接 PCR 技术的药用植物批量样本快速处理及分子鉴定 [J]. 药学学报, 2017, 52(11): 1763-1769.  
 [9] Zou Y P, Mason M G, Wang Y L, et al. Nucleic acid purification from plants, animals and microbes in under 30 seconds [J]. *PLoS Biol*, 2017, 15(11): e2003916.