

## 阿胶 DNA 提取方法优化

陈志宣<sup>1</sup>, 龚国利<sup>1\*</sup>, 钱云开<sup>2</sup>

(1. 陕西科技大学 生命科学与工程学院, 西安 710021;  
2. 秦皇岛出入境检验检疫局, 河北 秦皇岛 066004)

**[摘要]** 目的: 优选阿胶 DNA 的提取方法和效率, 为其他高蛋白含量产品中 DNA 的提取提供参考。方法: 采用十二烷基苯磺酸钠(SDS)法和十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)法提取阿胶 DNA, 针对阿胶产品的自身特性, 优选 SDS 法中蛋白酶 K 作用时间和蛋白洗脱步骤。结果: 在同等条件下, SDS 法较 CTAB 法对阿胶 DNA 的平均提取量高  $0.022 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。优化的 SDS 法为蛋白酶 K 作用时间 1.5 h, 使用酚-三氯甲烷-异戊醇洗脱阿胶中蛋白质, 重复 3 次; 阿胶 DNA 的纯度较原工艺提高了 48.3%。结论: 采用 SDS 法对阿胶中蛋白的清除作用较 CTAB 法效率高, 优化的 SDS 法对阿胶 DNA 的提取适用性较强, 为阿胶中动物来源分子生物学检测提供条件。

**[关键词]** 阿胶; DNA 提取; 蛋白酶 K; 酚-三氯甲烷-异戊醇

**[中图分类号]** R283.6; R284.2; R282.74 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)21-0013-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2014210013

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20140915.1101.003.html>

**[网络出版时间]** 2014-09-15 11:01

## Improvement of Extraction Method of DNA from Asini Corii Colla

CHEN Zhi-xuan<sup>1</sup>, GONG Guo-li<sup>1\*</sup>, QIAN Yun-kai<sup>2</sup>

(1. College of Life Science and Engineering, Shaanxi University of Science and Technology, Xi'an 710021, China;  
2. Qinhuangdao Entry-exit Inspection and Quarantine Bureau, Qinhuangdao 066004, China)

**[Abstract]** **Objective:** To improve extraction efficiency of DNA in Asini Corii Colla and provide a reference for extracting DNA in other products containing high protein content. **Method:** DNA in Asini Corii Colla was extracted by SDS method and CTAB method, according to their own characteristics of Asini Corii Colla products, reaction time of proteinase K and protein elution step in SDS method were optimized. **Result:** Under the same conditions, average extraction capacity of DNA in Asini Corii Colla by SDS was higher than CTAB, whose numerical difference was  $0.022 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ . Optimized SDS method was as following: reaction time of proteinase K 1.5 h, eluted protein in Asini Corii Colla by phenol-chloroform-isoamyl alcohol for three times, purity of DNA in Asini Corii Colla increased 48.3% by comparing with the original process. **Conclusion:** Scavenging effects on protein in Asini Corii Colla by SDS method is higher than CTAB, this optimized SDS method is suitable for extraction of DNA in Asini Corii Colla, it provides conditions for biological detection of animal derived molecules from Asini Corii Colla.

**[Key words]** Asini Corii Colla; DNA extraction; proteinase K; phenol-chloroform-isoamyl alcohol

阿胶是驴皮经煎煮、浓缩制成的固体胶块,味甘、平,入肺、肝、肾经,具有补血止血、滋阴润燥等功

**[收稿日期]** 20140327(016)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(20906058);陕西省教育厅基金项目(12JK1023)

**[第一作者]** 陈志宣,在读硕士,从事分子中药学研究, Tel:15191463905, E-mail:1198500374@qq.com

**[通讯作者]** \* 龚国利, 博士, 副教授, 从事微生物发酵的研究, Tel:029-86169397, E-mail:gongguoli@sust.edu.cn

效,药食两用。由于阿胶功效独特,供不应求,各地均出现其他动物皮熬制的代用品。为了鉴别市场所售阿胶成分,目前较前沿的鉴别方法为分子鉴定,将阿胶的 DNA 提取出来,利用分子学手段检测所提取 DNA 的动物来源,以确定阿胶的真伪<sup>[1]</sup>。但由于阿胶本身属于蛋白质成分高且黏性大的物质,致使 DNA 提取不易,而且其在制作过程中,原料经反复熬煮,致使 DNA 部分遭到破坏,更增加了 DNA 提取的难度。

十二烷基苯磺酸钠(sodium dodecyl benzenesulfonate, SDS)是一种阴离子去垢剂,在高温(55 ~ 65 ℃)条件下能裂解细胞,使染色体离析,蛋白质变性,释放出核酸。上清中 DNA 用酚-三氯甲烷抽提,反复抽提后用提高盐浓度(乙酸钾)和降低温度的办法除去蛋白质和多糖(在低温条件下乙酸钾与蛋白质、多糖结合成不溶物),离心除去沉淀后加乙醇沉淀水相中 DNA<sup>[2]</sup>。

十六烷基三甲基溴化铵(hexadecyl trimethyl ammonium bromide, CTAB)是一种阳离子去污剂,具有在低离子强度溶液中沉淀核酸与酸性多聚糖的特性<sup>[3]</sup>。但在高离子强度的溶液中( $>0.7 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯化钠),CTAB 只能与蛋白质、多聚糖形成复合物,不能够沉淀核酸。在 DNA 提取体系中,在高离子强度溶液条件下,CTAB 与蛋白质和多聚糖等杂质形成复合物,而核酸以游离形式存在于体系中,然后通过有机溶剂抽提,去除这些复合物形式的杂质后加入乙醇沉淀即可使核酸分离出来<sup>[4]</sup>。

阿胶中蛋白含量很高,在提取过程中需加入蛋白酶 K 来水解消化蛋白质,特别是与 DNA 结合的组蛋白。但蛋白酶 K 水解蛋白质需要适宜温度与恰当的作用时间,在 65 ℃ 时蛋白酶 K 具有最佳活性,随着作用时间的增长蛋白质水解越彻底,但水解时间过长会导致部分核酸消耗并且蛋白酶 K 不再进行水解,为了提高 DNA 提取效率,蛋白酶 K 作用的时间需进行优化。本实验拟通过优化蛋白酶 K 作用时间与调整三氯甲烷-酚抽提蛋白的步骤来提高阿胶 DNA 的提取数量与提取质量,为后续进行阿胶中动物来源分子生物学检测提供条件,同时为其他高蛋白含量产品提取 DNA 提供参考。

## 1 材料

MM-301 型研磨机(陕西环宇仪器设备有限公司),TXB622L 型电子天平(捷久计量衡器上海有限公司),rc-6plus 型落地式高速冷冻离心机(匡贝实业上海有限公司),CW-10G 型水浴循环器(上海华

邻实业有限公司),UV-2550 型紫外分光光度仪(上海析谱仪器有限公司),4001P 型电泳仪(北京六一仪器厂),ALPHA2200 型数字凝胶成像仪(杭州汇尔仪器有限公司),PCR-9700 型聚合酶链锁反应扩增仪(西安天隆科技有限公司)。

阿胶购自河北秦皇岛唐人药店,经秦皇岛进出口检验检疫局王海洋主任鉴定为马科动物驴 *Equus asinus* L. 的干燥皮或鲜皮经煎煮、浓缩制成的固体胶;十二烷基苯磺酸钠(SDS)、十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)均购自百灵威化学技术有限公司,蛋白酶 K(上海雅心生物技术有限公司),水为去离子水,试剂均为分析纯。SDS 提取缓冲液[ $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯化钠, $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 三羟甲基氨基甲烷(Tris)-盐酸, $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 乙二醇四乙酸二钠, $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  2-巯基乙醇,20% 十二烷基硫酸钠,pH 7.2],TE 缓冲液( $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  Tris-盐酸, $0.001 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  EDTA, pH 8.0),CTAB 分离缓冲液[2% CTAB, 2% PVP,  $0.15 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  乙二醇四乙酸二钠, $2.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  氯化钠, $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  Tris 碱(pH 8.0),1% 巯基乙醇,pH 8.0],CTAB 沉淀液[ $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  CTAB, $0.04 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  氯化钠,pH 8.0], $5 \times$  TBE 缓冲液[Tris 54 g, 硼酸 27.5 g, $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  EDTA 20 mL, pH 8.0,加水至 1 L],loading buffer[ $30 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  EDTA,36% 丙三醇,0.05% 二甲苯腈蓝 FF,0.05% 溴酚蓝],以上试液均为实验室自制。

## 2 方法与结果

### 2.1 阿胶 DNA 的提取

**2.1.1 SDS 法** 将阿胶在研钵中磨碎,过 200 目筛,精密称取 200 mg 至 2 mL 离心管中( $n=3$ ),加入 SDS 提取/裂解缓冲液 1 mL 和蛋白酶 K 溶液 50  $\mu\text{L}$ ,于 60 ~ 70 ℃ 温浴 0.5 ~ 2 h,必要时放置过夜,于  $10\,000 \times g$  离心 15 min,取上清;加入 1 倍量平衡酚,轻缓颠倒混匀,于  $10\,000 \times g$  离心 10 min,转移上层水相至新离心管中;加入 1 倍量酚-三氯甲烷-异戊醇(25:24:1),轻缓颠倒混匀,于  $10\,000 \times g$  离心 10 min,转移上层水相至新离心管中;加入 1 倍量三氯甲烷-异戊醇(24:1),轻缓颠倒混匀, $1\,000 \times g$  离心 10 min,转移上层水相至新离心管中;加入 0.1 倍量乙酸甲溶液和 2 倍量 96% 乙醇,充分混合, -20 ℃ 过夜,离心 15 min ( $10\,000 \times g$ , 4 ℃),倾倒上清;加入 70% 乙醇 500  $\mu\text{L}$  洗涤沉淀,离心 ( $10\,000 \sim 13\,000 \times g$ , 4 ℃) 15 min 后倾倒上清;干燥沉淀,加入无菌去离子水 100  $\mu\text{L}$  使溶解。

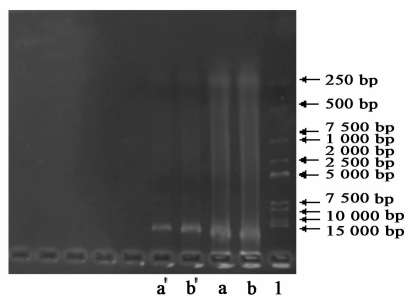
**2.1.2 CTAB 法** 将阿胶在研钵中磨碎,过 200 目

筛,精密称取 200 mg 至 2 mL 离心管中( $n = 3$ ),加入 CTAB 提取缓冲液 600  $\mu\text{L}$  和蛋白酶 K 溶液 10  $\mu\text{L}$ ;65  $^{\circ}\text{C}$  水浴加热 1 h;加入 Tris 饱和酚-三氯甲烷-异戊醇(25:24:1)400  $\mu\text{L}$ ,摇匀;于 10 000 g 离心 10 min,取上清加入 1.5 mL 离心管中;加入 2 倍量 CTAB 沉淀液,室温静置 1 h;于 10 000  $\times g$  离心 10 min 去上清,加入氯化钠水溶液 400  $\mu\text{L}$  溶解沉淀,摇匀,加入三氯甲烷 400  $\mu\text{L}$ ,摇匀;离心取上清,置于新的 1.5 mL 离心管中;加入 0.8 倍量异丙醇,摇匀,静置 1 h(可冷藏过夜);离心去上清,加入 70% 乙醇 1 mL 洗涤沉淀;离心,静置晾干,加入无菌去离子水 100  $\mu\text{L}$  使溶解<sup>[5-6]</sup>。

## 2.2 提取方法比较

### 2.2.1 凝胶电泳

称取琼脂糖粉末 0.8 g,加入 TBE 母液 40 mL,放入微波炉中加热至沸腾,取出,温度下降至约 60  $^{\circ}\text{C}$  后,倒入制胶板中(在同一个地方倾倒),10~20 min 后取出;将制好的凝胶板放入电泳槽中,到入母液浸过琼脂糖凝胶板,点入 marker 与样品;于 120 V 电压电泳 40 min,染色,漂洗,拍照并保存<sup>[7]</sup>。按上述步骤将 DNA 溶液与 loading buffer 等体积混匀,点于琼脂糖凝胶板上,放入电泳槽中,等色带到琼脂糖凝胶板的 2/3 处即可切断电源,使用溴化乙锭染色 1 min,用清水漂洗<sup>[8]</sup>,放入数字凝胶成像仪中拍照,见图 1。结果显示从阿胶中提取的 DNA 为一条带,SDS 法提取的 DNA 跑出的条带亮度大于 CTAB 法,说明 SDS 法提取阿胶 DNA 的效率高于 CTAB 法。



a, b. SDS 法提取的样品; a', b'. CTAB 法提取的样品; 1. marker

图 1 不同方法提取阿胶 DNA 的凝胶电泳

### 2.2.2 光密度及 DNA 浓度

将 SDS 法与 CTAB 法提取的 DNA 溶液分别置于 50  $\mu\text{L}$  石英比色皿中,以去离子灭菌水为空白对照,在 260 nm 处测得吸光度( $A$ )<sup>[9]</sup>分别为 0.759 9, 0.332 8( $A = 1$  相当于 0.05 双螺旋 DNA)。通过郎波-比尔光吸收定律计算样品 DNA 质量浓度依次为 0.038, 0.016  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。说明

SDS 法对阿胶 DNA 的提取量高于 CTAB 法,与凝胶电泳法的结论一致。

### 2.3 SDS 法优化

将阿胶在研钵中磨碎,过 200 目筛,精密称取 200 mg 至 2 mL 离心管中( $n = 3$ ),改变蛋白酶 K 的作用时间分别为 0.5, 1, 2, 6 h 及过夜,其他操作步骤同 2.1.1 项,每个作用时间平行 3 份,得 DNA 溶液,于 260 nm 处测定 DNA 的  $A$ ,计算 DNA 质量浓度分别为 0.016 2, 0.031 4, 0.041 5, 0.040 7, 0.040 1  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ <sup>[10]</sup>。结果表明 DNA 质量浓度在 1.5 h 前随蛋白酶 K 作用时间延长呈现增长趋势,之后出现一个平台期,故蛋白酶 K 最佳作用时间 1.5 h。在这个作用时间内,可增加摇匀次数,使阿胶充分与蛋白酶 K 接触,进而提高提取效率。

将阿胶在研钵中磨碎,过 200 目筛,精密称取 200 mg 至 2 mL 离心管中( $n = 6$ ),分为 2 组,每组 3 个平行样品,分别按优化的 SDS 法与普通 SDS 法进行处理,普通 SDS 法按 2.1.1 步骤进行,优化 SDS 法使用酚-三氯甲烷-异戊醇洗脱阿胶中蛋白质的步骤,重复 3 次便可使相间界面清洁,且使用平衡酚洗脱和使用三氯甲烷-异戊醇的洗脱步骤只需完成 1 次。提取结果分别于 230, 260, 280 nm 处测定  $A$ ,见表 1。结果表明使用优化后的 SDS 法不会过多损耗 DNA,且 DNA 纯度较普通 SDS 法高。

表 1 优化 SDS 法与普通 SDS 法提取阿胶 DNA 的吸光度比较

No.	260 nm	280 nm	230 nm	260 nm/280 nm	260 nm/230 nm
1	0.827	0.457	0.305	1.810	2.713
2	0.816	0.426	0.355	1.803	2.298
3	0.843	0.449	0.349	1.875	2.413
1'	0.796	0.658	0.786	1.209	1.012
2'	0.822	0.731	0.659	1.111	1.246
3'	0.801	0.661	0.533	1.197	1.504

纯 DNA 的  $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$  在 1.8~1.9,  $A_{260\text{ nm}}/A_{230\text{ nm}}$  应  $> 2.0$ 。如果 DNA 的  $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}} > 1.8 \sim 1.9$ ,可能 RNA 没有去除干净;如果 DNA 的  $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}} < 1.8 \sim 1.9$ ,可能含有酚或者蛋白质;若  $A_{260\text{ nm}}/A_{230\text{ nm}} < 2.0$ ,说明有残存的盐或小分子杂质污染<sup>[11]</sup>。由表 1 可知,编号 1', 2', 3' 为普通 SDS 法,管中  $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$  均  $< 1.8$ ,说明 DNA 溶液中含有酚或者蛋白质;  $A_{260\text{ nm}}/A_{230\text{ nm}}$  均  $< 2.0$ ,说明有残存的盐或小分子杂质。编号 1, 2, 3 为优化 SDS 法,管中  $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$  均在 1.8~1.9,  $A_{260\text{ nm}}/A_{230\text{ nm}}$  均  $> 2.0$ ,说明优化的 SDS 法提取 DNA 质量均达到较高标准。使用优化的 SDS 法提取阿胶中 DNA 的纯度

较原来提高了 48.3%。为了更直观地证实 SDS 法提取的阿胶 DNA 纯度,将所提取的 DNA 跑聚合酶链锁反应(PCR)扩增仪后进行琼脂糖凝胶电泳拍照,见图 2。图中 1,2,3 为应用优化的 SDS 法提取的阿胶 DNA 为模板,加入上、下游引物进行 PCR 的结果。此段 DNA 大小 482 bp,可很清晰地看到 3 条色带,说明使用优化的 SDS 法可获得高纯度的阿胶 DNA。

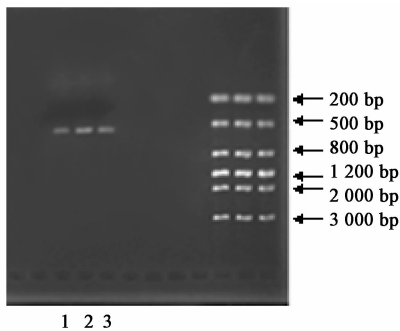


图 2 SDS 法提取的不同编号阿胶 DNA 凝胶电泳

### 3 讨论

良好的 DNA 质量和一定的 DNA 数量是使用 PCR 方法的前提。作为动物皮的加工产物,阿胶通常要经过反复煎煮、浓缩、烘干等众多工序。正是由于阿胶这种独特的炮制方式,使得细胞内物质分解<sup>[12]</sup>,加大了其 DNA 提取的难度,因此提取出一定数量和质量的 DNA 是进行阿胶中动物来源分子生物学检测的前提条件。

采用普通 CTAB 及 SDS 法提取阿胶时存在提取率低和提取纯度不高的问题。研究表明虽然 SDS 法操作步骤较 CTAB 法复杂,但可将提取过程中每一步对 DNA 的损耗降到最低,选择相同提取量的样品,SDS 法比 CTAB 法效率高。在采用 SDS 法提取 DNA 的过程中,由于提取步骤的增加,平衡酚、酚-三氯甲烷-异戊醇、三氯甲烷-异戊醇等试剂被带到样品中,导致最终的 DNA 提取物中酚类杂质的含量增大,故采用三氯甲烷-酚抽提步骤的优化,可将带入的杂质降到最低。CTAB 法去除盐和小分子杂质较为彻底,采用 CTAB 优化法提取所得 DNA 含量减少,蛋白含量反而高于普通 CTAB 法,原因可能是重复的 Tris 饱和酚和三氯甲烷异戊醇的洗涤,将 DNA 除去一部分,使得 DNA 含量降低;多一步的 Tris 饱和酚处理又为体系中增添了酚类杂质,说明优化的

CTAB 法不适用于阿胶 DNA 的提取。SDS 法较 CTAB 法在 DNA 得率上明显增加,在去蛋白和小分子杂质方面亦优于后者,通过改进 SDS 法步骤中有有机溶剂的洗脱次数,提高了阿胶中 DNA 提取的浓度和质量,可控制使用酚类有机溶剂对样品的洗脱次数,使得蛋白类杂质去除较为干净,而又不使溶剂本身给系统中带来新的杂质。本文建立了一种优化的阿胶 DNA 提取方法,对市售阿胶均有较好的提取效果,是进行中药分子学鉴定的一个有效前提,可为阿胶后续的动物种类来源检测提供参考。

### [参考文献]

[1] 司笑慧. 阿胶的真假鉴别[J]. 中国医学研究与临床, 2003,1(6):63.

[2] 陈士林,苏钢强,邹健强,等. 中国中药资源可持续发展体系构建[J]. 中国中药杂志,2005,39(15):1141.

[3] Stein N, Herren G, Keller B. A new DNA extraction method for high-throughput marker analysis in a large-genome species such as *Triticum aestivum* [J]. Plant Breeding,2001,120(4):354.

[4] 李永明,赵玉琪. 实用分子生物学方法手册[M]. 北京:科学出版社,1998:173.

[5] 饶刚,李明,王静,等. 陈旧皮张中 DNA 提取的新方法[J]. 动物学杂志,2001,36(4):53.

[6] 史燕,吴孝兵,赵哲,等. 扬子鳄鞣制皮革和鳞片的 DNA 提取方法[J]. 动物学报,2004,50(2):297.

[7] 刘向华,王义权,刘忠权,等. 中药材蛇胆的 DNA 分子标记鉴定研究[J]. 药学学报,2001,36(3):229.

[8] Calvo J H, Zaragoza P, Osta R. Technical note: A quick and more sensitive method to identify pork in processed and unprocessed food by PCR amplification of a new specific DNA fragment [J]. J Anim Sci, 2001, 79(8):2108.

[9] Chen S L, Yao H, Han J P, et al. Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species[J]. PloS One, 2010,5(1):e8613.

[10] 陈颖,吴亚君,徐宝梁,等. 食品及饲料中马属动物源性成分的 PCR 检测研究[J]. 中国生物工程杂志, 2004,24(5):78.

[11] 肖培根. 新编中药志. 第 2 卷[M]. 北京:化学工业出版社,2002:435.

[12] 雷初朝,陈宏,杨公社,等. 中国驴种线粒体 DNA D-loop 多态性研究[J]. 遗传学报,2005,32(5):481.

[责任编辑 刘德文]