

含当归中成药的 DNA 提取及其分子鉴定

苟惠¹, 王译伟², 郑茜¹, 王钦¹, 张春^{1*}

(1. 西南医科大学药学院, 四川 泸州 646000; 2. 西南医科大学基础医学院, 四川 泸州 646000)

[摘要] 目的:优化含当归中成药的 DNA 提取方法,并利用叶绿体 *trnL-F* 基因及当归特异分子标记对当归中成药进行鉴定。方法:采用传统十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)法,十二烷基磺酸钠(SDS)法,磁珠法以及改良 CTAB 法对 10 种含有当归成分的中成药进行 DNA 提取,利用微量紫外分光光度法、琼脂糖凝胶电泳检测所得总 DNA 的完整性、纯度和浓度。对 10 份当归中成药的 *trnL-F* 序列进行扩增、测序,对序列进行比对分析并构建系统发育树。利用当归特异鉴别分子标记对 10 种当归中成药中的当归成分进行分子鉴别。结果:利用改良 CTAB 法获得了纯度较高,质量较好的 DNA。10 种中成药中当归的 *trnL-F* 序列与正品当归序列相似度为 99.88% ~ 100%,系统发育树显示 10 份中成药中的当归与正品当归聚为一类。利用当归特异性鉴别分子标记进行验证,10 种中成药 DNA 样品均能得到明亮的扩增条带。结论:改良 CTAB 法可以有效提取当归中成药中的基因组 DNA。利用 *trnL-F* 序列和当归特异性鉴别分子标记,成功对 10 份市售当归中成药进行了分子鉴别,为当归类中成药的分子鉴定奠定了基础。

[关键词] 当归中成药; DNA 提取方法; 叶绿体 *trnL-F* 序列; 特异性鉴别分子标记; 分子鉴定

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)01-0044-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2018010044

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170926.1132.068.html>

[网络出版时间] 2017-09-26 11:32

DNA Extraction and Molecular Identification in Angelicae Sinensis Radix Preparations

GOU Hui¹, WANG Yi-wei², ZHENG Xi¹, WANG Qin¹, ZHANG Chun^{1*}

(1. College of Pharmacy, Southwest Medical University, Luzhou 646000, China;

2. College of Preclinical Medicine, Southwest Medical University, Luzhou 646000, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize the DNA extraction method and molecular identification of Angelicae Sinensis Radix preparations by analyzing *trnL-F* sequences and using the Angelicae Sinensis Radix specific marker. **Method:** DNA was extracted by the traditional cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) method, sodium dodecylsulphate (SDS) method, paramagnetic particle method and modified CTAB method from 10 kinds of Angelicae Sinensis Radix preparations. The integrity, purity, and concentration of the total genomic DNA yielded by the four methods were detected by ultraviolet spectrophotometry and agarose gel electrophoresis. The plastid *trnL-F* of 10 samples were amplified, sequenced and analyzed, and the phylogenetic trees were constructed. The DNA samples were also applied for molecular identification with Angelicae Sinensis Radix specific marker. **Result:** The modified CTAB method was found to yield relatively pure and high quality DNA from the 10 kinds of Angelicae Sinensis Radix preparations. The similarity of 10 samples and Angelicae Sinensis Radix ranged from 99.88% to 100%. Phylogenetic tree based on *trnL-F* sequences showed that 10 samples and Angelicae Sinensis Radix were clustered as one category. The clear and bright amplified band was obtained for all 10 samples in the verification by

[收稿日期] 20170523(018)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81001700);四川省科技厅应用基础计划项目(2012JY0081);四川省科技厅项目(14JC0137);四川省卫生厅科研项目(120385)

[第一作者] 苟惠,在读硕士,从事药物化学研究工作,Tel:15183025552,E-mail:346875535@qq.com

[通信作者] *张春,博士,教授,从事分子生药学,药用植物资源与利用等研究工作,Tel:15196088137,E-mail:zc83good@126.com

Angelicae Sinensis Radix specific molecular marker. **Conclusion:** The genomic DNA in Angelicae Sinensis Radix preparations could be successfully extracted by the modified CTAB method. The *A. sinensis* were successfully identified by the *trnL-F* sequences and the Angelicae Sinensis Radix specific molecular marker, with great importance in the molecular identification and quality control in Angelicae Sinensis Radix preparations.

[**Key words**] Angelicae Sinensis Radix preparations; DNA extraction methods; chloroplast *trnL-F* region; specific molecular marker; molecular identification

当归性温,味甘、辛,归肝、心、脾经;其临床疗效显著,在妇科用药中发挥着重要的作用^[1]。由于其市场需求量大、人工培育周期长,导致市场供需矛盾日益明显,当归混伪品、替代品的状况层出不穷,严重影响其用药安全。中成药为当归的重要临床应用形式,由于中成药的组成复杂,其质量控制难度更大,中成药的造假、掺假现象也更为严重。在制剂过程中,基原药物化学成分发生了改变,形态学特征多数也已经丢失,利用传统鉴别方法对基源相近的混伪品种鉴别困难,对中成药原料药材的准确鉴定更是无能为力^[2]。为全面根本地控制当归中成药的质量,迫切需要建立新方法用于中成药原料药材的鉴别。

DNA 分子鉴定技术具有快速、微量、特异性强等特点,在中药材鉴别中应用广泛^[2-4]。前人对当归的分子鉴别,多用到基于 PCR 反应的 ISSR, RAPD 等分子标记技术^[3-4]和基于核基因序列的 DNA 条形码鉴别技术^[5],罗沛宜等^[6]研究表明叶绿体 *trnL-F* 序列能较好反应当归及其混伪品药材间的差别。这些当归分子鉴别,均是对当归药材或饮片的鉴别,对含当归的中成药原料药材的分子鉴定未见报道。中成药中原药材的基因组在加工过程中,其 DNA 多数遭到破坏,制剂中多种辅料如矫味剂、防腐剂等也会对 DNA 的提取以及后续的鉴定过程造成一定的影

响。目前对中成药 DNA 提取实验的报道较少,总体上讲,固体剂型的中成药多采用 CTAB, SDS, 磁珠试剂盒, PTB 法等,液体剂型多采用乙醇沉淀等方法。但这些方法仅对于研究的少数药材具有可行性^[7-8]。如何快速有效地提取出当归中成药高质量的 DNA, 成为其中成药分子鉴定应用的关键问题^[2]。

本实验利用当归新鲜叶片为对照材料,对目前市场中常见的含当归成分的 10 种中成药,进行不同 DNA 提取方法的比较,试图探索出一种适合当归中成药基因组提取的快速有效的方法。本实验基于前期文献报道上,对传统方法加以改进,并和商业化试剂盒相结合,成功地提取各种当归中成药制剂中的 DNA,其 DNA 含量虽然很低,但纯度较高,能满足后续分子鉴定实验的需求。此外,笔者将各种当归制剂中的叶绿体 *trnL-F* 序列进行克隆、测序和序列分析,联合当归特异鉴别分子标记,成功对中成药中当归进行了分子鉴别。

1 材料与方法

1.1 药材 根据目前市场上含当归成分的中成药常用剂型,选取了 10 种中成药(表 1),以岷县当归的新鲜干燥叶片为对照,正品当归经西南医科大学药学院生药教研室庄元春副教授鉴定为伞形科植物当归 *Angelica sinensis* 的干燥根。

表 1 常用当归制剂

Table 1 Common Angelicae Sinensis Radix preparations

No.	药名	剂型	生产厂家	缩写	批号
1	补中益气丸	浓缩丸	芜湖张恒春药业有限公司	BZYQP	Z34020127
2	归脾丸	浓缩丸	陕西天洋制药有限责任公司	GPP	Z61020724
3	当归片	糖衣片	太极集团四川绵阳制药有限责任公司	DGT	Z20055222
4	妇科调经片	薄膜衣片	株洲千金药业股份有限公司	FKTJT	Z20033189
5	八珍益母片	薄膜衣片	株洲千金药业股份有限公司	BZYMT	Z20083305
6	安阳精制膏	膏贴剂	安阳中智药业有限责任公司	AYJZP	Z41020550
7	产妇康颗粒	颗粒剂	深圳三顺制药有限公司	CFKG	Z20003385
8	活血止痛散	散剂	北京同仁堂股份有限公司同仁堂制药厂	HXZTP	Z11020463
9	独活寄生合剂	合剂	重庆希尔安药业有限公司	DHJSM	Z10983003
10	血府逐瘀胶囊	胶囊	天津宏仁堂药业有限公司	XFZYC	Z12020223
11	岷县当归	新鲜叶片	-	ASIN	对照药材

1.2 仪器与试剂 ND-2000型微量紫外-可见分光光度计(美国Nano-Drop公司),GelDoc 2000型凝胶成像系统(美国Bio-Rad公司),System 9700型PCR仪(美国GeneAmp公司),DYY-4C型电泳仪(北京六一仪器),DYCP-31CN型电泳槽(北京六一仪器),Milli-Q Reference系列纯水机(美国Millipore公司)。

CTAB,1×TAE缓冲液,琼脂糖(Promega),三氯甲烷,异戊醇,无水乙醇,异丙醇,甲醇,十二烷基硫酸钠(SDS),β-巯基乙醇,聚乙烯吡咯烷酮(PVP-40)均为国产分析纯;植物基因组DNA提取试剂盒(北京天根生化科技有限公司,批号分别为N2723,O3825,P5021);琼脂糖凝胶回收试剂盒(北京天根生化科技有限公司,批号分别为H7126);磁珠法植物基因组DNA提取试剂盒(洛阳惠尔纳米科技有限公司,批号140710);PCR/DNA纯化试剂盒(上海碧云天生物科技有限公司,批号分别为P4321,P4125);Ex Taq酶,dNTPs,DNA Marker 2000,核酸染料Goldview(Solarbio公司,批号为20120921);引物由上海生物工程技术服务有限公司合成。

1.3 DNA提取与检测 传统CTAB法提取DNA:根据不同中成药剂型取材,片剂、丸剂、散剂取药品2g研磨,膏贴剂用小刀刮取药品2g,胶囊剂去除胶囊外壳称取药品2g,合剂采用移液器取药品500 μL。加入预热的2×CTAB缓冲液^[9] 2.5 mL,β-巯基乙醇100 μL,65℃水浴1 h,8 000 r·min⁻¹离心5 min取上清,加入等体积三氯甲烷-异戊醇(24:1),充分混匀。12 000 r·min⁻¹离心15 min,取上清液,缓慢加入1倍体积预冷的异丙醇沉淀30 min,用70%乙醇以及无水乙醇洗涤沉淀,利用PCR/DNA纯化试剂盒,对获得的DNA沉淀进行进一步纯化。样品保存于-20℃备用。

SDS法提取DNA:各样品取样同传统CTAB法,加入SDS提取液^[10] 2.5 mL,NaCl 0.5 mol·L⁻¹,EDTA(pH 8.0)50 mmol·L⁻¹混匀,65℃水浴30 min,12 000 r·min⁻¹离心10 min取上清,加入2/3体积的NaAc(pH 4.8)2.5 mol·L⁻¹,静置20 min。取上清加0.7倍体积的异丙醇沉淀30 min,12 000 r·min⁻¹离心5 min,收集沉淀,用70%乙醇以及无水乙醇洗涤,利用PCR/DNA纯化试剂盒,对获得的DNA沉淀进行进一步纯化。样品保存于-20℃备用。

磁珠法提取DNA:各样品取样同传统CTAB

法,参照洛阳惠尔纳米科技有限公司植物基因组DNA提取试剂盒操作说明书提取,样品保存于-20℃。

改良CTAB法提取DNA:各样品取样加大到10 g,合剂吸取5 mL,利用50 mL离心管进行操作。加入预热的2×CTAB缓冲液12.5 mL,β-巯基乙醇500 μL,65℃预热1 h,8 000 r·min⁻¹离心5 min,取上清液加70%甲醇25 mL,-20℃沉淀1 h,8 000 r·min⁻¹离心5 min,取沉淀转移到15 mL离心管中。加入预热的2×CTAB提取缓冲液2.5 mL及β-巯基乙醇50 μL,置于65℃水浴30 min,期间常震荡,随后加等体积三氯甲烷-异戊醇(24:1)充分混匀,12 000 r·min⁻¹离心15 min;取上清液加等体积-20℃预冷的异丙醇沉淀1 h,12 000 r·min⁻¹离心10 min,取沉淀,加入植物基因组DNA提取试剂盒中的GP2试液重新溶解沉淀,加入植物基因组DNA提取试剂盒中的GP2试液重新溶解沉淀,依照该试剂盒操作步骤,利用离心柱法,进一步纯化DNA。利用PCR/DNA纯化试剂盒对部分样品进行再次纯化。样品保存于-20℃备用。

以上4种方法提取的样品,通过1%凝胶电泳,全自动凝胶成像系统分析DNA的完整性。微量紫外-可见分光光度计测定其浓度和纯度,计算 $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$,所有样品测定3次。

1.4 叶绿体trnL-F基因扩增、克隆与测序 扩增叶绿体trnL-F基因,利用通用引物序列^[6]上游5'-CGAAATCGGTAGACGCTACG-3'和下游5'-ATTTGAACTGGTGACACGAG-3'对11份样品进行PCR分析,PCR反应总体积25 μL,包括10×反应缓冲液2.5 μL,MgCl₂1.5 mmol·L⁻¹,dNTP 200 μmol·L⁻¹,引物1 μmol·L⁻¹,DNA模板20 ng,Ex Taq酶0.5 U。PCR反应程序为94℃预变性5 min;94℃变性50 s,53℃退火50 s,72℃延伸2 min,35个循环;72℃后延伸8 min,10℃保存,PCR产物用1.0%琼脂糖凝胶电泳检测。用琼脂糖凝胶回收试剂盒进行割胶回收。以pMD18-T为载体进行连接,以DH10B作为宿主菌,对目的片段进行克隆。每份材料选取3~8个阳性克隆用于DNA序列测序。序列测定由北京梓熙生物技术有限公司完成。所有序列均进行双向测序。

1.5 当归特异性鉴别标记的检测 利用本课题组前期基于ISSR分子标记开发的当归特异性鉴别SCAR标记引物^[11] U-上游5'-ACCCATTTGTA AACATAGCC-3'和U-下游5'-CAGATTCTCCTTC

CACCC-3', 对样品进行扩增。PCR 反应体系与扩增 *trnL-F* 基因相同, 扩增程序为 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 40 s, 56 °C 退火 40 s, 72 °C 延伸 1 min, 35 个循环; 72 °C 后延伸 8 min, 10 °C 保存。如第 1 轮扩增没有结果, 则利用第 1 轮 PCR 扩增产物为模板, 继续进行第 2 轮扩增。PCR 产物用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.6 DNA 序列数据处理及分析 *trnL-F* 序列的边界划定和序列拼接参照 NCBI 上登录当归序列, Genbank 号为 KP665033。根据文献报道的系统发育关系^[6], 将亲缘关系与当归接近的牛尾独活 (*Heracleum hemisleyanum*) 和阿坝当归 (*A. apaensis*) 一起分析, 利用紫花鸭跖柴胡 (*Bupleurum commelynoideum*) 作为外类群。利用 Clustal W 软件进行对位排列后再进行手工校正。变异位点采用 PAUP * 4.0B10 软件包完成。采用最大简约法 (maximum parsimony, MP) 构建系统发育树。使用 PAUP * 4.0B10 软件包完成。最大简约法分析采用启发式搜索 (Heuristic), 分支交换算法采用树对分重接 (tree bisection-reconnection, TBR) 法, 100 次

随机添加替代。所有空位 (gap) 作为缺失处理, 每个特征值作为等权处理。系统发育树拓扑结构的可靠性用 1 000 次重复抽样 (replicates) 的自展分析 (bootstrap, BS) 来检验。

2 结果与分析

2.1 DNA 提取方法的比较 1% 琼脂糖凝胶电泳结果显示, 传统 CTAB 法, SDS 法, 磁珠法以及改良 CTAB 法提取的 DNA 样品, 除对照样品岷县当归外, 中成药样本均未见到明显的 DNA 条带, 提示基因组 DNA 提取并未成功或无法达到凝胶成像检测的最低浓度。利用微量紫外分光光度计检测, 除对照材料外, 传统 CTAB 法, SDS 法和磁珠法仅有少量样品获得微量的 DNA (表 2), 且提取出的 DNA 均含有大量色素以及黏性物质, 其 $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ 远低于 1.6, 存在大量有机物或多糖等杂质污染。改良 CTAB 法, 能提取出各样品的 DNA, 部分样品 DNA 能达到 $10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 以上。2, 4 号样品 $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ 略小于 1.6, 证明有少量有机物或蛋白质等杂质的污染。其余样品 $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ 均在 1.6 ~ 1.8, 说明 DNA 纯度较高。

表 2 不同提取方法对各样品 DNA 的提取效果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

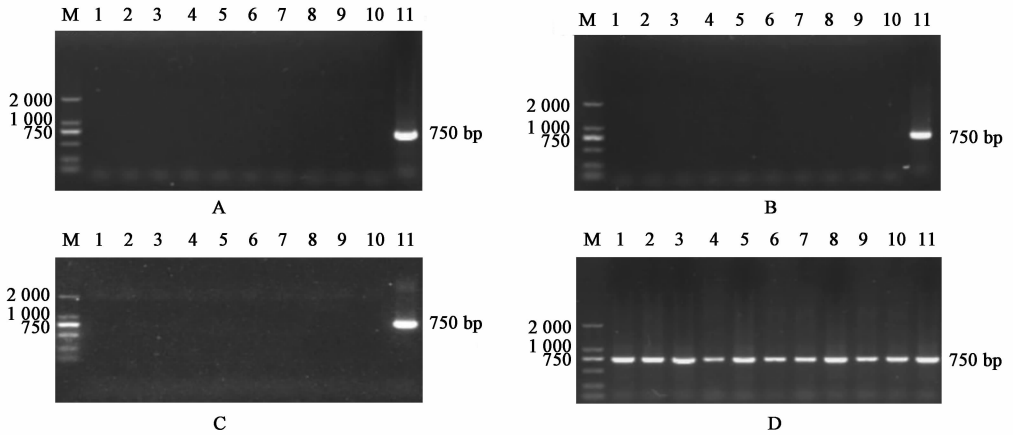
Table 2 Effect of genomic DNA extracted by different methods ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

No.	传统 CTAB 法		SDS 法		磁珠法		改良 CTAB 法	
	DNA 质量浓度 / $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	$A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$	DNA 质量浓度 / $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	$A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$	DNA 质量浓度 / $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	$A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$	DNA 质量浓度 / $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	$A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$
1	1.51 ± 0.08	1.20 ± 0.03	-	-	0.89 ± 0.02	1.20 ± 0.06	17.90 ± 1.8	1.85 ± 0.03
2	-	-	-	-	0.43 ± 0.01	0.90 ± 0.02	5.89 ± 0.7	1.42 ± 0.03
3	0.31 ± 0.01	1.05 ± 0.04	0.06 ± 0.005	1.09 ± 0.01	0.13 ± 0.01	1.50 ± 0.08	12.79 ± 1.3	1.68 ± 0.70
4	-	-	-	-	-	-	6.97 ± 1.0	1.32 ± 0.05
5	-	-	-	-	0.03 ± 0.001	-	9.32 ± 1.2	1.61 ± 0.09
6	0.15 ± 0.05	1.12 ± 0.06	-	-	1.01 ± 0.01	1.31 ± 0.05	15.33 ± 1.4	1.73 ± 0.07
7	-	-	-	-	0.02 ± 0.005	-	13.26 ± 1.1	1.78 ± 0.02
8	0.32 ± 0.02	0.09 ± 0.003	0.98 ± 0.03	1.13 ± 0.03	0.56 ± 0.001	-	9.67 ± 0.9	1.81 ± 0.03
9	-	-	-	-	0.63 ± 0.06	1.11 ± 0.02	5.23 ± 0.7	1.80 ± 0.02
10	0.21 ± 0.01	1.34 ± 0.03	-	-	1.13 ± 0.2	1.52 ± 0.04	10.53 ± 1.2	1.69 ± 0.08
11	59.32 ± 4.7	1.82 ± 0.07	34.67 ± 3.7	1.98 ± 0.02	18.99 ± 2.3	1.78 ± 0.04	65.89 ± 3.8	1.68 ± 0.02

注: “-”表示未检测到。

2.2 *trnL-F* 序列对当归中成药的分子鉴定 利用 *trnL-F* 序列引物对不同方法提取的中成药样品进行 PCR 扩增, 结果表明, 除对照样品外, 传统 CTAB 法, SDS 法和磁珠法均未发现扩增条带。利用改良 CTAB 法提取的 10 份中成药样品 DNA, 经过第 1 轮 PCR 便成功扩增出了 *trnL-F* 基因片段 (大小约为 750 bp) (图 1), 说明该方法提取的样品 DNA 能够

满足普通 PCR 反应的要求。为进一步分析含当归中成药中当归成分的真伪, 将各样品中当归 *trnL-F* 基因进行克隆测序并进行序列分析。10 份材料的 *trnL-F* 序列与 NCBI 上登陆的正品当归序列 (Genbank 号为 KP665033) 进行比对, 除八珍益母片、妇科调经片、血府逐瘀胶囊和活血止痛散这几份材料中的 *trnL-F* 序列与正品当归的序列相似度



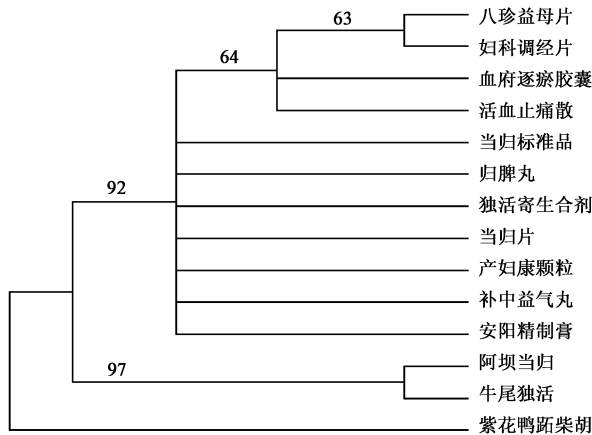
M. Marker; 1~11. 样品; A. 传统 CTAB 法提取样品; B. SDS 法提取样品; C. 磁珠法提取样品; D. 改良 CTAB 法提取样品 (图 3 同)

图 1 *trnL-F* 序列的 PCR 扩增

Fig. 1 PCR amplification results of *trnL-F* sequences

(identity) 为 99.88% (仅有一个碱基的区别) 外, 其余样品与正品当归序列相似度均为 100%。10 份样品与正品当归、牛尾独活、紫花鸭跖柴胡和阿坝当归一起进行聚类分析, *trnL-F* 序列全长变化范围为 686~716 bp。当空位作为缺失处理时, *trnL-F* 序列的信息位点数为 9 个, 占总位点数的 1.25%。

基于 *trnL-F* 序列构建系统发育树 (图 2), 其树长 (tree length) = 62, 一致性指数 (Consistency index, CI) = 1.000 0, 保持性指数 (Retention index, RI) = 1.000 0。10 份中成药材料中的当归与正品当归聚类在一起, 支持率较高 (BS = 92%)。其中八珍益母片、妇科调经片、血府逐瘀胶囊和活血止痛散中的当归聚在一小类 (BS = 64%)。阿坝当归与牛尾独活聚为一类 (BS = 97%), 紫花鸭跖柴胡位于树基部。



分支上数字为自展值 (>50%)

图 2 中成药中当归 *trnL-F* 序列的多数一致树状关系

Fig. 2 Majority-rule MP tree inferred from *trnL-F* sequences of *Angelicae Sinensis Radix* from *Angelicae Sinensis Radix* preparations

2.3 利用当归特异鉴别标记对当归中成药的分子鉴定 利用当归特异鉴别 SCAR 标记引物, 分别对 4 种方法提取的中成药 DNA 进行扩增。结果发现, 仅采用改良 CTAB 法提取的 DNA 样品, 在经过 2 轮 PCR 扩增, 获得了扩增条带。10 份中成药样品获得与对照样品大小相同的扩增条带, 该条带为当归特异性鉴别条带 (大小约为 890 bp, 图 3)。

3 讨论

3.1 含当归中成药的 DNA 提取方法的比较 中成药在其加工过程中, 其 DNA 遭到不同程度的破坏, 大多数已被降解^[12], 此外, 加工过程中添加的辅料大多为淀粉, 多糖类物质, 增加了 DNA 提取过程中的困难。目前, 有少数报道对中成药中 DNA 提取方法进行改进, 但因药材种类和剂型的不同, 目前没有通用的方法^[13]。传统 CTAB 法能较好地去除多糖类物质^[14], 因此被用于大多数中药材 DNA 提取的方法。而 SDS 法被认为能较好提取三七样品的 DNA^[15]。磁珠法分离纯化 DNA 利用了亲和吸附的原理, 使得操作步骤简便, 分离 DNA 纯度高等优点, 因此也常用于微量高纯度 DNA 的提取^[16]。本实验利用上述 3 种方法对 10 种当归中成药进行 DNA 的提取, 仅有少量样品获得微量的 DNA, 但因这些获得的 DNA 中含有大量杂质的污染, 如色素、复杂多糖、胶原质、金属离子等物质抑制了 PCR 反应, 无法继续进行后续分子鉴定。程春松等^[8]研究表明, 中成药中所含的淀粉辅料与 CTAB 在加热条件下反应生成高极性富含正电荷的复合物, 该物质极性较大, 介于水和乙醇之间, 且不能与乙醇和异丙醇互溶, 因而, 在乙醇和异丙醇沉淀 DNA 时, 发生分层现象, 从而影响 DNA 的沉淀效果, 这是传统 CTAB 法无法获

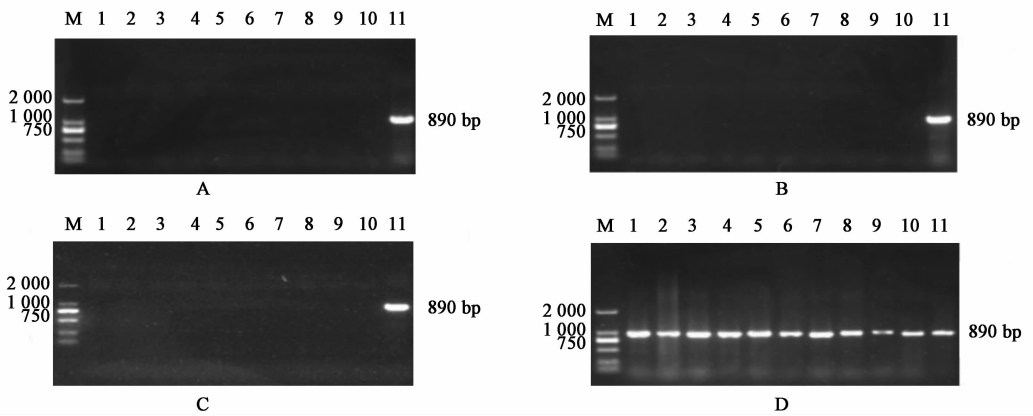


图 3 当归特异性鉴别标记对 10 份样品的分子鉴定

Fig. 3 Ten samples were identified by *Angelicae Sinensis Radix* specific molecular marker

得中成药样品 DNA 的关键原因,而采用甲醇处理则能有效去除这种复合物的影响^[8]。因此,本研究利用改良 CTAB 法提取当归中成药 DNA,在第一步 CTAB 裂解后,加入甲醇,有效去除成药制剂中的 CTAB 淀粉复合物,将沉淀再次加入 CTAB,此时大大减少了极性较大的 CTAB 淀粉复合物对后续异丙醇沉淀 DNA 的影响。此外,将材料用量增加,在异丙醇沉淀后,结合离心柱法,对 DNA 样品进行富集,起到了浓缩 DNA 和纯化的效果,从而获得了较好质量的 DNA。样品 2 号和 4 号的纯度稍差,因此笔者试图利用 PCR/DNA 纯化试剂盒进行再次纯化。但因提取的 DNA 量太少,纯化过程中有 DNA 的损失,因而没有获得足量 DNA 以进行后续的扩增反应。未经进一步纯化的 2 号和 4 号样品,利用叶绿体基因 *trnL-F* 检测,同样能检测到 PCR 扩增条带,说明能满足后续分子鉴别所需。

3.2 含当归中成药的 DNA 分子鉴定 DNA 条形码鉴定技术是目前生药鉴定研究的热点,该方法对于缺乏遗传背景信息的中药材样品具有较好的鉴别能力^[17]。叶绿体基因多为单拷贝,在大多数被子植物中是母系遗传,与核基因序列相比,不受网状进化的影响。在中药材鉴别中,通常用到药材的加工品或饮片,其基因组 DNA 已遭到不同程度的破坏,而叶绿体基因组则相对于核基因组易于保留,其基因片段更容易扩增。CHEN 等^[18]认为核基因中的 ITS2 序列结合叶绿体基因 *psbA-trnH* 在植物中具有较高鉴别效率。*trnL-F* 序列较适用于当归及其混伪物种的鉴别^[6]。本研究通过改良 CTAB 法获得中成药 DNA 量很少,但容易将 *trnL-F* 序列进行扩增,也说明了叶绿体基因组容易保留。根据克隆测序的方式,通过序列的同源比对确认了中成药中当归的

序列。系统发育树状关系结果表明,10 份中成药中的当归聚类在一起,并且具有很高的自展支持率,说明 10 份中成药中的当归均为正品。其中来自于株洲千金药业股份有限公司的八珍益母片和妇科调经片中的当归聚在一个小支中,表明其中的当归原料药材和其他中成药中的当归原料药材存在遗传差异,可能由于当归的产地不同或是种质的变异而导致该遗传差异。为进一步鉴别 10 份中成药中当归样品的真伪,本研究利用前期研究开发的当归特异性鉴别 SCAR 标记,对 10 份市售中成药进行分析,PCR 结果表明,10 份制剂样品均能扩增出正品当归的特异性条带,证明 10 份中成药中用到的当归原料药材均为正品。

随着 2015 年版《中国药典》中药材 DNA 条形码分子鉴定法指导原则的建立,将会有越来越多的中药材 DNA 分子鉴定方法被收入《中国药典》,中成药的鉴定因中成药本身组成复杂、品种繁多、制剂不同、辅料添加等原因存在,增加了其分子鉴定的难度。本研究提供的当归中成药 DNA 提取方法步骤简便、耗时较少,完全能满足后续基因扩增和分子鉴定所需。且利用该 DNA 为模板,采用叶绿体基因 *trnL-F* 序列和当归特异鉴别标记,成功的对 10 份中成药中当归原料药材进行了鉴别,为建立和完善当归中成药的质量控制、评价标准奠定了实验基础。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 133-134.
[2] 陈蓉, 吴成丽, 邓赞, 等. DNA 分子鉴定技术在中成药真伪性鉴别中的应用与研究进展 [J]. 中药与临床, 2016, 7(2): 83-86.
[3] 张春, 朱焯, 何颖, 等. 基于内部简单重复序列 (ISSR)

- 分析的当归分子鉴定[J]. 中国药学杂志, 2014, 49(10):812-816.
- [4] ZHANG C, MEI Z, CHENG J, et al. Development of SCAR markers based on improved RAPD amplification fragments and molecular cloning for authentication of herbal medicines *Angelica sinensis*, *Angelica acutiloba* and *Levisticum officinale* [J]. Nat Prod Communicat, 2015, 10(10):1743-1747.
- [5] 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.
- [6] 罗沛宜, 庄元春, 张春, 等. 基于叶绿体 *trnL-F* 和 *rpoC1* 序列对当归及其混伪品的分子鉴定研究[J]. 中国药学杂志, 2015, 50(10):840-845.
- [7] 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 Genetics, 2012, 8(4):e1002657.
- [8] 陈春松, 谭天琪, 龙泽, 等. 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[J]. 中草药, 2015, 46(17):2549-2555.
- [9] Doyle J. Isolation of plant DNA from fresh tissue [J]. Focus, 1990, 12:13-15.
- [10] Edwards K, Johnstone C, Thompson C, et al. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis [J]. Nucleic Acids Res, 1991, 19(6):1349-1349.
- [11] 张春, 王钦, 罗波, 等. 一种当归 SCAR 分子标记及其鉴定方法和特异性引物对: 中国, 201510104132.3 [P]. 2015.
- [12] 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.
- [13] CHEN R, DONG J, CUI X, et al. DNA based identification of medicinal materials in Chinese patent medicines [J]. Sci Rept, 2012, 2(3):367-379.
- [14] 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.
- [15] 陈莉, 魏莉, 周童, 等. 几种中药 DNA 提取方法的比较研究[J]. 广西植物, 2007, 27(1):137-139.
- [16] 田晓轩, 刘杰, 窦永杰, 等. 中成药大黄蛰虫丸的宏条形码基原鉴定 [J]. 天津中医药, 2014, 31(4):234-237.
- [17] 陈士林, 郭宝林, 张贵君, 等. 中药鉴定学新技术新方法研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2012, 37(8):1043-1055.
- [18] CHEN S L, PANG X H, SONG J Y, et al. A renaissance in herbal medicine identification-n: from morphology to DNA [J]. Biotechnol Adv, 2014, 7:1237-1244.

[责任编辑 顾雪竹]