

哈蟆油药材基因组 DNA 提取方法的比较

刘建辉¹, 石林春^{2*}, 唐先明^{1*}, 王洋¹, 王姝¹

(1. 哈尔滨市食品药品检验检测中心, 哈尔滨 150525;

2. 中国医学科学院·北京协和医学院 药用植物研究所, 北京 100193)

[摘要] **目的:**建立一种适合于哈蟆油药材基因组 DNA 的提取方法,为该药材的后续分子鉴定奠定基础。**方法:**采用十二烷基硫酸钠(SDS)法,改良 SDS 法,Chelex-100 法,异硫氰胍(GuSCN)法,试剂盒法及改良试剂盒法提取哈蟆油基因组 DNA,利用琼脂糖凝胶电泳、紫外分光光度法及细胞色素 C 氧化酶 I (CO I) 序列的引物聚合酶链式反应(PCR)扩增对 DNA 产量及质量进行检测。**结果:**Chelex-100 法,改良 SDS 法,GuSCN 法及改良试剂盒法均能从哈蟆油药材中提取得到基因组 DNA,SDS 法和试剂盒法提取不到。其中改良 SDS 法得到的 DNA 质量良好,得率高,但操作繁琐;改良试剂盒方法得到的 DNA 质量较好,但得率低,成本高;Chelex-100 法操作简单快速、得率高,但得到的 DNA 质量较差;GuSCN 法提取的 DNA 含有较多杂质,会抑制 PCR 反应。**结论:**Chelex-100 法、改良 SDS 法及改良试剂盒法均可得到满足 PCR 扩增要求的 DNA,实践中可根据条件选择适宜方法来提取哈蟆油基因组 DNA。

[关键词] 哈蟆油; 基因组 DNA; 提取方法; 改良十二烷基硫酸钠法; 异硫氰胍; Chelex-100; 聚合酶链式反应

[中图分类号] R283.6;Q78;R284;TQ151.7 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)04-0027-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2018040027

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20171127.0904.020.html>

[网络出版时间] 2017-11-27 9:04

Comparison of Genomic DNA Extraction Methods for *Ranae Oviductus*

LIU Jian-hui¹, SHI Lin-chun^{2*}, TANG Xian-ming^{1*}, WANG Yang¹, WANG Shu¹

(1. Harbin Food and Drug Inspection Center, Harbin 150525, China; 2. Institute of Medicinal Plant

Development, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100193, China)

[Abstract] **Objective:** To explore a extracting method of genomic DNA from *Ranae Oviductus* and lie a foundation for further molecular experiments of this medicinal herb. **Method:** Sodium dodecyl sulfate (SDS) method, improved SDS method, Chelex-100 method, guanidine thiocyanate (GuSCN) method, kit method and improved kit method were used to extract genomic DNA from *Ranae Oviductus*. The yield and quality of genomic DNA were evaluated by agarose gel electrophoresis, ultraviolet spectrophotometry and polymerase chain reaction (PCR) amplification of primer with cytochrome C oxidase I (CO I) sequence. **Result:** Chelex-100 method, improved SDS method, GuSCN method and improved kit method could extract genomic DNA from *Ranae Oviductus*, while its yields of SDS method and kit method were little. The quality and yield of genomic DNA extracted by improved SDS method were high with complex operation. The improved kit method cost too much and the yield of DNA was low. The Chelex-100 method was easy to operate and cost less time, but the quality of DNA was poor. DNA extracted by GuSCN method contained many PCR inhibitors. **Conclusion:** The genomic DNA extacted by Chelex-100 method, improved SDS method and improved kit method all can meet the demands of PCR amplification, suitable method can be selected to extract genomic DNA from *Ranae Oviductus* according to the

[收稿日期] 20170809(004)

[第一作者] 刘建辉,高级工程师,从事食品药品检验技术与质量控制研究,Tel:0451-82472003,E-mail:liujh100200300@sina.com

[通信作者] *唐先明,硕士,副主任药师,从事中药分子鉴定研究,Tel:0451-82472037,E-mail:15945169873@163.com;

*石林春,博士,副研究员,从事中药鉴定学研究,Tel:010-57833206,E-mail:lcs@implad.ac.cn

actual conditions of the laboratory.

[**Key words**] *Ranae Oviductus*; genomic DNA; extraction methods; improved sodium dodecyl sulfate method; guanidine thiocyanate; Chelex-100; polymerase chain reaction

哈蟆油为蛙科动物中国林蛙雌蛙的输卵管,经采制干燥而得。其主要分布于黑龙江、吉林、辽宁、内蒙古等省^[1],具有补肾益精、养阴润肺的作用,临床用于治疗阴虚体弱、神疲乏力、心悸失眠、盗汗不止、癆嗽咳血^[2]。哈蟆油具有较高的经济价值和社会价值,这也致使其混伪品较多,给市场造成了较大的混乱。2015 年版《中国药典》规定的哈蟆油鉴定内容主要是性状鉴定、高效液相色谱法(HPLC)检测及膨胀度测定,但传统的形态学及理化性质鉴定易受人为因素、环境条件或药材本身的限制,实践中哈蟆油的鉴定仍感到十分困难。因此有必要探索新方法以解决哈蟆油药材鉴定的问题。

DNA 分子鉴定技术作为传统鉴别方法的重要补充,在中药鉴定方面发挥了越来越重要的作用。目前,利用细胞色素 C 氧化酶 I(CO I)序列能够准确鉴定哈蟆油基原动物^[3-4],为基原动物鉴定提供有效的手段。但市售哈蟆油药材为中国林蛙干燥的输卵管(条状、块状或粉末),富含黏液质、胶质和半纤维素类等物质,遇水易膨胀,膨胀度高达 55 倍以上,采用常规方法,如十二烷基硫酸钠(SDS)法和商品试剂盒方法,水浴离心后无上清液或极少上清液,无法进行后续哈蟆油药材 DNA 提取步骤及 DNA 分子鉴定等工作。目前,关于哈蟆油药材基因组 DNA 的提取尚未见报道。为解决常规方法提取哈蟆油药材 DNA 失败的难题,本实验对常规 SDS 法和试剂盒法进行了改良,比较改良 SDS 法, Chelex-100 法,异硫氰酸胍法及改良试剂盒法提取的基因组 DNA 的质量,旨在寻找一种适合提取哈蟆油基因组 DNA 的方法,为后续哈蟆油的 DNA 分子鉴定奠定基础。

1 材料

S1000 型聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)扩增仪(美国 Bio-Rad 公司), 22R 型高速冷冻微量离心机(美国 Beckman 公司), ZH-2 型漩涡震荡器(天津药典标准仪器厂), MM400 型球磨机(德国 Retsch 公司), DYY-6C 型电泳仪(北京六一仪器厂), 310 型凝胶成像系统(美国 UVP 公司), 2000C 型紫外分光光度计(美国 NanoDrop 公司)。

十二烷基硫酸钠(SDS), 异硫氰酸胍(GuSCN),

三羟甲基氨基甲烷(Tirs)和曲拉通 X-100(Triton X-100)均购自生工生物工程(上海)有限公司;琼脂糖(西班牙 Biowest Agarose 公司), GelRed(美国 Biotium 公司), EX Taq DNA 聚合酶和 DL2000 DNA marker(日本 TaKaRa 公司), Chelex-100(美国 Sigma 公司), 蛋白酶 K(PK, 美国 Roche 公司), DNA 提取试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司], 试剂均为国产分析纯。

从吉林、黑龙江、辽宁、内蒙古等地收集了不同产地中国林蛙 10 批、哈蟆油 2 批和哈蟆油对照药材 1 批(中国食品药品检定研究院, 批号 121484-200501), 共 63 份样品, 基原动物样品依照 2015 年版《中国药典》方法制成哈蟆油药材。样品均经黑龙江中医药大学中药资源与开发教研室王振月教授鉴定, 凭证标本保存于哈尔滨市食品药品检验检测中心, 具体信息见表 1。

2 方法与结果

2.1 基因组 DNA 的提取

2.1.1 SDS 法 按 2010 年版《中国药品检验标准操作规范》^[5]中动物材料模板 DNA 的制备操作规程进行。

2.1.2 GuSCN 法 按照邵碧英等^[6]报道的方法进行 DNA 的提取。

2.1.3 试剂盒法 DNA 提取依照血液组织细胞基因组 DNA 提取试剂盒(离心柱型)的说明书进行。

2.1.4 Chelex-100 法 取哈蟆油药材适量, 用球磨机粉碎成细粉, 称取该细粉 5 mg, 放入 1.5 mL 离心管中, 加入 5% Chelex-100 400 μL 和 20 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ PK 10 μL , 于 56 $^{\circ}\text{C}$ 保温 30 min。取出振荡, 100 $^{\circ}\text{C}$ 保温 8 min, 振荡, 离心 3 min (14 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$, 下同), 上清液直接用于 PCR 扩增或于 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

2.1.5 改良 SDS 法 取哈蟆油药材粉末 5 mg, 放入 1.5 mL 离心管中; 加入裂解液 [0.01 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tirs-HCl (pH 8.0), 0.001 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 乙二胺四乙酸 (EDTA, pH 8.0), 0.1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl, 下同] 600 μL , 加入 20 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ PK 20 μL 及 20% SDS 溶液 15 μL , 震荡混匀, 于 56 $^{\circ}\text{C}$ 消化过夜; 彻底消化后加入 Tirs 饱和酚 600 μL , 振荡混匀 10 min, 离心 10 min; 取上清液置入新的离心管中, 加 Tirs 饱和酚-三氯甲烷-异戊醇 (25:24:1) 混合液 600 μL , 混匀 10 min, 离心

表 1 实验材料的信息

Table 1 Information of experimental materials

No.	物种	拉丁名	来源	数量/份
1	中国林蛙	<i>Rana temporaria chensinensis</i>	辽宁清原	6
2	中国林蛙	<i>R. temporaria chensinensis</i>	辽宁新宾	6
3	中国林蛙	<i>R. temporaria chensinensis</i>	辽宁桓仁	6
4	中国林蛙	<i>R. temporaria chensinensis</i>	吉林白山	6
5	中国林蛙	<i>R. temporaria chensinensis</i>	吉林桦甸	6
6	中国林蛙	<i>R. temporaria chensinensis</i>	吉林蛟河	6
7	中国林蛙	<i>R. temporaria chensinensis</i>	黑龙江鸡西	6
8	中国林蛙(人工)	<i>R. temporaria chensinensis</i>	黑龙江鸡西	6
9	中国林蛙	<i>R. temporaria chensinensis</i>	黑龙江铁力	6
10	中国林蛙	<i>R. temporaria chensinensis</i>	黑龙江五常	6
11	哈蟆油(线油)	Ranae Oviductus	辽宁凤城	1
12	哈蟆油(块油)	Ranae Oviductus	内蒙古扎兰屯	1
13	哈蟆油(粉末)	Ranae Oviductus	中国食品药品检定研究院	1

10 min;取上清液置入新的离心管中,加三氯甲烷-异戊醇(24:1)混合液 600 μL ,混匀 10 min,离心 10 min;取上清液,加入冰乙醇 1 mL,加入 3 mol·L⁻¹ 乙酸钠 60 μL ,放入 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱冷冻 30 min,离心 10 min;弃去上清液,保留沉淀,沉淀用 75% 乙醇洗涤 2 次,离心 10 min,自然干燥后加水 100 μL 使溶解,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

2.1.6 改良试剂盒法 取哈蟆油药材粉末 5 mg,提取前用裂解液浸泡 3 h,所用试剂用量均为使用说明中规定的 2 倍,其余按试剂盒说明书进行操作。

2.2 DNA 质量检测

2.2.1 DNA 质量浓度和纯度 量取 DNA 提取液 1 μL ,运用 2000C 型紫外分光光度计进行检测,分别测定 DNA 浓度和吸光度($A_{260\text{ nm}}$ 和 $A_{280\text{ nm}}$)。哈蟆油富含黏液质、胶质和半纤维素类物质,遇水易膨胀,使用试剂盒法和 SDS 法提取 DNA 时,水浴离心后无上清液或极少上清液,无法进行后续哈蟆油药材 DNA 提取步骤。故将其余 4 种方法提取得到的 DNA 进行了质量浓度和纯度的检测,结果见表 2。

由表 2 可知,4 种方法均能提取得到哈蟆油基因组 DNA。改良试剂盒法提取的 DNA 质量浓度最低,说明此种方法提取的 DNA 量最少, $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ 约 1.7,表明 DNA 纯度较好;Chelex-100 法提取的 DNA 质量浓度最高,说明该方法提取的 DNA 量最多,且提取所需时间最少,但 $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ 约 1.0,表明该方法提取得到的 DNA 存在较多的蛋白质、多糖等杂质;改良 SDS 法提取的 DNA 质量浓度和纯度

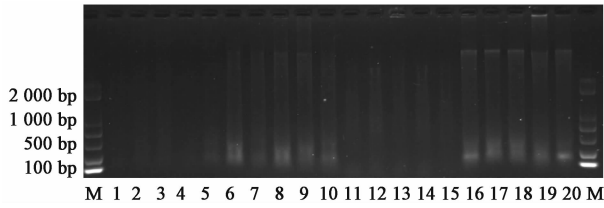
表 2 不同方法提取的哈蟆油 DNA 的质量浓度和纯度($n=5$)

Table 2 Concentration and purity of genomic DNA extracted from Ranae Oviductus by 4 methods($n=5$)

提取方法	$A_{260\text{ nm}}$	$A_{280\text{ nm}}$	$A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$	DNA 质量浓度 /mg·L ⁻¹	提取时间 /min
GuSCN	1.487	1.105	1.35	74.44	120
Chelex-100	5.441	5.302	1.03	272.10	40
改良 SDS	1.339	0.711	1.88	66.96	840
改良试剂盒	0.328	0.197	1.66	16.40	240

均较高,但操作较为繁琐、耗时长,需用到三氯甲烷等有机试剂,对人体和环境存在一定的影响;GuSCN 法提取的 DNA 质量浓度较高, $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}=1.35$,表明该方法提取得到的 DNA 存在较多的蛋白质、多糖等杂质。

2.2.2 琼脂糖凝胶电泳 取 DNA 提取液 6 μL ,上样,通过 1% 琼脂糖凝胶,于 110 V 电泳检测,利用凝胶成像系统观察并拍照。将 4 种方法提取得到的哈蟆油基因组 DNA 于 1% 琼脂糖凝胶电泳中检测,见图 1。结果发现改良试剂盒法,Chelex-100 法和改良 SDS 法均存在不同程度的降解。其中,改良 SDS 法条带较整齐,条带较亮,无明显拖尾现象,说明所提 DNA 样品纯度和完整性较好;改良试剂盒法条带较整齐,但由于 DNA 得率低,条带较暗;Chelex-100 法电泳条带较为模糊,有弥散现象,说明这种方法提取的 DNA 有降解现象,且可能含有蛋白质、多糖等杂质;GuSCN 法看不到明显条带,说明 DNA 降解严重。



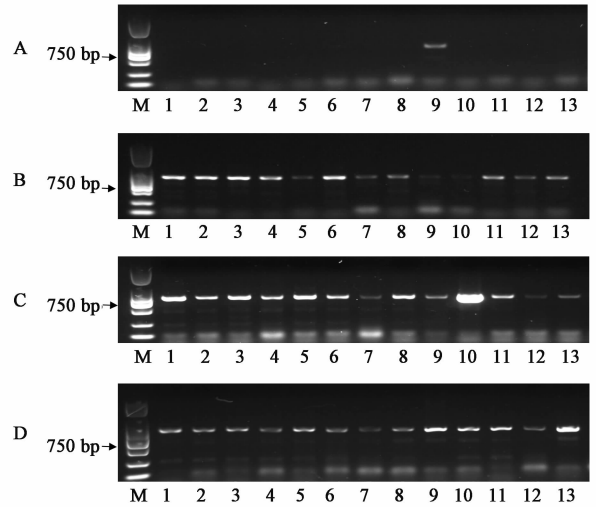
M. marker; 1~5. GuSCN 法; 6~10. 改良试剂盒法; 11~15. Chelex-100 法; 16~20. 改良 SDS 法

图 1 4 种不同提取方法所得基因组 DNA 的琼脂糖凝胶电泳
Fig. 1 Agarose gel electrophoretogram of genomic DNA extracted from Ranae Oviductus by 4 methods

2.2.3 PCR 扩增 选取 GenBank 中蛙科的所有全长 CO I 序列, 通过序列比对, 设计蛙科通用引物 lw01-F/lw01-R (由于正在申请专利, 引物序列暂不公开)。以提取的 DNA 样品为模板进行 PCR 扩增。PCR 反应体系为 25 μL , 10 \times 缓冲液 2.5 μL , 2.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ dNTPs 2.0 μL , 模板 DNA 2.0 μL (约 100 ng), 2.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 引物各 1.0 μL , 1 $\text{U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ Taq DNA 聚合酶 0.1 μL , 加双蒸水补足至 25 μL 。扩增条件为 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 1 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min, 50~54 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1.5 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min。PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶进行检测, 1 \times Tris-乙酸 (TAE), 恒压 (5 $\text{V}\cdot\text{cm}^{-1}$), 电泳 30 min, 凝胶成像系统观察并拍照。以 4 种方法提取的 13 个哈蟆油基因组 DNA 为模板, 利用引物 lw01-F/lw01-R 扩增 CO I 序列, 见图 2。结果发现 Chelex-100 法、改良 SDS 法和改良试剂盒法均可以成功扩增出条带, 说明满足 PCR 扩增的要求; GuSCN 法提取的 DNA 作模板时, 基本不能成功扩增, 无法满足后续实验要求。Chelex-100 法所提取 DNA 条带虽模糊不清, 但其 PCR 扩增结果依然清晰明亮, 说明 DNA 电泳检测结果不会直接影响 PCR 扩增结果。

3 讨论

动物药材大部分为贵重紧缺药材, 通常多以粉末、中成药等形式入药, 给动物药材的准确鉴定带来了极大困难。传统的性状、理化鉴别方法在动物药材鉴别中存在一定的局限性^[7]。随着分子生物学的发展, 分子鉴定技术已成为中药材传统鉴别方法的有益补充。目前, 有关哈蟆油及其基原动物的分子鉴定方法已有报道^[3,4,8-9], 但由于哈蟆油药材 DNA 提取困难, 导致已建立的哈蟆油药材分子鉴定方法中样品 DNA 经常来源于林蛙的肌肉组织^[3,9], 或是提取过程操作复杂, 成功率低, 不适合于哈蟆油药材的分子鉴定, 因此, 有必要建立一种稳定的适合



A. GuSCN 法; B. Chelex-100 法; C. 改良 SDS 法; D. 改良试剂盒法; M. marker; 1~13. 哈蟆油样品

图 2 4 种方法提取的哈蟆油基因组 DNA 的 PCR 扩增电泳
Fig. 2 PCR amplification electrophoretogram of genomic DNA extracted from Ranae Oviductus by 4 methods

哈蟆油药材基因组 DNA 提取的方法。

动物基因组 DNA 的提取方法较多, 如 SDS 法^[10], GuSCN 法^[10] 和试剂盒法^[11] 等, 且不同的动物药材具有不同的特性, 所适合的方法也不尽相同, 应根据具体的药材选择适宜的提取方法。哈蟆油药材 DNA 提取困难的原因在于其遇水膨胀, 无法完成后续操作, 如何解决哈蟆油遇水膨胀给 DNA 提取造成的困难, 是本项研究要解决的关键问题。因此, 本研究针对问题产生的原因进行了提取方法改良 (增加样品前处理、减少样品取样量、增加裂解缓冲液使用量和裂解时间)。同时, 考虑到经过上述改良可能会因样本质量浓度过低而造成提取效率低或失败, 增加了 Chelex-100 法, Chelex-100 是一种弱的阳离子螯合树脂, 适用于微量组织的 DNA 提取^[12-13], 已被广泛应用于法医学检验中, 但其在动物类中药材的 DNA 提取中尚未见报道。

本文研究结果表明改良 SDS 法, 改良试剂盒法, GuSCN 法和 Chelex-100 法均能提取到 DNA。Chelex-100 法提取 DNA, 无纯化步骤, DNA 的质量较差, 但是经过 PCR 扩增检测证明可以满足后续分子鉴定的要求; 改良 SDS 法和改良试剂盒法经过纯化步骤 DNA 质量浓度有所下降, 但 DNA 的质量较高, 均扩增出明显的目的条带, 符合后续分子鉴定的要求; GuSCN 法提取得到的 DNA 降解严重, 基本不能成功扩增, 无法满足后续实验的要求。

综上所述, 尽量减少哈蟆油高膨胀率对 DNA 提

取的影响是本项研究成功的关键。本研究筛选出的 3 种哈蟆油药材的基因组 DNA 提取方法,可以提取得到满足 PCR 扩增要求的基因组 DNA,为后续的哈蟆油药材分子鉴定奠定了基础。本研究借鉴法医学检测中 Chelex-100 法成功提取到了可以满足后续分子鉴定要求的基因组 DNA,具有操作简单、快速的特点,尤其适合于微量、珍贵样本 DNA 的快速提取,在动物药材基因组 DNA 提取中应用前景广阔。但是提取得到的是 DNA 粗制品,不能去除 DNA 溶液中的杂质和降解的 DNA 碎片,这些杂质和碎片在一些困难的 PCR 反应中可能会产生一定的干扰,如何对 Chelex-100 法提取的 DNA 进行纯化将是本课题组下一步研究工作的重点。

[参考文献]

[1] 费梁,胡淑琴,叶昌媛,等.中国动物志.两栖纲.下卷[M].北京:科学出版社,2009:1017.
[2] 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,2015:255.
[3] 陈士林.《中国药典》中药材 DNA 条形码标准序列[M].北京:科学出版社,2015:335-336.
[4] 高晓晨,刘冬,白俊武,等.哈蟆油基原物种 DNA 分子鉴定研究[J].吉林中医药,2014,34(11):1147-1148,1162.
[5] 中国药品生物制品检定所,中国药品检验总所.中国

药品检验标准操作规范[M].北京:中国医药科技出版社,2010:596-601.

[6] 邵碧英,杨婕,张体银.动物产品的 DNA 提取方法[J].畜牧与兽医,2005,37(9):47-49.
[7] 王孟虎,许亮,康廷国,等.动物类中药 DNA 条形码鉴定研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2016,22(15):227-234.
[8] 王孟虎,康廷国,许亮,等.基于 COI 序列的哈蟆油基原动物 DNA 条形码鉴定研究[J].中国中药杂志,2017,42(8):1572-1577.
[9] 杨学干,王义权,周开亚,等.中药材哈蟆油 PCR 鉴定的初步研究[J].应用与环境生物学报,2000,6(2):166-170.
[10] 徐伟丽,杜明,李启明,等.动物肌肉组织基因组 DNA 两种提取方法的比较[J].食品工业科技,2011,32(12):81-84.
[11] 王风云,蒋颖诗,赖小平.基于 ND2 基因序列的燕窝 DNA 条形码鉴别[J].中国实验方剂学杂志,2015,21(13):36-40.
[12] 张晓红,唐建新,陈玥,等. Chelex-100 法在微量检材 DNA 检验中的应用 2 例[J].广东公安科技,2006,84(3):69-70.
[13] 陈辉,刘永波,谢庆瑞,等.有机酚法和 Chelex-100 法提取不同组织微量 DNA 效果比较[J].郑州大学学报:医学版,2004,39(6):988-991.

[责任编辑 刘德文]