

基于碱裂解法川贝母的鉴别

Study on identification of *fritillariae cirrhosae bulbus* by improved alkali pyrolysis

陈玉秀 彭必武 李雨嫣

CHEN Yu-xiu PENG Bi-wu LI Yu-yan

(湖南食品药品职业学院, 湖南 长沙 410208)

(Hunan Food and Drug Vocational College, Changsha, Hunan 410208, China)

摘要:利用碱裂解法提取川贝母 DNA, 考察不同裂解液配比对比川贝母 DNA 质量与电泳成功率的影响, 并与现行方法相比较。结果表明, 含有 200 mmol/L NaCl 溶液, 5 mmol/L Mg₂Cl 溶液, 1% Triton X-100, 1% PVP, 1% SDS, 2 mmol/L EDTA, 0.1 mol/L Tris-HCl 配比液的碱裂解液具有最佳的 DNA 提取效果, 此碱裂解液提取的 DNA 电泳条带与现行方法一致, 可节省 15~20 min, 单个样品检验成本可降至 0.01 元。采用该方法对 25 个市售贝母样本进行鉴定, 可快速鉴别出川贝母的真伪。

关键词: 川贝母; 碱裂解法; DNA 提取; 快速鉴别

Abstract: The DNA of *Fritillariae cirrhosae bulbus* was extracted by alkali lysis. The effects of different proportion of lysate on DNA quality and electrophoretic success rate were investigated, which compared with the current methods. Results, The alkaline lysis buffer had the best effect on DNA extraction, which was made of 200 mmol/L NaCl, 5 mmol/L Mg₂Cl, 1% Triton X-100, 1% PVP, 1% SDS, 2 mmol/L EDTA and 0.1 mol/L Tris-HCl. The DNA electrophoretic bands extracted by this alkali lysate were in accordance with the current method. The method can save 15~20 minutes, and the cost of single sample testing can be reduced to 0.01 yuan. This method was used to identify 25 samples of *Fritillariae cirrhosae bulbus* on the market. The results showed that *Fritillariae cirrhosae bulbus* could be identified quickly.

Keywords: *Fritillariae cirrhosae bulbus*; alkaline lysis; extraction of DNA; rapid identification

川贝母是清咽润喉类保健食品中常见的原料, 为药用

植物川贝母的干燥鳞茎^[1]。由于川贝母价格贵, 市场零售价在 4.8~6.8 元/g, 粉碎后易与其他同源植物, 特别是浙贝母混淆。因此在《中国药典》中, 采用了分子生物学鉴定方法对川贝母进行鉴别, 即通过聚合酶链式—限制性内切酶多态性分析 (PCR-RFLP) 技术, 将川贝母正品特异性的 DNA 条带与伪品进行区别。该方法具有特异性强、微量、准确等特点^[2], 但该方法步骤复杂, 操作费时。

碱裂解法是基于染色体 DNA 与质粒 DNA 的变性及复性的差异进行分离, 利用高 pH 使质粒 DNA 和染色体 DNA 变性, 同时沉淀蛋白质, 再将 pH 值调至中性, 由于质粒 DNA 较小, 容易复性成双链, 而染色体 DNA 较大, 缠结成网状不溶物质, 从而通过离心除去。这种方法具有操作简单、提取速度快、价格低廉、通量大等优点^[3], 现已广泛用于小麦、玉米、花生、水稻^[4]、番茄^[5]、甜菜^[6-7]等经济作物, 在分子辅助育种、转基因植物鉴定、SSR 鉴定等方面起到重要作用, 也可用于中药材鉴定^[8], 在鉴定过程中, 提取高质量、高纯度的基因组 DNA 是开展该方面研究工作的前提和关键过程^[9]。但不同的生物样本, 碱裂解液不同。

试验拟通过对川贝母 DNA 提取所用碱裂解液进行筛选, 旨在获得一种快速鉴别川贝母的新方法。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

贝母: 从产地、药材市场及药店购买 25 个样品 (见表 1), 所有样品经湖南中医药大学周日宝教授鉴定, 其中 1 号样品为正品川贝母, 所有样品依次用 75% 乙醇、灭菌超纯水清洗, 吸干表面水分, 置乳钵中研磨成极细粉;

2-吗啉乙磺酸 (MES)、聚乙二醇 4000 (PEG4000)、曲拉通 100 (Triton X-100): 北京索来宝科技有限公司;

Low ladder (标准 DNA 分子): 广州东盛生物科技有限公司;

交联聚乙烯吡咯烷酮 (PVP): 生工生物工程 (上海) 股份有限公司;

基金项目: 科技部国家科技基础平台项目 (编号: 2005DK21400); 湖南省食品药品监督管理局食品药品安全科技项目 (编号: 湘食药科 R2017010)

作者简介: 陈玉秀 (1975—), 女, 湖南食品药品职业学院副教授, 硕士。E-mail: 510323420@qq.com

收稿日期: 2019-05-07

表 1 贝母样品[†]

Table 1 Sample of fritillaria thun-bergli

序号	名称	来源	序号	名称	来源
1*	川贝母	四川阿坝州诺尔盖县	14	川贝母	长沙市区大药房 4
2	川贝母	四川阿坝州诺尔盖县	15	川贝母	长沙市区大药房 5
3	川贝母	西藏昌都县	16	平贝母	安徽亳州药材市场
4	川贝母	西藏昌都县	17	伊贝母	安徽亳州药材市场
5	川贝母	西藏昌都县	18	伊贝母	安徽亳州药材市场
6	川贝母	长沙市市区大药房 1	19	伊贝母	安徽亳州药材市场
7	东贝母	湖南郴州某乡镇药房	20	浙贝母	长沙市区大药房 6
8	平贝母	长沙高桥药材市场	21	川贝母	株洲攸县某乡镇药房
9	平贝母	长沙高桥药材市场	22	川贝母	湖南浏阳某乡镇药房
10	平贝母	湖南廉桥药材市场	23	平贝母	湖南益阳桃江县某药房
11	伊贝母	湖南廉桥药材市场	24	川贝母	长沙市区大药房 7
12	川贝母	长沙市区大药房 2	25	川贝母	湖南常德安乡某药房
13	川贝母	长沙市区大药房 3	26	川贝母	湖南衡阳某乡镇药房

† * 为对照样本。

rTaq 酶(250 U)、SmaI 酶(100 U)、10x 聚合酶链式反应(PCR)缓冲液:日本 TakaRa 公司;

核糖核酸酶(RNaseA):100 U,天根生物科技(北京)有限公司;

脱氧核糖核苷三磷酸(dNTP):江苏康为世纪生物科技有限公司;

引物 5′CGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAA3′ 和 5′GCTACGTTCTTCATCGAT3′:湖南艾佳生物科技股份有限公司;

乙二醇四乙酸、十二烷基硫酸钠、氯化铜等:分析纯,北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司。

1.2 仪器与设备

核酸定量仪:NanoDrop Lite 型,美国 Thermo 公司;
超低温冰箱:Forma702 型,美国 Thermo 公司;

低温台式离心机:16K-R 型,长沙鑫奥仪器仪表有限公司;

医用净化工作台:SE-CJ-2D 型,苏州净化设备有限公司;

荧光定量 PCR 仪:7300 型,美国 ABI 公司;

PCR 仪:THERM-1000 型,美国 Axygen 公司;

电泳仪:DYY-6C 型,北京六一仪器厂;

凝胶成像系统:5000 Plus 型,北京赛智创业科技有限公司。

1.3 方法

1.3.1 碱裂解法的筛选 碱裂解液的配置参照表 2。取 1 号川贝母样品 10 份各 30 mg 于 1.5 mL 离心管中,分别加入 PA1~PA10 提取缓冲液 400 μL 及 RNaseA 0.5 μL,用涡漩振荡器振荡 10~15 s,混匀,65 ℃水浴加热 5 min,

表 2 碱裂解液配方[†]

Table 2 Formulation of alkali cracking solution

缓冲液	N	PVPP	NaCl	MgCl ₂	EDTA	SDS	PEG	Tr	PVP	Ac	Tris
PA1	+	+						+			+
PA2	+								+		+
PA3	+						+				+
PA4	+						+		+		+
PA5	+		+	+	+	+		+	+		+
PA6	+	+						+		+	
PA7	+								+	+	
PA8	+								+	+	
PA9	+						+		+	+	
PA10	+		+	+	+	+		+	+	+	

† N:0.5 mol/L 氢氧化钠;PVPP:1%聚乙烯吡咯烷酮 40;NaCl:200 mmol/L 氯化钠液;MgCl₂:5 mmol/L 氯化镁液;EDTA:2 mmol/L 乙二醇四乙酸液;SDS:1%十二烷基硫酸钠;PEG:40%聚乙烯二醇 4000;Tr:1%曲拉通 100;PVP:1%聚乙烯吡咯烷酮;Ac:醋酸钠液;Tris:10 mmol/L 三羟甲基氨基甲烷盐酸液。

取出。在 PA1~PA5 缓冲液管中分别加入 0.1 mol/L Tris-HCl (pH 8.0) 130 μ L, 在 PA6~PA10 缓冲液管中分别加入 0.3 mol/L NaAc(pH 5.0)130 μ L。分别经漩涡混匀,冰浴冷却 3 min,14 000 r/min 离心 3 min;吸取上清液转移至另一离心管中,加入等体积(含 6.0 mol/L 氯化铜溶液,pH 5.5)25 mmol/L MES 液,5 mmol/L $MgCl_2$ 液及 0.05% Triton X-100 混合溶液,混匀,加到吸附柱上,10 000 r/min 离心 1 min,弃过滤液,加入 5 mol/L 盐酸胍、25 mmol/L MES、2 mmol/L 氯化镁溶液及 0.05% Triton X-100 混合溶液 500 μ L,10 000 r/min 离心 1 min,弃过滤液;再加入 Tris-Base 缓冲液 500 μ L,10 000 r/min 离心 1 min,弃过滤液;取出吸附柱,放入另一离心管中,加入 50 μ L 洗脱缓冲液,室温放置 3 min,10 000 r/min 离心 1 min,将洗脱液再加入吸附柱中,室温放置 2 min,10 000 r/min 离心 1 min,取洗脱液,在核酸定量仪上测定浓度与纯度。

1.3.2 PCR-RFLP 反应及电泳检测

(1) 鉴别引物:5'CGTAACAAGGTTTCCGTAGGT-GAA3'和 5'GCTACGTTCTTCATCGAT3'。

(2) PCR 反应体系:200 μ L 离心管中进行,反应体系总体积 30 μ L,包括 10 $\times$ PCR 缓冲液 3 μ L,二氯化镁(25 mmol/L) 2.4 μ L, dNTP(10 mmol/L) 0.6 μ L,上游引物(30 μ mol/L) 0.5 μ L,下游引物(30 μ mol/L) 0.5 μ L,高保真 Taq DAN 聚合酶(5 U/ μ L)0.2 μ L,模板 1 μ L,无菌超纯水 21.8 μ L。

(3) PCR 反应参数:95 $^{\circ}$ C 预变性 4 min,循环反应 30 次(95 $^{\circ}$ C 30 s,56 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 30 s),72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。取 PCR 反应液,置 500 μ L 离心管中,进行酶切反应,反应体系总体积 20 μ L,包括 10 $\times$ 酶切缓冲液 2 μ L,PCR 反应液 6 μ L,Sma I(10 U/ μ L)0.5 μ L,无菌超纯水 11.5 μ L,酶切反应在 30 $^{\circ}$ C 水浴 2 h。另取无菌超纯水,同上述 PCR-RFLP 反应操作,进行空白对照。

(4) 电泳检测:参照琼脂糖凝胶电泳法(中国药典四部通则 0541),胶浓度 1.5%,胶中加入核酸凝胶染色剂 GelRed;供试品与对照药材酶切反应溶液的上样量分别为 8 μ L,DNA 分子量标记上样量 1 μ L(0.5 μ g/ μ L)。电泳结束后,取凝胶片在凝胶成像仪上或紫外透射仪上检视。

1.4 数据处理

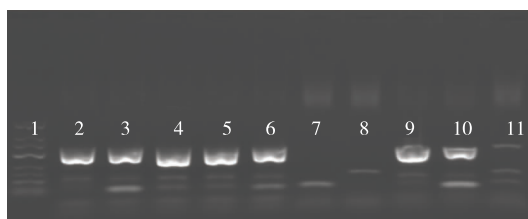
采用 SPSS 17.0 软件对 $OD_{260\text{ nm}}/OD_{280\text{ nm}}$ 的数据进行单因素方差分析。

2 结果与讨论

2.1 碱裂解液的确定

由图 1 可知,通过 10 种不同的碱裂解液所提 DNA 经 PCR 扩增和琼脂糖凝胶电泳,都能扩增出条带,以 PA5 扩增出的条带最成功、最清晰。10 种碱裂解液中分别用到了 SDS、PVP、PVPP、PEG、曲拉通 100、EDTA、NaCl、Tris-HCl 等试剂,在 DNA 提取中具有不同的作用。

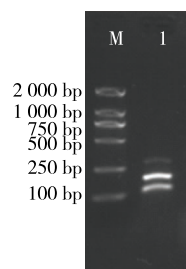
PA5 裂解液中用到了 PVP、EDTA、曲拉通 100 等,并用 Tris-HCl 为中和剂,PCR 扩增后电泳图结果较好,DNA 浓度稍低,但 OD 值为 1.84,接近纯品 DNA(如表 3 所示)。这可能与裂解液中 PVP 等有关,有文献^[10]报道 PEG、PVP 可降低 DNA 浓度。但整体而言,以 Tris-HCl 为中和剂的裂解液比以醋酸钠为中和剂的裂解液所得 DNA 浓度及纯度好。因此选择 PA5 碱裂解液作为川贝母 DNA 提取液,并对 1 号样品进行 PCR-RFLP 反应和电泳检测,结果见图 2。



1. Marker 2~11. 对应表 2 中的 PA1~PA10 裂解液

图 1 10 种碱裂解液提取川贝母 DNA 电泳图

Figure 1 DNA electrophoresis maps of fritillaria cirrhosae bulbus extracted from 10 kinds of alkali lysis solutions



M. Marker 1. 对照样

图 2 PA5 裂解液提取 DNA 的 PCR-RFLP 图

Figure 2 PCR-RFLP map of DNA extraction from PA5 lysis solution

图 2 显示对照样在 100~250 bp 有两条清晰的 DNA 条带,可见利用 PA5 碱裂解液进行川贝母 DNA 提取并进行 PCR-RFLP 反应和电泳检测,同样可以满足《中国药典》利用分子生物学鉴别法对川贝母进行质量检测鉴别的目的。

2.2 新方法验证

由表 4 可知,同一样品,用药典法和试验方法在提取时间和成本上均有所不同。试验方法比药典法的提取时间要节省 15~20 min,且单个样品的检验成本显著降低。

2.3 试验方法对不同川贝母样品的检测

利用试验方法对 25 个流通市场上所销售的贝母进行 DNA 提取,PCR 后进行酶切前的电泳检测,对有电泳条带的样品进行 RFLP 检测,结果如图 3~5。

由图 3~5 可知,1 号作为对照样在 100~250 bp 处有 2 条清晰条带,且条带均匀清晰,2、3、4、12、13、15、21、

表 3 PA1~PA10 碱裂解液提取 DNA 浓度与纯度及电泳结果

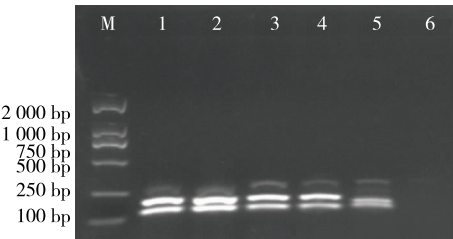
Table 3 Concentration, purity and electrophoretic results of DNA extracted from PA1~PA10 alkali lysis solution

序号	浓度/(ng·μL ⁻¹)	OD _{260 nm} /OD _{280 nm}	电泳图	序号	浓度/(ng·μL ⁻¹)	OD _{260 nm} /OD _{280 nm}	电泳图
PA1	50.4	1.42	有条带,模糊	PA6	90.2	1.40	有条带,模糊
PA2	21.8	1.93	有条带	PA7	12.2	2.23	有条带,模糊
PA3	21.3	1.85	有条带	PA8	13.4	1.98	有条带,模糊
PA4	16.0	1.87	有条带	PA9	15.2	1.94	有条带
PA5	19.8	1.84	条带清晰、明显	PA10	17.2	1.88	有条带

表 4 两种方法对比

Table 4 Comparison of two methods

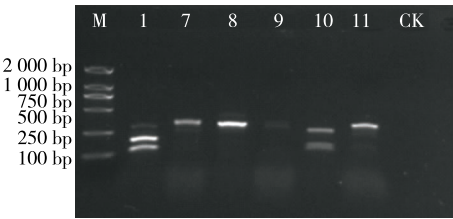
项目	DNA 提取时间/min	单个样品成本/元
药典法	50~60	7~8
试验方法	40~45	0.01



M. Marker 1~6. 对应表 1 中相同序号的贝母样品

图 3 川贝母样品碱裂解法 PCR-RFLP 图

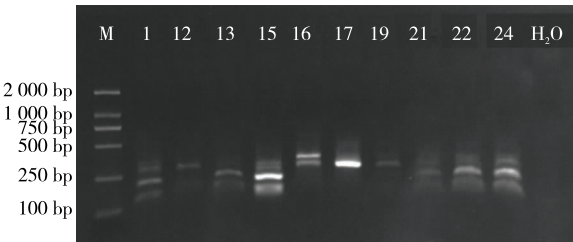
Figure 3 PCR-RFLP map of alkali pyrolysis of fritillariae cirrhosae bulbus samples



M. Marker 1,7~11. 对应表 1 中相同序号的贝母样品
CK. 空白

图 4 川贝母样品碱裂解法 PCR-RFLP 图

Figure 4 PCR-RFLP map of alkali pyrolysis of fritillariae cirrhosae bulbus samples



M. Marker 1,12~24. 对应表 1 中相同序号的贝母样品

图 5 川贝母样品碱裂解法 PCR-RFLP 图

Figure 5 PCR-RFLP map of alkali pyrolysis of fritillariae cirrhosae bulbus samples

22、24 号样品与 1 号样品一致,可鉴定为正品,而其他样品与 1 号样品不一致,且结合外观性状,可判定为川贝母伪品。

3 结论

试验研究了采用碱裂解法提取川贝母 DNA 的裂解液配比比例及方法,筛选获得了 200 mmol/L NaCl 液, 5 mmol/L MgCl₂ 液, 1% Triton X-100, 1% PVP, 2 mmol/L EDTA, 1% SDS, 0.1 mol/L Tris-HCl 的裂解液可用于川贝母的 DNA 提取,此法不仅提取成本较《中国药典》方法中规定的商品试剂盒费用显著低,而且操作简便、快捷,符合相关保健食品企业对川贝母快速鉴定的需求。由于贝母有多种入药形式(完整药材、破碎饮片、粉末),后续应针对基因组提取的正确取样方法进行研究,尤其是川贝母正品中掺混有少量伪品时。

参考文献

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[S]. 2015 版. 北京: 中国医药科技出版社, 2015.

[2] 曹辉, 邵鹏柱. DNA 分子标记技术: 一种新的中药分析方法[J]. 药物分析杂志, 1999, 19(5): 355.

[3] 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): 1 081-1 090.

[4] XU Xin, KAWASSAKI S, FUJIMURA T, et al. A protocol for high-throughput extraction of DNA from rice leaves[J]. Plant Molecular Biology Reporter, 2012, 23(3): 291-295.

[5] 孙利萍, 贾芝琪, 胡建斌, 等. 碱裂解法快速提取番茄 DNA 的研究[J]. 河南农业大学学报, 2012, 46(2): 136-138.

[6] 吴则东, 王华忠, 倪洪涛. 不同碱裂解法快速提取甜菜大群体 DNA 的研究[J]. 中国糖料, 2013, 34(3): 32-34.

[7] 王茜, 侯飞侠, 王艺璇, 等. 碱裂解法快速提取虫草属真菌 DNA 研究[J]. 时珍国医国药, 2016, 27(4): 995-997.

[8] 郑琪, 蒋超, 黄璐琦, 等. 碱裂解法快速提取中药炒制品 DNA 的研究[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(19): 3 678-3 683.

[9] 何海宁, 洪霞, 冯玉升, 等. 加工食品中动物源 DNA 的提取和多重 PCR 检测方法的建立[J]. 食品与机械, 2015, 31(6): 79-83.

[10] POREBSKI S, BAILEY L G, BAUM B R. Modification of a CTAB DNA ex-traction protocol for plants containing high polysaccharide and poly- phenol components[J]. Plant Mol Biol Rep, 1997, 15(1): 8.