

# 一种利用活性炭提取中药材 DNA 的方法

卢雪<sup>1,2</sup>, 陈蓉<sup>1</sup>, 杜凤<sup>1</sup>, 唐卓<sup>1\*</sup><sup>1</sup>中国科学院成都生物研究所 天然产物中心, 成都 610041; <sup>2</sup>中国科学院大学, 北京 100049

**摘要:**当前市场上中药材出现来源混乱、真假难辨的现象,因此近几年 DNA 分子诊断迅速成为了鉴定中药材的重要工具。要进行 DNA 检测, DNA 的提取是其中非常重要的一个步骤。但是当前的 DNA 提取方法多有毒性大、操作繁琐、价格高、耗时长等缺点,所以开发一种低毒、简易、价低、省时的 DNA 提取方法尤为重要。我们选用 150 mmol/L NaCl 作为裂解液,加入活性炭(Activated carbon, AC)后,藏红花、甘草、三七花等的 DNA 模板量都有很大程度的增加,尤其是藏红花的模板量增加了超过 30 倍,并且整个 DNA 提取过程不超过 10 min。由此可见,这种简易提取中药材 DNA 的方法是极具潜力的。

**关键词:**中药材; DNA 提取; 活性炭; 裂解液;

中图分类号: Q31; R932

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2019)3-0523-05

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2019.3.025

## A simple method for extracting DNA from Chinese herbal medicine with activated carbon

LU Xue<sup>1,2</sup>, CHEN Rong<sup>1</sup>, DU Feng<sup>1</sup>, TANG Zhuo<sup>1\*</sup><sup>1</sup> Chengdu Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Chengdu 610041, China;<sup>2</sup> University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

**Abstract:** Current Chinese herbal medicine market having been appeared a phenomenon that the sources are confused and true or false is difficult to distinguish. Thus, DNA molecular diagnosis rapidly becomes an important tool for the identification of Chinese herbal medicines. To carry out DNA detection, DNA extraction is one of crucial steps. However, current methods of DNA extraction are toxic, cumbersome, expensive and time consuming. Therefore, it is significant to develop a DNA extraction method that is low-toxic, simple, low-cost and time saving. We use 150 mmol/L NaCl as a lysis, in which adding activated carbon(AC), the DNA template increased to a large extent, including *Crocus sativus*, *Glycyrrhiza*, the flower of *Panax notoginseng* (Burk) F. H. Chen, especially the template of *Crocus sativus* increased by more than 30 times. And the DNA extraction process cost less than 10 minutes. It is a clear illustration that this simple method of extracting DNA from Chinese herbal medicine is potential.

**Key words:** Chinese herbal medicine; DNA extraction; activated carbon; lysis buffer

目前中药材的质量鉴定多用性状鉴别、显微鉴别、理化鉴别等方法进行,在实际操作中这些方法却有许多不足之处。按照现行的国家药典标准,性状和显微鉴别很难区别相似种,化学法多测定中药材中一种或几种化学成分,但是很多化学成分并不是该中药材所独有,在其常见伪品及其相似种中也存在,因此该方法很难真正对中药材的质量进行控制。

在如今的药材市场中,有些不法商家对多种中药尤其是贵重中药材进行掺假<sup>[1]</sup>,给传统中医的发展带来了极大的挑战。近几年发展起来的中药材 DNA 分子鉴定的方法,由于其对物种能够快速、准确地识别和鉴定,成为鉴别中药材的重要手段之一<sup>[2,3]</sup>。

要进行 DNA 分子鉴定, DNA 的提取是极其重要、不可或缺的一个步骤。当前 DNA 的提取多采用商业试剂盒,但是商业试剂盒价格较贵,步骤多,对于提取大量样品的 DNA 来说,操作较为繁琐。因此,开发一种简易提取药材中 DNA 的方法尤为重要。在本文中,我们开发了一种快速、操作简单的

收稿日期: 2017-11-29 接受日期: 2018-01-29

基金项目: 国家自然科学基金(21402189, 21572222), 四川省青年科技创新研究团队(2017TD0021)

\* 通信作者 E-mail: tangzhuo@cib.ac.cn

DNA 提取方法:采用实验室常见易得的 NaCl 溶液作为裂解液,并在其中加入一定量的活性炭粉末,在高温下进行裂解,直接取裂解液即可作为 PCR 模板进行检测。

## 1 实验材料

### 1.1 材料

藏红花(购自上海崇西红花种植合作社);半夏、槐米、三七花、甘草(购自四川御民堂大药房有限责任公司)。

### 1.2 仪器与试剂

主要仪器:PCR 仪(博日,TC-96/G/H(b)c),实时荧光定量 PCR 仪(Thermo,5100),凝胶成像分析仪(Typhoon FLA7000),显微镜(Nikon,Eclipse-E200),恒温仪(MS-100),旋涡混合器(其林贝尔,GL-888),调速迷你离心机(上海生工,Super Mini Dancer)。

主要试剂:150 mmol/L NaCl,400 目活性炭粉(天津致远化工试剂有限公司),引物合成于上海生物工程有限公司,SYBR Green I(invitrogen),裂解液(Extract-N-Amp<sup>®</sup> Plant PCR Kit, Sigma-Aldrich),PCR 试剂(北京全式金生物技术有限公司)。

## 2 实验方法

### 2.1 验证活性炭吸附 DNA

用半夏在商业的裂解液(Sigma)中进行裂解,离心取上清,将其平均分为三份,NC 不做任何处理,1 号在 95 °C 金属浴中加热 20 min,2 号加入 100 mg 活性炭,并在 95 °C 金属浴中加热 20 min,12000 rpm 离心 3 min。取 NC、1、2 号上清液作为模板进行 PCR。扩增引物为半夏的特异性引物 BP:5'-GG-GAGACTCCCG-ACGATCGCA-3', BRP:5'-GCCG-CACG GACGGATGGAT-3'<sup>[4]</sup>,反应 25 μL 体系,包括 2.5 μL 10 × Taq buffer,0.2 mmol/L dNTP,0.5 μmol/L BP,0.5 μmol/L BRP,2.5 U Taq DNA 聚合酶,1 μL 模板,其余用水补齐。扩增条件 94 °C 预变性 3 min,94 °C 变性温度 30 s,60 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 30 s,30 个循环,最后 72 °C 延伸 5 min。

### 2.2 促进中药材的裂解

将中药材研磨成细粉,称取 10 ~ 20 mg 粉末至 1.5 mL EP 管中,阴性对照组加入 600 μL 150 mmol/L NaCl 作为裂解体系,并加入 8 μL 的灭菌水,实验组将灭菌水替换为 8 μL 100 mg/mL(裂解体系活性炭终浓度为 1.33 mg/mL)活性炭(AC),两

组均在漩涡震荡仪上震荡均匀,并将其置于恒温仪上 95 °C 震荡处理 10 min。取混悬裂解液作为 PCR 模板。用商业化的裂解液裂解相应的中药材作为阳性对照。扩增中药材用 ITS2 通用引物 ITS2F:5'-ATGCGATACTTGGTGTGAAT-3', ITS3R:5'-GACGCTT CTCCAGACTACAAT-3'<sup>[3]</sup>,反应 25 μL 体系,加 2.5 μL 10 × Taq buffer,0.2 mmol/L dNTP,0.5 μmol/L ITS2F,0.5 μmol/L ITS3R,2.5 U Taq DNA 聚合酶,1 μL 模板,其余用水补齐。在 RT-PCR 反应中,25 μL 体系加入终浓度 0.4 × 的 SYBR Green I,其他试剂用量与普通 PCR 一致,加水至 25 μL。PCR 扩增条件:94 °C 预变性 3 min,94 °C 变性温度 30 s,56 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 30 s,除槐米扩增 22 个循环,其余均扩增 30 个循环,最后 72 °C 延伸 5 min。普通 PCR 产物在 3% 的琼脂糖凝胶中进行电泳,RT-PCR 经过实时荧光定量曲线,自动设置荧光阈值,得到荧光值对应的 Ct 值,从而计算出加入 AC 前后的 δCt 值。

### 2.3 显微观察活性炭对细胞裂解的作用

同 2.2 的裂解处理后,取藏红花裂解后的混悬液于载玻片上,盖上盖玻片,在显微镜下放大 160 倍观察。

## 3 实验结果

### 3.1 验证活性炭吸附 DNA

由于 AC 有较强的吸附作用,所以我们猜想 AC 在细胞裂解的过程中是否有增加模板量的作用。因此,我们验证了 AC 是否能吸附 DNA。验证材料为半夏裂解液,其特异性引物扩增的条带长度为 114bp,如图 1 所示,扩增条带为目标条带,NC 和 1 号的条带亮度差异不大,所以排除了 95 °C 高温对

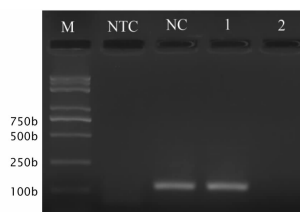


图 1 验证 AC 吸附 DNA

Fig. 1 Verifying absorption ability of DNA by AC

注:M--DNA marker;以下为 PCR 产物:NTC--无模板 PCR 阴性对照;NC--未经任何处理的半夏裂解液;1--半夏裂解液在 95 °C 下处理 20 min;2--半夏裂解液中加入 AC 150 mg,95 °C 处理 20 min。  
Note:M--DNA marker;The following is PCR products:NTC--No template negative control;NC--Without any treatment of Pinellia lysate;1--Pinellia lysate was treated at 95 °C for 20 min;2--Adding AC 150 mg in Pinellia lysate,95 °C for 20 min.

DNA 有降解的作用。2 号加了 AC 吸附半夏基因组 DNA,对比 NC,DNA 模板几乎完全被 AC 吸附了,说明 AC 有很强的吸附 DNA 的作用。在裂解液裂解细胞释放 DNA 的过程中,有部分细胞的结构不会完全被破坏,胞内的 DNA 就会缠绕在细胞膜表面或者是被阻滞在细胞结构内,导致这部分 DNA 不能作为 PCR 模板而用于检测,由于上述结果显示 AC 有很强的吸附 DNA 的作用,所以我们推测,在裂解过程中加入 AC 可以将原本不能释放出来的那部分 DNA 吸附在其表面,从而能起到增加模板量的作用。

### 3.2 促进中药材的裂解

为了进一步证明我们的猜想,我们选用槐米、藏红花和三七花等常用且价格较高的药材作为验证材料,这些药材在市面上容易被掺假。根据图 2 显示,由于四种中药材均用 ITS 通用引物 ITS2F 和 ITS3R 扩增,植物的条带长度相近,在琼脂糖胶上几乎看不出差异,我们用商业裂解液裂解样品的扩增产物作为阳性对照。同种材料在相同的扩增条件及循环数下,2,5,8,11(在 NaCl 溶液中加入 AC 进行裂解)的条带均比对应的 1,4,7,10(仅在 NaCl 溶液中进行裂解)要深。特别是藏红花的条带差异极为显著,10 号未扩增出条带,11 号条带明显,说明在 NaCl 中加了 AC 的裂解效果比只在 NaCl 中要好。这个结果说明 AC 确实有增加模板量的作用,我们猜测 AC 可能将未被释放到 NaCl 中的 DNA 吸附在其表面,这部分 DNA 加入扩增体系中可以进行 PCR,从而增加模板量。另外也有可能是 AC 促进了细胞的破裂,使得 DNA 释放更充分。

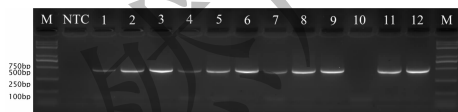


图 2 AC 促进中药材的裂解

Fig. 2 AC improved the lysis of traditional herbal medicine

注: M--DNA Marker; NTC--PCR 阴性对照; 1, 2, 3--槐米; 4, 5, 6--三七花; 7, 8, 9--甘草; 10, 11, 12--藏红花; 1, 4, 7, 10 仅用 NaCl 溶液裂解, 2, 5, 8, 11 用 NaCl 溶液加 AC 裂解; 3, 6, 9, 12--用商业裂解液裂解(作为阳性对照)。

Note: M--DNA Marker; NC--Negative control; 1, 2, 3--sophora flower; 4, 5, 6--Netoginseng flower; 7, 8, 9--Glycyrrhiza; 10, 11, 12--Saffron; 1, 4, 7, 10--only lysated with NaCl solution, 5-8 Adding AC in the NaCl solution to lysate, 9-12--lysating with commercial Lysate (as positive control).

荧光定量 PCR 仪对在裂解液中加入 AC 与未加的样品的模板量进行了比较。如图 3 所示,列举了四种常见中药材的实时荧光定量 PCR 曲线图,在裂解液中加入 AC 后,Ct 值均有显著变化。 $\delta Ct$  值的差异反映了 PCR 的模板量差异,Ct 值越大,模板量就越少,相反则模板量越多。Ct 值减少 1,则表示模板量增加 2 倍,如图 3 中槐花、三七花、半夏和藏红花的  $\delta Ct$  值分别为 2.47、3.91、2.75、4.92,模板量分别增加了 5.54、15.03、6.73、30.27 倍。其中,藏红花加入 AC 裂解后模板量增加了 30.27 倍,这充分证明了 AC 在裂解过程中促进裂解增加模板量的作用。

### 3.3 显微观察活性炭对细胞裂解的作用

为了进一步探究 AC 增加模板量的原因,我们对加入 AC 与否的裂解液进行了显微观察比较。如图 4 所示,A 图是仅在 150 mmol/L NaCl 中裂解藏红花,B 图是在 150 mmol/L NaCl 中加入 AC 一起裂解。将裂解完成后的藏红花裂解液置于显微镜下观察,我们发现 A 图中,藏红花细胞多聚集、呈完整状态或碎片较大,而在 B 图中,细胞分散、结构明显多被破坏,碎片相对较小。这个结果没能直接证明我们之前的猜测,但是根据显微观察的结果显示,我们惊奇地发现 AC 的在细胞的裂解过程中可能有撞击、割裂或者摩擦细胞的机械作用,使得细胞中的 DNA 能够更好地释放出来,从而增加了被裂解样品的模板量。AC 是否会吸附未被充分释放在裂解液中的 DNA 模板用于下游分析,还有待验证。

## 4 讨论

近年来,有很多固相提取 DNA 的材料相继问世,例如用多聚赖氨酸包裹的硅颗粒来提取尿液中的 DNA<sup>[4]</sup>;多聚离子流体涂层提取复杂样本中的 DNA<sup>[5]</sup>;用多层硅热塑性薄片提取高分子量 DNA<sup>[6]</sup>;用庚二亚氨酸二甲酯(DMP)与胺基协同吸附血液及细菌中的 DNA 和 RNA<sup>[7]</sup>;用壳聚糖修饰的 fusion 5 滤纸<sup>[8]</sup>和磁珠<sup>[9]</sup>吸附样本 DNA,可以直接用于下游 PCR 分析;但是这些材料在制作方面相对复杂,真正产业化可能还需要一些时间,所以找一种已经产业化的材料来提取 DNA,老材料新用法可以缩短从试验到应用的时间。经过一番了解与试验,我们探索出了一种利用活性炭提取 DNA 的方法。活性炭是一种不规则的多孔炭材料,具有较大的比表面积,对气体、色素以及挥发性有机物具有很强的吸附作用,多用于净化空气、水质以及脱色等<sup>[10]</sup>。活性炭表面有丰富的含氧官能团和含氮官能团,这也就使活性炭有了特殊的化学性能,能通过

为了对增加的模板进行定量,我们运用了实时

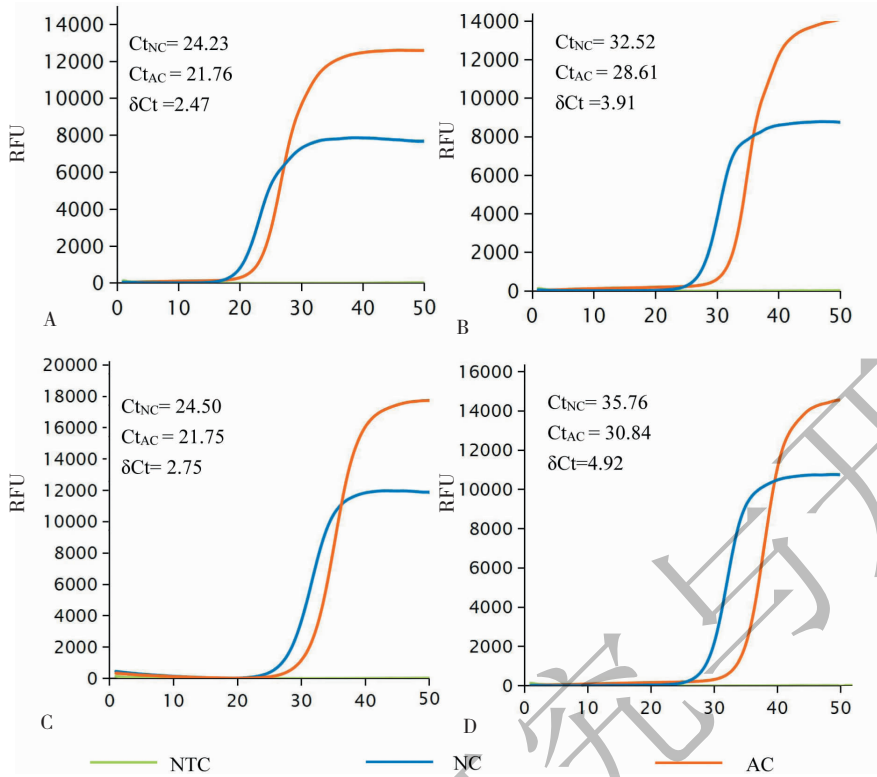


图3 用实时荧光 PCR 验证 AC 促进中药材的裂解

Fig. 3 Verifying activated carbon improved the lysis of Chinese herbal medicine with real-time PCR.

注:A. 槐米;B. 三七花;C. 甘草;D. 藏红花;NTC--PCR 阴性对照;NC--仅以 NaCl 为裂解液;AC--在 NaCl 中加入终浓度为 1.33 mg/mL 的 AC; $C_{tNC}$ 、 $C_{tAC}$  为 NC 和 AC 的  $C_t$  值, $\delta C_t$  值为  $C_{tNC}$  和  $C_{tAC}$  之差。

Note: A. sophora flower; B. Netoginseng flower; C. liquorice; D. saffron; NTC--No template control; NC--only lysated with NaCl solution;

AC--Adding final concentration of AC is 1.33 mg/mL;  $C_{tNC}$ ,  $C_{tAC}$  is the  $C_t$  value of NC and AC, and the  $\delta C_t$  is the difference between  $C_{tNC}$  and  $C_{tAC}$ .

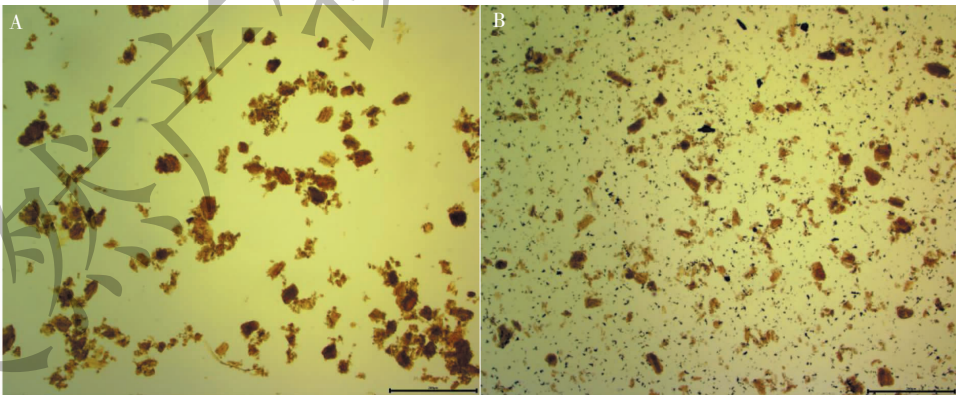


图4 显微观察 AC 对细胞裂解的作用

Fig. 4 Microscopic observation of the effect of activated carbon on cell lysis.

注:A. 藏红花在 150 mmol/L NaCl 中裂解。B. 藏红花在含终浓度 1.33 mg/mL 的 AC 的 150 mmol/L NaCl 中裂解

Note: A. The saffron was lysated in 150 mmol/L NaCl solution. B. The saffron was lysated in 150 mmol/L NaCl solution with AC of final concentration is 1.33 mg/mL.

离子交换作用、静电作用、扩散力、供-受电子交换作用对其他物质进行吸附<sup>[11]</sup>。在本文中,我们用活性炭来吸附提取 DNA,将活性炭的用途扩大到了分子

生物学的领域。

我们开发的这种 DNA 提取方法采用 NaCl 溶液作为裂解液,简单易得且经济实惠。在其中加入一

定量的 AC, AC 本身不会影响 PCR, 所以可以直接取包含 AC 的混悬裂解液作为模板用于 PCR 等下游分析检测。在探究 AC 增加模板量的原因时, 我们通过显微观察结果证明, AC 确实能够通过机械作用在裂解过程中破坏细胞, 释放出更多的 DNA。但是 AC 是否可以将未被完全释放的 DNA 吸附在其表面, 还需要在以后实验中进一步验证。

目前商业的试剂盒价格都在几百上千不等, 并且操作繁琐, 需要多次离心、洗脱等步骤, 裂解时间也较长, 对于大样本量的 DNA 提取是耗时且极为不方便的。而我们开发的这种简易提取 DNA 的方法轻松地解决了这个问题, 仅需要 NaCl 溶液和 AC 粉末, 即可快速提取 DNA。这种简单快速的 DNA 提取方法可以应用到中药材的 DNA 提取中, 适合大量样本的 DNA 提取, 为实际操作带来了极大的便利。同时, AC 对 DNA 吸附与解吸也是一个重要的研究方向, 基于 AC 极强的吸附能力, 如果能够找到 AC 的解吸剂, 那么就可以开发出一种提取 DNA 及分离纯化 DNA 的新方法, 这在 DNA 提取领域将是一个新的突破。

#### 参考文献

- Zhang J. A status analysis of adulteration, fake and Shoddy of Chinese herbal medicine[J]. Beijing J Tradit Chin Med(北京中医药), 2008, 27:130-133.
- Xu H, Wang ZT, Hu ZB. Development and application of molecular identification technology in traditional Chinese medicine[J]. Mod of Trad Ch Medi and Mater Med--World Sci & Technol(世界科学技术—中医药现代化), 2003, 5(2): 24-30.
- Chen SL. Molecular identification of DNA barcode in Chinese medicine[M]. People's Medical Publishing House(人民卫生出版社), 2012.
- Chen R, Wu CL, Deng Y, et al. A general detection method of Banxia from different habitats based on specific primers PCR[J]. Pharm& Clin of Ch Mat Med(中药与临床), 2015, 6: 14-15.
- Sho Takano, Qingjiang Hu, Takaki Amamoto, et al. Extraction of cell-free DNA from urine, using polylysine-coated silica particles[J]. Anal Bioanal Chem, 2017, 409:4021-4025.
- Omprakash Nacham, Kevin D Clark, Jared L. Anderson. extraction and purification of DNA from complex biological sample matrices using solid-phase microextraction coupled with Rear-time PCR[J]. Anal Chem, 2016, 88:7813-7820.
- Ye Zhang, Yi Zhang, Jeffrey M Burke, et al. A Simple thermoplastic substrate containing hierarchical silica lamellae for high-molecular-weight DNA extraction[J]. Adv Mater, 2016, 28:10630-10636.
- Choong Eun Jin, Tae Yoon Lee, Bonhan Koo, et al. Use of dimethyl pimelimidate with microfluidic system for nucleic acids extraction without electricity [J]. Anal Chem, 2017, 89:7502-7510.
- Wupeng Gan, Yin Gu, Junping Han, et al. Chitosan-Modified Filter Paper for Nucleic Acid Extraction and "in Situ PCR" on a Thermoplastic Microchip [J]. Anal Chem, 2017, 89: 3568-3575.
- Imaly A Nanayakkara, Weidong Cao, and Ian M. White. Simplifying Nucleic Acid Amplification from Whole Blood with Direct Polymerase Chain Reaction on Chitosan Microparticles [J]. Anal Chem, 2017, 89:3773-3779.
- Dong J, Wu BH. Discussion on modification and application Of activated carbon[J]. Coal Qual Technol(煤质技术), 2008(4):51-53.
- Chen AL, Tao F. Study on the Application of Activated Carbon Adsorption[J]. Chem Engin & Equipment(化学工程与装备), 2011:164-166.