

- arthritis: *in vivo* study using TRPA1-deficient mice[J]. *Arthritis Res Ther*, 2016, 18: 6.
- [22] DEL F M, QUARTU M, BOI M, et al. TRPV1, CGRP and SP in scalp arteries of patients suffering from chronic migraine[J]. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2015, 86(4): 393-397.
- [23] MARONE I M, DE LOGU F, NASSINI R, et al. TRPA1/NOX in the soma of trigeminal ganglion neurons mediates migraine-related pain of glyceryl trinitrate in mice[J]. *Brain*, 2018, 141(8): 2312-2328.
- [24] YAN X, JIANG E, GAO M, et al. Endogenous activation of presynaptic NMDA receptors enhances glutamate release from the primary afferents in the spinal dorsal horn in a rat model of neuropathic pain[J]. *J Physiol*, 2013, 591(7): 2001-2019.
- [25] QU X X, CAI J, LI M J, et al. Role of the spinal cord NR2B-containing NMDA receptors in the development of neuropathic pain[J]. *Exp Neurol*, 2009, 215(2): 298-307.
- [26] FLYNN R, LABRIE-DION E, BERNIER N, et al. Activity-dependent subcellular cotrafficking of the small GTPase Rem2 and Ca²⁺/CaM-dependent protein kinase IIalpha[J]. *PLoS One*, 2012, 7(7): e41185.
- [27] LI X Y, KO H G, CHEN T, et al. Alleviating neuropathic pain hypersensitivity by inhibiting PKMzeta in the anterior cingulate cortex[J]. *Science*, 2010, 330(6009): 1400-1404.
- [28] KELLY M T, CRARY J F, SACKTOR T C. Regulation of protein kinase Mzeta synthesis by multiple kinases in long-term potentiation[J]. *J Neurosci*, 2007, 27(13): 3439-3444.
- [29] WILLIS W D. Long-term potentiation in spinothalamic neurons[J]. *Brain Res Brain Res Rev*, 2002, 40(1-3): 202-214.
- [30] ROBINSON D A, ZHUO M. Glutamatergic synapses serve as potential targets for controlling persistent pain[J]. *Curr Anaesth Crit Care*, 2002, 13(6): 321-327.
- [31] YAMANAKA M, MATSUURA T, PAN H, et al. Calcium-stimulated adenylyl cyclase subtype 1 (AC1) contributes to LTP in the insular cortex of adult mice[J]. *Heliyon*, 2017, 3(7): e338.
- [32] 湛凌燕, 陈冬建, 吴智兵. 神经元调控因子NMDA受体与GABA受体在升降散治疗大鼠神经病理性疼痛中的作用[J]. *辽宁中医杂志*, 2018, 45(10): 2203-2206.

【责任编辑：侯丽颖】

应用DNA提取改良和二次聚合酶链反应技术检测乌头及其炮制品

朱高倩^{1,2,3}, 李双良^{1,2,3}, 马莉^{1,2,3}, 周培军^{1,2,3}, 蒲星宇^{1,2,3}, 王丽^{1,2,3}, 符德欢^{1,2,3}

(1. 云南省药物研究所, 云南昆明 650111; 2. 云南白药集团创新研发中心, 云南昆明 650111;

3. 云南省中药和民族药新药创制企业重点实验室, 云南昆明 650111)

摘要:【目的】筛选适用于9种乌头属植物根茎炮制前后DNA提取的方法。【方法】采用基于十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)法、十二烷基硫酸钠(SDS)法的12种改良方法提取9种乌头属植物根茎炮制前后DNA, 考察提取缓冲液种类、聚乙烯吡咯酮(PVP)添加、水浴时间、DNA沉降方式对乌头属植物根茎炮制前后DNA提取的影响, 以及二次聚合酶链反应(PCR)技术对乌头炮制品ITS2片段浓度提高的影响。【结果】不同缓冲液与水浴时间互作提取DNA效应不同, 2×CTAB(含2.5 mol/L NaCl)水浴3 h提取的9种乌头生品DNA的ITS2扩增效果最佳, 2×CTAB(含1.4 mol/L NaCl)水浴3 h提取的9种乌头炮制品DNA的ITS2扩增效果最佳。添加PVP或添加PVP+改变DNA沉降方式对生品DNA提取影响不大, 但对炮制品有明显的抑制

收稿日期: 2020-03-16

作者简介: 朱高倩(1988-), 女, 工程师; E-mail: zhugaoqian@163.com

通讯作者: 符德欢(1976-), 男, 正高级工程师; E-mail: fudehuan@126.com

基金项目: 云南省应用基础研究计划项目(编号: 2017FD234); 云南省重大科技专项(农业)(编号: 2017AB005)

作用。经过二次PCR可显著提高炮制品ITS2的扩增效率。【结论】提取缓冲液和水浴时间的有效互作提取DNA以及二次PCR技术的应用可提高乌头属植物根茎ITS2片段制备效率,为DNA条形码技术广泛应用于乌头属药材提供必要的技术支持。

关键词: 乌头属; 炮制; DNA提取; 二次PCR; ITS2

中图分类号: R285.2

文献标志码: A

文章编号: 1007-3213(2021)02-0385-07

DOI: 10.13359/j.cnki.gzxbtem.2021.02.029

Detection of *Aconitum* Materials and Its Processed Products Using Improved DNA Extraction and Two-time PCR

ZHU Gao-Qian^{1,2,3}, LI Shuang-Liang^{1,2,3}, MA Li^{1,2,3}, ZHOU Pei-Jun^{1,2,3},
PU Xing-Yu^{1,2,3}, WANG Li^{1,2,3}, FU De-Huan^{1,2,3}

(1. Yunnan Institute of Materia Medica, Kunming 650111 Yunnan, China; 2. Yunnan Bai Yao Group Innovation, Research and Development Center, Kunming 650111 Yunnan, China; 3. Yunnan Provincial Company Key Laboratory for Traditional Chinese Medicine and Ethnic Drug of New Drug Creation, Kunming 650111 Yunnan, China)

Abstract: Objective To establish a method for extracting DNA from the rhizomes of 9 kinds of *Aconitum* plants before and after preparing. **Methods** Twelve modified methods based on cetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB) method and sodium dodecyl sulfate (SDS) method were used for extracting DNA from the rhizomes of 9 kinds of *Aconitum* plants before and after preparing. It was investigated that the effects of extracting buffer variety, polyvinyl pyrrolidone (PVP) addition, water-bath time, and DNA sedimentation mode on DNA extraction from the rhizomes of 9 kinds of *Aconitum* plants before and after preparing, and the effects of two-time polymerase chain reaction (PCR) technology on concentration increase of ITS2 fragments in *Aconitum* preparing products. **Results** The DNA extraction efficiencies were different using interactions of various extracting buffers with water-bath time. It was the best for PCR amplification efficiency on ITS2 in DNA extracted from the crude medicinal materials of 9 kinds of *Aconitum* plants by 2×CTAB (containing 2.5 mol/L NaCl) with 3-hour water bath, and from the preparing products of 9 kinds of *Aconitum* plants by 2×CTAB (containing 1.4 mol/L NaCl) with 3-hour water bath. PVP addition or interactions of PVP addition with alternative DNA sedimentation mode has little impact on extracting DNA from crude medicinal materials, but has obvious inhibiting effect on preparing products. The application of two-time PCR promoted the amplification efficiency on ITS2 from preparing products. **Conclusion** Use of the effective interactions of extracting buffer with water-bath time for DNA extraction and application of two-time PCR technology has effects on promoting preparation efficiency on ITS2 fragments from the rhizomes of *Aconitum* plants, contributing to providing necessary technical support for DNA barcoding technology application for *Aconitum* medicinal materials.

Keywords: *Aconitum*; preparing (herbal medicine); DNA extraction; two-time PCR; ITS2

乌头类药物有较为悠久的传统用药历史,具有祛风除湿、温经止痛等功效,广泛应用于风湿麻痹、关节疼痛等临床治疗中,在各类成药制剂、药材标准中占比较大^[1]。该类药材均来自毛茛科(Ranunculaceae)乌头属(*Aconitum*)植物根茎。乌头属种类繁多,分布广泛,全球约有350种,我国约有167种^[2],仅云南省境内就有约66种,25变种,4变型^[3]。《中华人民共和国药典》2000年版、

2005年版、2010年版、2015年版等标准均有记载乌头类药材^[4-7]。《中华本草》记载了60多种乌头属植物可入药^[8]。目前,《云南省中药材标准》收录的乌头类药材仅有黄草乌一种^[9],但当地民间还将乌头属其他种也当作乌头类药材使用。目前,有些非国标或非省标的乌头属植物被盲目栽培,市场上充当国标或省标药材销售,难以通过产地判断乌头属药材的基原,市场上充斥了大量以国标

或省标正品名销售的混伪品, 加之乌头属种间的化学成分种类、含量可能会存在差异^[10-12], 炮制前混杂的品种经过统一的炮制方法炮制后, 导致有效成分(或有毒成分)含量可能不在预期范围内, 进而导致入药后无效、低效或中毒。

目前, 对于乌头属药材的鉴别, 单纯通过性状、显微、理化等方法已不能满足市场药材种源鉴定的需求, 研究发现, ITS、psbA-trnH对乌头属植物具有一定的鉴别能力^[13-14]。2015年版《中华人民共和国药典》首次收录了“中药材DNA条形码分子鉴定法指导原则”, 植物类中药材选用ITS2/ITS为主体序列, 以叶绿体psbA-trnH为辅助序列^[7]。而DNA条形码技术的应用成功与否取决于DNA的成功提取和PCR的成功扩增。乌头作为重要药材, 其入药的关键即经过炮制, 需“用水浸泡至内无干心, 加水煮至取大个切开内无白心”^[7], 长时间的水煮会使DNA严重降解^[15-16], 加之乌头药用部位富含淀粉、多糖等成分也会干扰DNA提取^[7], 使得乌头属炮制品PCR扩增难以有效实现, 从而影响DNA条形码技术在乌头药材鉴定的应用。因此, 在DNA提取方面, 本研究从细胞裂解阶段和DNA沉淀阶段入手, 基于十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)法^[18]和十二烷基硫酸钠(SDS)法^[19], 并参考前人研究所获得的DNA提取改良方式^[17, 20], 对乌头属药用部位炮制前后DNA提取方法进行系统分析, 从裂解液类型、水浴时间、沉淀方式等方面进行改良比较。在PCR扩增方面, 将应用于临床上提高基因扩增效率的二次PCR扩增技术^[21-22]在炮制品DNA的PCR扩增中进行尝试, 旨在探索对乌头属植物炮制前后样品DNA提取和PCR扩增适用性较好的方法, 以期为产地、市场乌头类药材生品、炮制品的基原检测提供有效的技术支持, 现将研究结果报道如下。

1 材料与方 法

1.1 药材 研究材料包括9种乌头根茎生品和对应的炮制品, 其中炮制品参照2015年版《中华人民共和国药典》“制川乌”【制法】进行炮制, 凭证标本由中国科学院华南植物园杨亲二研究员鉴定, 标本保存于云南省药物研究所标本馆中。具体采集信息见表1。

1.2 试剂 CTAB缓冲液(含1.4 mol/L NaCl): 100 mmol/L Tris-HCl (pH8.0)、1.4 mol/L NaCl、

表1 9种乌头属植物采集信息表
Table 1 Collection information of 9 kinds of *Aconitum* plants

序号	中文名	拉丁名	采集地
1	玉龙乌头	<i>Aconitum stapfianum</i> Hand.-Mazz.	云南省玉龙县
2	中甸乌头	<i>Aconitum piepunense</i> Hand.-Mazz.	云南省香格里拉市
3	马耳山乌头	<i>Aconitum delavayi</i> Franch.	云南省大理州鹤庆县
4	石膏山乌头	<i>Aconitum rockii</i> Fletcher et Lauener var. <i>fengii</i> (W.T.Wang) W.T.Wang	云南省香格里拉市
5	瓜叶乌头	<i>Aconitum hemsleyanum</i> Pritz.	云南省玉龙县
6	长喙乌头	<i>Aconitum georgei</i> Comber.	云南省宁蒗县
7	黄草乌	<i>Aconitum vilmorinianum</i> Kom.	云南省玉龙县
8	直缘乌头	<i>Aconitum transsectum</i> Diels.	云南省玉龙县
9	短柄乌头	<i>Aconitum brachypodium</i> Diels.	云南省昆明市

20 mmol/L EDTA (pH8.0)、2% CTAB; CTAB缓冲液(含2.5 mol/L NaCl): 100 mmol/L Tris-HCl (pH8.0)、2.5 mol/L NaCl、20 mmol/L EDTA (pH8.0)、2% CTAB; 1% SDS; 100 mmol/L Tris-HCl (pH8.0)、10 mmol/L EDTA (pH8.0)、0.1 mol/L NaCl、1% SDS; 植物基因组DNA快速抽提试剂盒(上海生工公司, 产品编号: B518231); 异丙醇、2 mol/L 醋酸铵(NH₄Ac)、无水乙醇、1×TAE缓冲液、BIOWEST G-10琼脂糖、花青素核酸染料均购自上海生工公司; 2×Es TaqMasterMix (Dye)购自康为世纪公司。

1.3 仪器 EYELA NTT-2000水浴锅; Eppendorf Mastercycler PCR扩增仪; 北京六一DYY-6C型电泳仪; Eppendorf Centrifuge 5418离心机; ZF-258全自动凝胶成像分析系统。

1.4 实验方法

1.4.1 实验设计 采用基于CTAB法^[18]和SDS法^[19]的12种改良方法对9种乌头生品和炮制品进行DNA提取, 方案设计见表2。

1.4.2 DNA提取 ①将9种乌头根茎生品或炮制品研磨成细粉, 取20 mg左右样品进行提取。②加入表2中1~12的提取缓冲液1 mL, 添加(+)或不添加(-)聚乙烯吡咯烷酮(PVP40)至终浓度1%, 65℃水浴1 h或3 h。③以12 000×g离心5 min, 取上清液, 加入等体积氯仿:异戊醇(24:1)重复4次, 以8 000×g离心10 min。④取上清液, 加入等体积异丙醇或5倍体积无水乙醇+1倍体积2 mol/L NH₄Ac, 颠倒混匀。⑤于4℃或-20℃过夜沉降反应。⑥以13 000×g离心15 min。⑦沉淀干燥后加入100 μL ddH₂O溶解备用。

表2 乌头生品和炮制品DNA提取的12种方法方案设计
Table 2 Designs for 12 kinds of methods for extracting DNA from crude and preparing products of *Aconitum*

序号	提取缓冲液	质量分数1% 聚乙烯吡咯 烷酮(PVP)	水浴 时间 (h)	DNA 沉降 方式
1	2×CTAB(1.4 mol/L NaCl)	-	1	异丙醇, -20℃
2	2×CTAB(2.5 mol/L NaCl)	-	1	异丙醇, -20℃
3	1% SDS	-	1	异丙醇, -20℃
4	2×CTAB(1.4 mol/L NaCl)	-	3	异丙醇, -20℃
5	2×CTAB(2.5 mol/L NaCl)	-	3	异丙醇, -20℃
6	1% SDS	-	3	异丙醇, -20℃
7	2×CTAB(1.4 mol/L NaCl)	+	3	异丙醇, -20℃
8	2×CTAB(1.4 mol/L NaCl)	+	3	乙醇+NH ₄ Ac, 4℃
9	2×CTAB(2.5 mol/L NaCl)	+	3	异丙醇, -20℃
10	2×CTAB(2.5 mol/L NaCl)	+	3	乙醇+NH ₄ Ac, 4℃
11	1% SDS	+	3	异丙醇, -20℃
12	1% SDS	+	3	乙醇+NH ₄ Ac, 4℃

“+”: 处理; “-”: 未处理

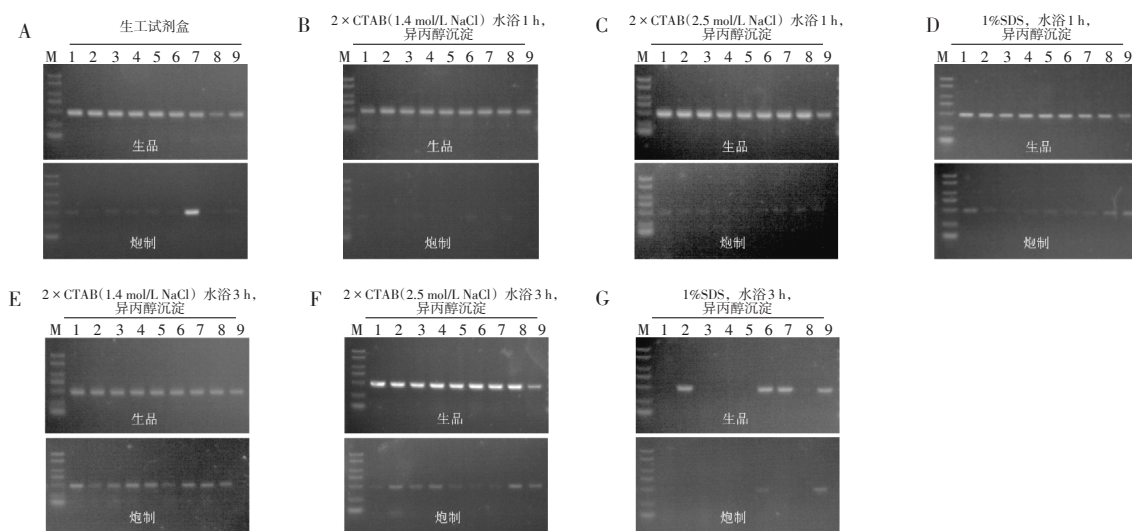
1.4.3 PCR 扩增 提取的DNA用ITS2F/ITS2R进行PCR扩增检测。正向引物ITS2F: 5'-ATGCGA TACTTGGTGTGAAT-3'; 反向引物ITS2R: 5'-G ACGCTTCTCCAGACTACAAT-3'。引物由上海生

工合成。PCR反应体系为20 μL, 包括ITS2F 0.1 μL、ITS2R 0.1 μL、2×Es TaqMasterMix (Dye) (康为世纪公司) 10 μL、ddH₂O 8.8 μL、DNA模板 1 μL。在Eppendorf Mastercycler PCR仪上设定程序: 94℃预变性5 min, 35个循环(循环条件为94℃变性30 s, 55℃退火30 s, 72℃延伸40 s), 72℃终延伸10 min。PCR完成后, 制作1.5%琼脂糖凝胶, 取5 μL PCR产物进行琼脂糖凝胶电泳分离, 紫外灯检测。二次PCR是将上述PCR反应体系中的DNA模板更换为第一次PCR产物以相同的PCR反应条件进行第二次PCR即可。

1.4.4 改良方法的比较 以试剂盒(上海生工公司, 产品编号: B518231)提取DNA的PCR扩增产物琼脂糖凝胶电泳检测结果作为参照, 比较12种改良方法提取DNA的PCR扩增效果的优劣。

2 结果与分析

2.1 不同缓冲液与水浴时间互作对DNA提取的影响 具体结果见图1。利用2×CTAB(含1.4 mol/L或2.5 mol/L NaCl)、1%SDS、生工试剂盒等4种缓冲液对9种乌头属植物根茎生品和炮制品DNA进行提取(异丙醇沉淀DNA), 提取的DNA利用ITS2F/



A. 生工试剂盒提取乌头属生品和炮制品DNA的PCR扩增结果; B~D. 2×CTAB(含1.4 mol/L或2.5 mol/L NaCl)和1%SDS水浴1 h提取乌头属生品和炮制品DNA的PCR扩增结果; E~G. 2×CTAB(含1.4 mol/L或2.5 mol/L NaCl)和1%SDS水浴3 h提取乌头属生品和炮制品DNA的PCR扩增结果

注: M为分子量标准, 从上至下对应的分子量分别为2 000、1 500、1 000、750、500、250、100 bp; 1~9代表9种乌头属植物根茎生品和炮制品: 1. 玉龙乌头; 2. 中甸乌头; 3. 马耳山乌头; 4. 石膏山乌头; 5. 瓜叶乌头; 6. 长喙乌头; 7. 黄草乌; 8. 直缘乌头; 9. 短柄乌头

图1 不同缓冲液与水浴时间互作提取DNA比较

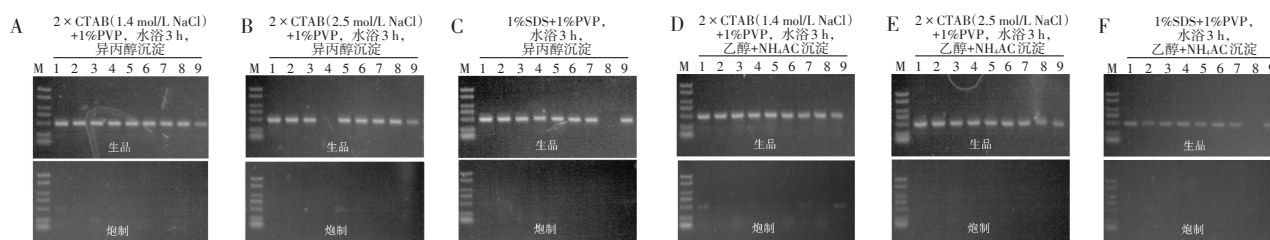
Figure 1 Comparison of DNA extraction using interactions of various extraction buffers with different water-bath time

ITS2R进行PCR扩增,琼脂糖凝胶检测,以试剂盒的提取效果为对照(见图1-A)。结果表明:不同缓冲液与水浴时间互作效应不同,2×CTAB(含1.4 mol/L或2.5 mol/L NaCl)水浴1 h或3 h、1%SDS水浴1 h提取的生品DNA均可成功扩增ITS2片段,其中2×CTAB(含2.5 mol/L NaCl)水浴3 h提取的9种乌头生品DNA的ITS2扩增效果最佳,见图1-B~F;1%SDS水浴1 h、2×CTAB(含2.5 mol/L NaCl)水浴1 h、2×CTAB(含1.4 mol/L或2.5 mol/L NaCl)水浴3 h提取的炮制品DNA均可扩增浓度相对较低的ITS2片段,其中,2×CTAB(含1.4 mol/L NaCl)水浴3 h提取的9种乌头生品DNA的ITS2扩增效果最佳,见图1-C~F。

2.2 1%PVP对DNA提取的影响 在2×CTAB(含1.4 mol/L或2.5 mol/L NaCl)、1%SDS缓冲液中添加1%PVP,对9种乌头属植物根茎生品和炮制品DNA进行提取,提取的DNA利用ITS2F/ITS2R进行

PCR扩增,琼脂糖凝胶电泳检测。结果表明,添加PVP对生品DNA提取影响不大,但对炮制品有明显的抑制作用。其中,添加PVP后提取的8~9种乌头生品DNA均能成功扩增ITS2片段,而乌头炮制品均未检测到明显的ITS2片段。见图2-A~C。

2.3 1%PVP和DNA沉降方式互作对DNA提取的影响 在2×CTAB(含1.4 mol/L或2.5 mol/L NaCl)、1%SDS缓冲液中添加1%PVP对9种乌头属植物根茎生品和炮制品DNA进行提取,乙醇+NH₄Ac沉降DNA,提取的DNA利用ITS2F/ITS2R进行PCR扩增,琼脂糖凝胶电泳检测。结果表明,添加1%PVP+乙醇+NH₄Ac沉降DNA对生品DNA提取影响不大,但对炮制品有明显的抑制作用。其中,添加1%PVP且进行乙醇+NH₄Ac沉降DNA后,提取的8~9种乌头生品DNA均能成功扩增ITS2片段,而乌头炮制品均未检测到明显的ITS2片段。见图2-D~F。



A~C. 2×CTAB(含1.4 mol/L或2.5 mol/L NaCl)或1%SDS、添加1%PVP、水浴3 h、异丙醇沉淀提取乌头属生品和炮制品DNA的PCR扩增结果; D~F. 2×CTAB(含1.4 mol/L或2.5 mol/L NaCl)或1%SDS、1%PVP、乙醇+NH₄Ac沉淀提取乌头属生品和炮制品DNA的PCR扩增结果

注: M为分子量标准,从上至下对应的分子量分别为2 000、1 500、1 000、750、500、250、100 bp; 1~9代表9种乌头属植物根茎生品和炮制品: 1.玉龙乌头; 2.中甸乌头; 3.马耳山乌头; 4.石膏山乌头; 5.瓜叶乌头; 6.长喙乌头; 7.黄草乌; 8.直缘乌头; 9.短柄乌头

图2 PVP和DNA沉降方式对乌头生品和炮制品DNA提取的影响

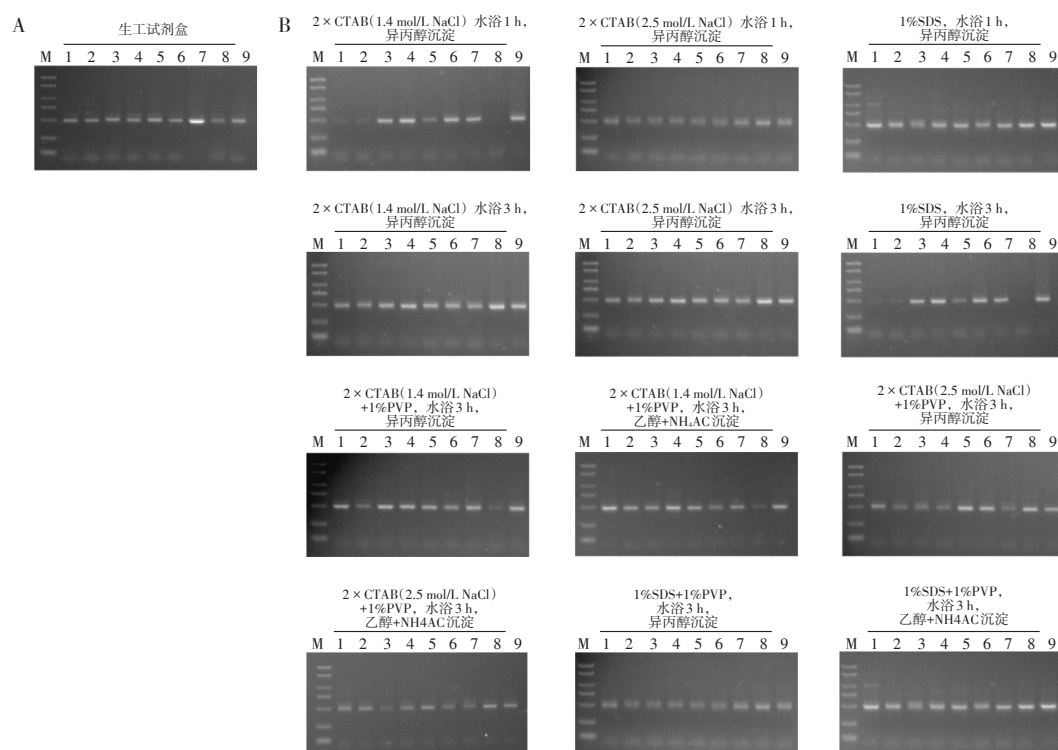
Figure 2 Effects of PVP and DNA sedimentation modes on DNA extraction from crude and preparing products of *Aconitum*

2.4 乌头炮制品的ITS2片段二次PCR 对上述12种方法提取的炮制品DNA用ITS2F/ITS2R进行一次PCR后,以PCR产物为模板进行ITS2位点的二次PCR,琼脂糖凝胶电泳检测。结果表明,除了2×CTAB(含1.4 mol/L NaCl)水浴1 h和1%SDS水浴3 h+异丙醇沉淀方法,生工试剂盒和其他10种方法提取的乌头炮制品DNA均可通过二次PCR显著提高ITS2扩增产物浓度。见图3。

3 讨论

3.1 乌头生品和炮制品DNA提取方法改良 DNA

提取为乌头药材分子鉴定的第一步,其成功与否直接决定了后续的鉴定程序能否正常进行。在乌头药材产地、市场或企业多以经过长时间蒸煮后的乌头炮制品入药,这类材料的DNA提取难度远大于叶片或干燥生药。本研究采用基于CTAB和SDS的改良方法对9种乌头的生品和炮制品的DNA提取进行了较为系统的研究。结果表明,不同水浴时间与不同缓冲液结合对提取乌头生品和炮制品DNA有较大影响,筛选出2×CTAB(含2.5 mol/L NaCl)水浴3 h提取乌头生品DNA的ITS2片段扩增效果最好,而2×CTAB(含1.4 mol/L NaCl)水浴3 h



A. 试剂盒提取乌头属炮制品 DNA 的二次 PCR 扩增结果；B. 12 种方法提取乌头属炮制品 DNA 的二次 PCR 扩增结果

注：M 为分子量标准，从上至下对应的分子量分别为 2 000、1 500、1 000、750、500、250、100 bp。1~9 代表 9 种乌头属植物根茎炮制品：1. 玉龙乌头；2. 中甸乌头；3. 马耳山乌头；4. 石膏山乌头；5. 瓜叶乌头；6. 长喙乌头；7. 黄草乌；8. 直缘乌头；9. 短柄乌头

图3 乌头炮制品的ITS2片段二次PCR

Figure 3 Two-time PCR for ITS2 fragments in preparing products of *Aconitum*

提取乌头炮制品 DNA 的 ITS2 片段扩增效果相对较好。该结果与崔红光等^[17]观点一致。本研究中的生品和炮制品也需要 CTAB 法结合较长时间水浴来提高 DNA 得率，这与乌头药材本身特性有关。作为根茎类药材，富含纤维、淀粉等物质，适当延长水浴时间可使其组织、细胞得到充分裂解，从而释放核酸。而乌头生品和炮制品对 CTAB 缓冲液中 NaCl 浓度的反应不同，NaCl 浓度为 1.4 mol/L 时更适于提取乌头炮制品 DNA，而升高至 2.5 mol/L 时适合乌头生品。在药材 DNA 提取中高盐溶液的应用是为了去除其中的淀粉、多糖等物质^[17,23]，本研究结果进而间接说明乌头生品经过蒸煮后，除了次生代谢产物(生物碱或非生物碱成分)均有了较大的变化^[24-25]，其结构物质如淀粉、多糖类等物质也发生了变化。另外，添加 1% PVP 或者添加 1% PVP 并改变 DNA 沉降方式对乌头生品和炮制品 DNA 提取有不同程度的抑制作用。前人在 DNA 提取过程中添加 PVP 浓度各有不同，如在提取富含

多酚、多糖等次生物质的药用植物新鲜叶片使用 1% PVP 结合 0.2% β -巯基乙醇可有效去除杂质和防止 DNA 降解^[26]，而在提取升麻、椴木、木香、乌药、芍药和木通等根茎类药材 DNA 时则在 2% CTAB 中加入 PVP 至终浓度 6%^[27]。本研究结果显示 1% PVP 产生了抑制作用，说明 1% PVP 可能不适合提取乌头生品和炮制品 DNA。虽然前人使用乙醇+NH₄Ac 可抑制小片段和低浓度的 DNA 分子在延长的低温保存中形成盐沉淀物^[28]，但在本研究未显现出乙醇沉降的优势，原因可能在于 1% PVP 的不当比例影响了乙醇沉降的作用。

3.2 二次 PCR 提高乌头炮制品 DNA 扩增敏感性

本研究中乌头炮制品提取的 DNA 扩增结果均不理想，即使是相对较好的方法[2×CTAB(含 1.4 mol/L NaCl)水浴 3 h]提取的炮制品 DNA 扩增的 ITS2 片段浓度与生品比较还是较低的。若要进行后续的测序等反应，浓度一定是达不到的。目前，二次 PCR 多用于临床检测扩增量少的标本或是极微量

DNA 标本供后续 SSCP 和 DNA 测序分析, 或是加工食品中成分的核酸检测, 此方法的敏感性明显高于一次 PCR^[22, 29-31]; 但二次 PCR 在药材物种鉴定中还尚未见有报道。本研究中的乌头炮制品是由生品经过长时间蒸煮获得的, 其中的 DNA 降解程度远超干燥生品, 本研究通过二次 PCR 可以明显提高乌头炮制品 DNA 扩增量, 减少 DNA 中杂质对 PCR 的影响, 使其后续的测序等试验得以顺利进行。

参考文献:

- [1] 李娅萍, 田颂九, 王国荣. 乌头类药物的化学成分及分析方法概况[J]. 2001, 26(10): 659-662.
- [2] 中国科学院《中国植物志》编委会. 中国植物志: 第27卷[M]. 北京: 科学出版社, 1979: 113.
- [3] 中国科学院昆明植物研究所. 云南植物志: 第11卷[M]. 北京: 科学出版社, 2000: 51-108.
- [4] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[S]. 北京: 化学工业出版社, 2000: 28, 29, 149, 189.
- [5] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[S]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 26, 27, 132, 163.
- [6] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 36, 37, 177, 220.
- [7] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 39, 40, 236, 237, 191.
- [8] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草: 第三册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999: 95-151.
- [9] 云南省食品药品监督管理局. 云南中药材标准: 第七册[S]. 昆明: 云南科技出版社, 2013: 69.
- [10] 乌力吉特吉斯, 高艳红, 黄冬梅, 等. 乌头属植物化学成分研究进展[J]. 中国民族医药杂志, 2008(4): 68-72.
- [11] 艾嫦, 朱妍妍, 赵长琦. 乌头属植物化学成分、药理作用及其内生菌的研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2012, 24: 248-259.
- [12] 李谦, 过立农, 郑健, 等. 乌头属药用植物的研究进展[J]. 药物分析杂志, 2016(7): 1129-1149.
- [13] 罗艳, 杨亲二. 川乌与草乌的 ITS 序列分析[J]. 中国药学杂志, 2008, 43(11): 820-823.
- [14] HE J, WONG K L, SHAW P C, et al. Identification of the medicinal plants in *Aconitum* L. by DNA barcoding technique[J]. *Planta Med*, 2010, 76: 1622-1628.
- [15] 黄娅琳. 高温烹饪对动物肌肉组织 DNA 降解的影响[J]. 四川动物, 2012, 31(2): 222-225.
- [16] 陈颖, 王媛, 徐宝梁, 等. 食品加工工艺对大豆内源基因降解变化规律的影响[J]. 中国粮油学报, 2005, 20(4): 60-64.
- [17] 崔光红, 唐晓晶, 黄璐琦. 含淀粉及多糖类中药材 DNA 的提取方法研究[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(16): 1365-1367.
- [18] ROGER S O, BENDICH A J. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues [J]. *Plant Mol Biol*, 1985, 5(2): 69-76.
- [19] DELLAPORTA S L, WOOD J, HICKS J B. (1983) A plant DNA miniprep: version II [J]. *Plant Mol Bio Rep*, 1983, 1: 19-21.
- [20] 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): 1081-1090.
- [21] 余伍忠, 周常文, 郝小军, 等. 应用二次 PCR 技术提高体外基因扩增的效率[J]. 西北国防医学杂志, 1993(1): 40-41.
- [22] 陈鑫莘, 符生苗. 二次 PCR 在临床上的应用[J]. 中国优生与遗传杂志, 2000(6): 42-53.
- [23] WULFF E G, TORRES S, GONZALES V E. Protocol for DNA extraction from potato tubers [J]. *Plant Mol Biol Rep*, 2002, 20(2): 187.
- [24] 王毓杰, 张静, 田会萍, 等. 民族药铁棒锤炮制减毒原理初步研究[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(5): 588-592.
- [25] 王艳. 黄草乌药材非生物碱成分及其炮制前后对比研究[D]. 昆明: 云南中医学院, 2016.
- [26] 段中岗, 黄琼林, 杨锦芬, 等. 适合中药材 DNA 条形码分析的 DNA 提取方法的研究[J]. 中药新药与临床药理, 2009, 20(5): 480-484.
- [27] 李晓波, 冯波, 张朝晖, 等. 植物药材总 DNA 提取[J]. 中草药, 2002, 33(7): 652-654.
- [28] ZEUGIN J A, HARTLEY J L. DNA precipitation in the presence of ammonium acetate[J]. *Focus*, 1982, 4: 12.
- [29] 张海添, 陆云飞, 李卫, 等. 多重二次 PCR 在微量 DNA 标本检验中的应用[J]. 广西医科大学学报, 2002, 19(6): 799-800.
- [30] 吕雪莲, 刘泽虎, 梅亚宁, 等. 二次 PCR 用于临床标本真菌感染快速分子诊断的研究[J]. 中华皮肤科杂志, 2009, 42(6): 390-392.
- [31] 徐慧, 马慧娟. 动物源性食品鸭血中鸭成分普通 PCR 检测方法探究[J]. 食品安全导刊, 2018(8): 60-61.

【责任编辑: 侯丽颖】