



# 鹿骨类药材 DNA 提取方法研究

赵静雪<sup>1</sup>, 陈敏<sup>2</sup>, 崔光红<sup>2</sup>, 唐仕欢<sup>2</sup>, 黄璐琦<sup>2\*</sup>, 何利群<sup>3</sup>, 夏瑞雪<sup>3</sup>

(1. 首都医科大学 中医药学院, 北京 100069;

2. 中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700;

3. 哈尔滨誉衡药业股份有限公司, 黑龙江 哈尔滨 150025)

**[摘要]** 目的:建立一种简便、实用、高效的鹿骨 DNA 提取方法,为动物骨类药材真伪鉴别奠定基础。方法:取净制后的梅花鹿骨、马鹿骨、牛骨、狗骨、猪骨样品,经干燥、研磨粉碎后,对脱钙时间(24,48,72 h),脱钙温度(4,25,37,56,70 ℃)及不同提取方法(改良 SDS 提取法、试剂盒提取法)进行考察,分析比较不同提取方法获得的 DNA 质量。结果:实验证明,脱钙过程有助于骨细胞的裂解,在较宽泛的脱钙时间及脱钙温度下,均可从骨细胞中获得 DNA,但提取量稍有差异。结论:骨粉经 0.5 mol·L<sup>-1</sup> EDTA 脱钙液 4 ℃ 脱钙 24 h,加入裂解液后 56 ℃ 水浴 1 h,即可从鹿骨(约 0.1 g)中提取到高质量 DNA,用于 PCR 扩增。

**[关键词]** 鹿骨; 脱钙; DNA 提取; 方法优化

鹿骨类药材来源于鹿科动物梅花鹿 *Cervis Nippon* Temminck 或马鹿 *C. elaphus* Linnaeus 的干燥骨骼,具有补虚润筋,强肉坚骨,固肾填髓等功效,始见于《苗根本草》<sup>[1]</sup>,历代本草也多有记载。在保健酒、胶囊、注射剂、丸剂、片剂等制剂中,鹿骨类药材有较为广泛的应用。

骨骼类药材经净制、去油、干燥、粉碎后,通过形态特征、显微、理化方式鉴别,如不具备相关性状的鉴别经验,难度较大。近年来,利用分子生物学技术,对动物药进行真伪鉴别是中药领域研究热点和难点之一。周秋丽等<sup>[2]</sup>根据梅花鹿茸、马鹿茸中所含多肽的化学组成及生物活性差异进行鉴别;唐任能等<sup>[3]</sup>根据梅花鹿鹿茸、鹿托盘及鹿骨水溶性总蛋白差异鉴定 3 种药材,但均未对鹿骨及其伪品进行研究。骨骼 DNA 提取在考古学、法医学方面应用广泛,材料常为年代久远或经高温焚烧的样品<sup>[4-5]</sup>,实验过程需要严格避免环境、试剂、耗材等污染问题,常利用专业试剂盒<sup>[6-8]</sup>提取,对实验条件、操作手法要求较高,提取成本大。陈群<sup>[9]</sup>等从新鲜大鼠骨组织中提取到 DNA,该方法虽可提取到大量 DNA,但耗时长,不适用于大样本量提取。骨骼脱钙在骨组

织切片中应用较为广泛<sup>[10-11]</sup>,脱钙条件在 DNA 提取过程中文献报道差异较大<sup>[12-14]</sup>。本实验以鹿骨为研究对象,利用 EDTA 脱钙液,考察不同脱钙温度、脱钙时间及提取方法对模板质量的影响,旨在建立一种简便、稳定、高效的骨骼类药材 DNA 提取方法。

## 1 材料

### 1.1 样品

梅花鹿骨(批号 10070201, 10070203, 10070204, 10070207, 10070208, 10070209),马鹿骨(批号 1009260101, 100926102, 1009260201, 1009260202, 1009260301, 1009260302),牛骨(3 批),猪骨(4 批),狗骨(3 批)均由哈尔滨誉衡药业股份有限公司宁夏工程师鉴定。

### 1.2 仪器与试剂

PCR 仪(德国 Eppendorf 公司);电泳系统(北京市六一仪器厂);高速离心机(德国 Eppendorf 公司);紫外凝胶成像分析仪(英国 Syngene 公司);混合型球磨仪(德国 Retsch 公司)。

DNA 提取试剂盒:① 血液/细胞/组织基因组 DNA 提取试剂盒(北京天根生化科技有限公司)② UNIQ-10 柱式动物基因组 DNA 提取试剂盒(上海生工生物工程有限公司);蛋白酶 K, DTT(美国 Promega 公司);DNA Ex Taq 聚合酶(大连宝生物工程有限公司);Tris 饱和酚,酚-氯仿,10% SDS,琼脂糖(上海生工生物工程有限公司);DL 2 000 Marker:从上至下为 2 000, 1 000, 750, 500, 250, 100 bp;电泳缓

[稿件编号] 20101123011

[基金项目] 中国中医科学院自主选题项目(Z20285)

[通信作者] \* 黄璐琦,研究员,博士生导师, Tel: (010) 64014411-2956, E-mail: huangluqi@263.net



冲液配制试剂 EDTA, Tris 为分子生物学级试剂; 冰醋酸为分析纯。

脱钙液 0.5 mol·L<sup>-1</sup> EDTA (pH 8.0)。

DNA 提取缓冲液: Tris-HCl (pH 8.0) 10 mmol·L<sup>-1</sup>, EDTA (pH 8.0) 10 mmol·L<sup>-1</sup>, NaCl 10 mmol·L<sup>-1</sup>, DTT 39 mmol·L<sup>-1</sup>。

## 2 方法

### 2.1 样品前处理

取净肉的梅花鹿、马鹿、狗、猪、牛四肢骨骨骼, 敲碎置于培养皿中, 分别用无菌水、乙醇、乙醚在脱色摇床上震摇 15 min, 洗去杂质及油脂, 于 50 °C 烘箱中干燥过夜, 利用球磨仪粉碎, 30 次/s, 3 min。

### 2.2 脱钙条件

**2.2.1 脱钙温度的考察** 样品分别置于 4, 25, 37, 56, 70 °C 5 种不同温度脱钙液中脱钙。

取 0.1 g 骨粉至 1.5 mL EP 管中, 加入脱钙液 1.2 mL 充分混悬, 分别在 4, 25, 37, 56, 70 °C 条件下静置 72 h, 3 000 r·min<sup>-1</sup>, 离心 15 min, 弃上清, 每 24 h 更换脱钙液 1 次。脱钙结束后沉淀用灭菌水洗, 3 000 r·min<sup>-1</sup>, 离心 15 min, 重复 1 次。利用碱裂解法提取脱钙处理后骨粉。

**2.2.2 脱钙时间的考察** 在确定的最佳脱钙温度下, 取 0.1 g 骨粉至 1.5 mL EP 管中, 加入脱钙液 1.2 mL, 分别脱钙 24, 48, 72 h, 后续具体操作同 2.2.1。

### 2.3 DNA 提取方法考察

**2.3.1 改良 SDS 提取法** 取 4 °C 条件下脱钙 24 h 骨粉 0.1 g 至 1.5 mL EP 管中, 加入 800 μL DNA 提取缓冲液, 充分混匀, 加入 50 μL 20 g·L<sup>-1</sup> 蛋白酶 K, 100 μL 10% SDS 混匀, 56 °C 水浴 1 h。样品冷却后, 加入等体积 Tris 饱和酚抽提, 12 000 r·min<sup>-1</sup>, 离心 10 min, 取上清液至一新 1.5 mL EP 管中, 再分别用酚-氯仿(25:24)、氯仿-异戊醇(24:1)抽提。将上层水相转移到另一离心管中, 加入 0.1 倍体积的 3 mol·L<sup>-1</sup> 乙酸钠(pH 5.2), 混匀后加入等体积异丙醇, -20 °C 沉淀 2 h, 12 000 r·min<sup>-1</sup>, 离心 10 min。沉淀分别用 70% 乙醇、无水乙醇洗 1 次, 加入 100 μL TE 或无菌水溶解。

**2.3.2 试剂盒提取法** 经脱钙处理鹿骨粉按天根试剂盒或上海生工试剂盒说明书步骤提取。

### 2.4 PCR 扩增及检测

利用通用引物 L14724 5'-CGAGATCT-

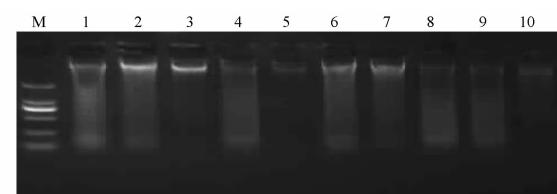
GAAAAACCATCGTTG-3' 和 H15149 5'-AAACTG-CAGCCCCCTCAGAACATGATATTGTCCTCA-3' 验证模板, 鉴别引物<sup>[15]</sup> 5'-GACCTCCCAGCCCCATCG-3' 和 5'-GCTGTGGCTATAACTGTAAATAGGAGG-3' 扩增 Cytb 基因片段区分正品鹿骨及伪品。引物由华大基因科技有限公司合成。PCR 反应总体积为 25 μL, 包括 10 × PCR 缓冲液 2.5 μL, dNTP(2.5 mmol·L<sup>-1</sup>) 2 μL, 鉴别引物(10 μmol·L<sup>-1</sup>)各 0.5 μL, 高保真 Taq DNA 聚合酶(5 U·L<sup>-1</sup>) 0.2 μL 和模板 0.5 μL, 用无菌双蒸水补足反应体积。通用引物 PCR 反应参数: 94 °C 预变性 5 min, 循环反应 35 次(94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 1 min), 72 °C 延伸 5 min; 鉴别引物 PCR 反应参数: 94 °C 预变性 5 min, 循环反应 35 次(94 °C 30 s, 58 °C 30 s, 72 °C 30 s), 72 °C 延伸 5 min。取 5 μL 反应液经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 至凝胶成像仪上成像。通用引物可对梅花鹿、马鹿、狗、猪、牛四肢骨 DNA 扩增出 425 bp 的条带, 鉴别引物可对梅花鹿、马鹿骨 DNA 扩增出 323 bp 的条带。

实验中阳性对照为梅花鹿肉提取所得 DNA 模板及其 PCR 扩增结果, 空白对照为不含模板的 PCR 反应液扩增产物。

## 3 结果

### 3.1 不同脱钙温度对鹿骨 DNA 提取结果的影响

以梅花鹿、马鹿为实验材料, 将等量骨粉分别在 4, 25, 37, 56, 70 °C 条件下脱钙 24 h, 利用改良 SDS 法提取 DNA 模板, DNA 提取及 PCR 扩增结果见图 1。实验证明, 不同脱钙温度下获得的 DNA 对 PCR 扩增及检测无影响, 模板纯度差异不大。随着温度的升高, DNA 提取量稍有降低, 故实验选择在 4 °C 条件下脱钙。



1,6. 4 °C; 2,7. 25 °C; 3,8. 37 °C; 4,9. 56 °C; 5,10. 70 °C;  
1~5. 梅花鹿; 6~10. 马鹿; M. Marker。

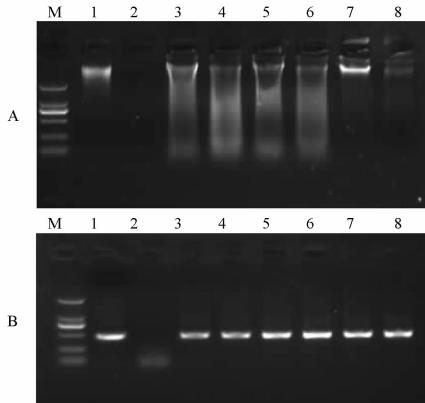
图 1 不同脱钙温度对鹿骨模板质量的影响

### 3.2 不同脱钙时间对鹿骨 DNA 提取结果的影响

取等量(约 0.1 g) 梅花鹿、马鹿骨粉各 3 份, 4



℃条件下分别脱钙24,48,72 h,利用改良SDS提取法提取鹿骨DNA。DNA提取及PCR扩增结果见图2。实验证明,脱钙时间的延长虽有助于骨细胞的裂解,但DNA提取率也稍有降低,鹿骨粉脱钙24 h即可提取到大量DNA。

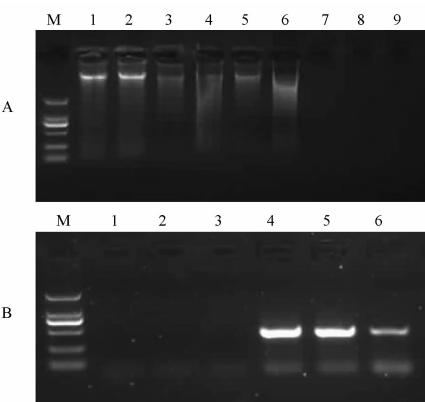


A. DNA提取;B. 通用引物PCR扩增;1. 阳性对照;2. 空白对照;3~5. 梅花鹿骨;6~8. 马鹿骨;3,6. 24 h;4,7. 48 h;5,8. 72 h;M. Maker。

图2 不同脱钙时间对鹿骨模板质量的影响

### 3.3 不同提取方法对DNA提取结果的影响

以梅花鹿骨为材料,取等量(约0.1 g)骨粉,分别利用改良SDS提取法、天根试剂盒及生工试剂盒提取未脱钙和4℃脱钙24 h的骨粉,DNA提取及通用引物PCR扩增结果见图3。



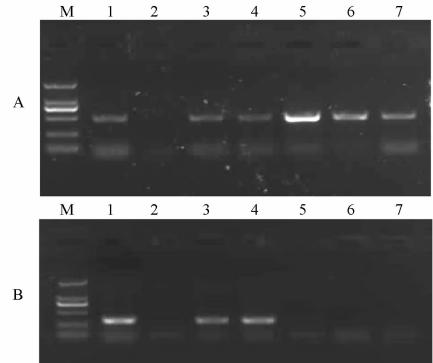
A. DNA提取;1,2,7. 改良SDS法提取;3,4,8. 天根试剂盒;5,6,9. 生工试剂盒;1~6. 脱钙处理;7~9. 未脱钙处理;B. 通用引物扩增;1~3. 未脱钙处理;4~6. 脱钙处理;1,4. 改良SDS法;2,5. 天根试剂盒;3,6. 生工试剂盒;M. Marker。

图3 不同前处理方法、提取方法对鹿骨模板质量的影响

实验证明,脱钙过程对DNA提取结果影响较大,以未脱钙骨粉为材料,DNA提取结果通用引物无阳性扩增。通过对脱钙条件的考察,以4℃脱钙24 h的骨粉提取效率最高。改良SDS提取法与试剂盒提取法提取的DNA模板均可用于PCR鉴别,改良SDS提取法DNA产率高于试剂盒提取法。

### 3.4 PCR扩增及检测结果

利用改良SDS法提取梅花鹿、马鹿、狗骨、猪骨、牛骨DNA,利用通用引物、鉴别引物进行扩增,见图4。各模板通用引物PCR扩增均有阳性条带,说明模板质量良好,可以进行PCR扩增;鉴别引物仅梅花鹿、马鹿骨出现阳性条带,因此利用该引物可以区分鹿骨及伪品(狗骨、猪骨、牛骨)。



A. 通用引物PCR扩增;B. 鉴别引物PCR扩增;1. 阳性对照;2. 空白对照;3. 梅花鹿骨;4. 马鹿骨;5. 狗骨;6. 猪骨;7. 牛骨。

图4 鹿骨类药材与伪品PCR鉴别

## 4 讨论

生物体各组织器官均含有相同的遗传信息,由于骨细胞不易裂解,DNA含量较低,鹿类药材分子鉴别常以鹿肉、鹿血、鹿茸、鹿鞭、鹿胎等为材料获得DNA模板,依照鳖甲、龟甲<sup>[16]</sup>、鹿茸类质地坚硬的动物类提取方法提取骨骼类药材,仍不能获得高质量DNA,目前尚未建立动物骨类药材DNA提取优化方法。骨组织由细胞和钙化的细胞外基质组成,其中骨盐占干骨重的65%,存在着大量的磷酸钙、碳酸钙和骨胶原等物质。实验证明,脱钙过程是利用该提取方法获得DNA的关键因素,未脱钙处理骨粉利用相同提取方法PCR扩增无阳性条带。作者分别对脱钙时间、脱钙温度进行考察,发现骨粉样品随脱钙温度升高,DNA提取量稍有降低,故确定鹿骨脱钙过程在4℃条件进行;文献报道脱钙时间多

为72 h,实验发现,随着脱钙时间的延长,可以更充分的软化骨粉,脱钙72 h可使骨细胞完全裂解,而长时间脱钙会造成DNA损失,故认为骨粉脱钙24 h即可进行后续提取步骤。

在DNA提取方法上,本实验分别利用改良SDS提取法及国产试剂盒(天根、生工)提取,加入裂解液56℃水浴1 h,即可进行后续提取步骤,水浴时间的延长对提取结果基本无影响。利用改良SDS提取法提取,骨粉经高温高压处理121℃,20 min后仍可提取到大量DNA,进一步验证了提取方法的可靠性,但该方法存在一些弊端,如操作步骤较多,提取时间较长等;试剂盒采用特殊吸附膜,通过裂解液释放基因组DNA,吸附柱吸附基因组DNA,经简单洗涤去除杂质,最终洗脱得到DNA产物,提取过程可以避免有机试剂对实验人员的伤害,耗时短且成本较低,虽纯度欠佳,但不影响PCR扩增及鉴别,如对模板质量要求不高且样本量大的情况下建议利用试剂盒提取。实验用2种试剂盒均可提取到大量DNA。

综上所述,骨骼类药材DNA提取过程中,因溶液钙离子浓度较高,对PCR反应有抑制作用<sup>[17]</sup>,因而有必要对骨粉进行脱钙处理。通过对脱钙时间、脱钙温度及提取方法的考察,确定最佳提取方法为骨粉4℃脱钙24 h,裂解液水浴1 h后提取。该方法具有样本取材少(仅0.1 g)、提取效率高、成本低等特点。骨组织脱钙处理常用于骨组织切片研究,利用0.5 mol·L<sup>-1</sup>EDTA(pH 8.0)处理骨粉,具有对组织破坏程度小,保持细胞完整结构<sup>[18]</sup>,抑制DNA酶活性等优点。较常见的脱钙方法还包括甲酸氯化铝<sup>[19]</sup>、盐酸<sup>[20]</sup>脱钙法,超声、微波脱钙法<sup>[21-22]</sup>,对不同脱钙方式对骨骼类样品DNA提取的影响,有待进一步研究。

[致谢] 哈尔滨誉衡药业股份有限公司提供的动物骨材料及相关资料。

#### [参考文献]

- [1] 王德顺. 药在食中:食物药用大众宝典[M]. 北京:清华大学出版社,2004:206.
- [2] 周秋丽,刘永强,王颖,等. 梅花鹿茸和马鹿茸多肽化学性质及生物活性比较[J]. 中国中药杂志,2001,26(10):699.
- [3] 唐任能,赵雨,孙晓迪,等. 梅花鹿鹿茸、鹿托盘及鹿骨水溶性总蛋白比较研究[J]. 中药现代化,2008,28(4):295.
- [4] 万诚,崔银秋,段然慧,等. 夏家店等古人骨DNA的提取、扩增及序列分析[J]. 中国生物化学与分子生物学报,2001,17(5):636.
- [5] 牛青山,辛阳,张璐,等. 微量检材DNA提取方法[J]. 中国法医学杂志,2005,20(2):96.
- [6] von Wurmb-Schwarz N, Heinrich A, Freudenberg M, et al. The impact of DNA contamination of bone samples in forensic case analysis and anthropological research[J]. Legal Med, 2008, 10(3):125.
- [7] Reidy K M, Gareis A, Sun D H, et al. Gender identification differences observed for DNA quantification versus STR genotyping of mummified human remains-how it relates to human identifications in forensic science[J]. Invest Sci J, 2009, 1(1):1.
- [8] Yang Y D, Eng B, Waye J S, et al. Technical note: improved DNA extraction from ancient bones using silica-based spin columns[J]. Amer J Phys Anthropol, 1998, 105:539.
- [9] 陈群,熊咏民,王治伦,等. 大鼠新鲜骨组织基因组DNA提取方法的建立[J]. 中国地方病学杂志,2005,24(4):449.
- [10] 温娜,唐泽波,王爽,等. 骨及钙化组织切片的复方脱钙液的配制及脱钙方法[J]. 中国医药导报,2008,5(27):116.
- [11] 陈世梁,卢志承,董玉英,等. 介绍一种改良脱钙液在骨组织制片中的应用[J]. 临床与实验病理学杂志,2009,25(5):557.
- [12] 赖旭龙,杨淑娟,唐先华,等. 仰韶文化人类遗骸古DNA的初步研究[J]. 地球科学——中国地质大学学报,2004,29(1):60.
- [13] 贾东涛,韩海军,张玉红,等. 陈旧骨骼DNA提取方法的应用研究[J]. 中国法医学杂志,2007,22(4):260.
- [14] Kuroski K, Matsushita T, Ueda S. Individual DNA identification from ancient human remains[J]. Am J Hum Genet, 1993, 53:638.
- [15] 王学勇,刘春生,张蓉,等. 位点特异性PCR方法的建立及对近源种鹿茸药材的鉴别研究[J]. 中国中药杂志,2009,34(23):3013.
- [16] 王亚明,周开亚,吴平,等. 中药材龟板和鳖甲中DNA的提取与扩增[J]. 药学学报,1996,31(6):472.
- [17] 李荣华,张林,吴梅筠,等. 一种改良的骨组织DNA提取方法[J]. 法律与医学杂志,2000,7(3):131.
- [18] 钱忠义,王维琦,郭萍,等. 一种可用于免疫组化的快速脱钙法[J]. 昆明医学院学报,2008,(2):174.
- [19] 魏国联,沈贵华,孙耘田. 一种用于制作骨骼组织切片的新脱钙液[J]. 临床与实验病理学杂志,2009,25(1):101.
- [20] 薛世泉,李红兵,王渝,等. 骨和牙切片的甲酸氯化铝脱钙液及脱钙方法[J]. 中华病理学杂志,2006,35(6):372.
- [21] 刘英群,祝莹颖,王铜,等. 微波和超声波对人牙齿脱钙效果的比较研究[J]. 中国地方病学杂志,2006,25(6):707.
- [22] 李玲,赵姨,曹湘玲,等. 室温、恒温与微波骨组织脱钙实验方法的比较[J]. 宁夏医学院学报,2008,30(3):396.



## Investigate of DNA extraction of os cervi

ZHAO Jingxue<sup>1</sup>, CHEN Min<sup>2</sup>, CUI Guanghong<sup>2</sup>, TANG Shihuan<sup>2</sup>, HUANG Luqi<sup>2\*</sup>, HE Liqun<sup>3</sup>, XIA Ruixue<sup>3</sup>

(1. College of Traditional Chinese Medicine, Capital Medical University, Beijing 100069, China;

2. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medicinal Sciences, Beijing 100700, China;

3. Harbin Gloria Pharmaceuticals Co., Ltd., Harbin 150025, China)

**[Abstract]** **Objective:** To establish a convenient, practical and high efficient method of DNA extraction of os cervi, and lay the foundation of identification of animal bones. **Method:** The bones of sika deer, red deer, cattle, dog and pig were used to extract DNA under different decalcification time (24, 48, 72 h) and decalcification temperature (4, 25, 37, 56, 70 °C), and extract method. **Result:** It proved by experiments that demineralization process promotes the cracking of osteocyte. In a broad of decalcification time and temperature, DNA could be extracted from all bone samples successfully while the quantity varied slightly. **Conclusion:** Samples (about 0.1 g) decalcify with 0.5 mol · L<sup>-1</sup> EDTA at 4 °C for 24 h, then water-bath for 1 h after lysis buffer added, DNA extracted via the method above is of high quality and can be used for PCR.

**[Key words]** os cervi; decalcification; DNA extraction; method optimization

doi:10.4268/cjcm20110331

[责任编辑 吕冬梅]

### 欢迎订购《当代药用植物典》丛书

《当代药用植物典》由香港浸会大学中医药学院赵中振教授及中国工程院肖培根院士主编。全书分为3篇共4册,分别为东方篇(第一及第二册)、西方篇(第三册)与岭南篇(第四册),涵盖800多种国际上常用药用植物,系统地收载了植物基原主要成分及其化学结构、药理、毒理、原植物及药材图片和临床资料。收集的资料信息量极大,不仅涉及到了生长于中国的草本植物,同时也涉及到许多生长在日本、韩国乃至欧美国家的草本植物,堪称国际天然药用草本植物之大成,融汇中西,与时俱进。

全书图文并茂,深入浅出,内容独到。书中药用草本植物的照片(实物照片)质量优良,不少是深入其原产地拍摄获得,十分珍贵,便于与药用草本植物实物进行鉴别比较。特别附有的中国、日本、韩国药典中的同名异物情况中英文对照表对在国际上规范药用草本植物名称及功用说明更是具有开创性的意义。书中药用植物名采用中英文对照的形式,加上药用草本植物的化学结构分析,用国际化的语言阐述草本植物的各个特性,可谓中西合璧,便于草本植物和中医药精神的进一步国际化。全书版式简洁,分类清楚,除为从事教育、医药、科研等方面的人士提供最新的参考资料外,亦可培养民众对中医药的兴趣及认识,普及中医知识和应用,是一套值得收藏的参考工具书。

丛书作者在行业内具有权威性,经验丰富,出版过多部中医药学等方面的中英文著作,在国际上具有广泛的影响力,其实力得到专业人士的认同。

《当代药用植物典》(简体版)荣获中国第七届(2007年度)输出版、引进版优秀图书奖。

定价:368.00元/册,全套定价1472元,订阅方式:邮局汇款。

汇款地址:北京市东城区东直门内南小街16号中国中药杂志社收,请注明书名(册)及订购数量,电话:010-64048925,联系人:程志铭。