

## 基于磁性微球的基因组核酸提取及其在中药材 真伪鉴别和亲缘关系分析中的应用

冉晓华, 曹菁菁, 毕研平, 万谦宏, 陈磊\*

(天津大学 药物科学与技术学院, 天津 300072)

**摘要:**为从分子水平上对中药材质量进行控制,基于磁性微球对中药材核酸进行纯化及后续生物鉴定,采用磁分离技术提取高纯度的核酸模板,以高磁响应性、粒径均一的超顺磁性四氧化三铁微球为固相载体,在聚乙二醇和氯化钠等的协同作用下,对根、茎、叶、花、果实、种子类中药材基因组核酸进行提取;分别提取丹参和柴胡的基因组核酸,并对其进行聚合酶链式反应扩增(PCR)和随机扩增多态性分析(RAPD),用于对丹参的真伪鉴别和对柴胡进行亲缘关系分析。结果表明:经提取,获得了纯度较高( $OD_{260\text{ nm}}/OD_{280\text{ nm}}$ 介于 1.6~2.0)的中药材核酸模板;通过扩增叶绿素 *rpl16* 基因片段,可有效鉴别丹参及其伪品牛蒡;采用 3 个有效随机引物,可从基因水平上分析 4 个柴胡品种的亲缘关系远近。

**关键词:**磁性微球;中药材;核酸提取;真伪鉴别;亲缘关系分析

中图分类号: Q527 文献标志码: A 文章编号: 1007-1032(2012)04-0385-07

## Surface modification of magnetic microspheres for genomic DNA extraction and its application in detection of traditional Chinese medicine and analysis of genetic diversity

RAN Xiao-hua, CAO Jing-jing, BI Yan-ping, WAN Qian-hong, CHEN Lei\*

(School of Pharmaceutical Science and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China)

**Abstract:** To control the quality of traditional Chinese medicine (TCM) at the molecular level, magnetic microspheres was utilized to extract and purify DNA from TCM for subsequent biological detection.  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  magnetic microspheres with high magnetic susceptibility, uniform particle size and superparamagnetism were applied in this study as solid absorbents to extract genomic DNA from different TCM samples, such as roots, stems, leaves, flowers, fruits and seeds. The prepared DNA was used in biological identification of Chinese herbal medicines by PCR and random amplified polymorphic DNA (RAPD) technology. Results showed that high-purity DNA ( $OD_{260\text{ nm}}/OD_{280\text{ nm}}$  ranged from 1.6 to 2.0) was obtained by solid-phase extraction with the magnetic microspheres; *Salvia miltiorrhiza* Bge. was distinguished from *Arctium lappa* L. by amplifying *rpl16* gene fragment; and three random primers could be used in RAPD analysis of four species of *Bupleurum*.

**Key words:** magnetic microspheres; traditional Chinese medicine (TCM); DNA extraction; distinguishing the genuine from sham TCM; genetic diversity analysis

随着分子生物学理论和试验技术的快速发展,在基因水平上对中药材进行分析已经成为常规手段<sup>[1-3]</sup>。基因分析准确性高,重现性好,不受样品

形态、生长发育阶段、供试部位、环境条件的限制,可用于对原药材、饮片、粉末乃至含有生药原型的中成药(丸剂、散剂)等进行分析。基因分析所需的

检样量少,对珍稀药材鉴定更具应用价值。中药材基因分析主要的两类基因技术(分子杂交和PCR法)都需要对基因组核酸进行后续限制性内切酶酶切或片段扩增,因此,获得高纯度的DNA模板是基因水平检测的关键。传统的DNA提取方法主要有十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)法和十二烷基磺酸钠(SDS)法,提取过程中包括多次有机溶剂抽提、醇沉淀和离心等步骤,不仅污染环境,费时费力,而且不易实现自动化。近年来,玻璃粉法、硅胶层析柱法等新兴固相提取法得到了大范围的商业化应用,但是多步离心操作不仅耗时长,而且不利于自动化操作。

磁分离技术的发展和磁性微球的出现给DNA提取带来了新的方法。以磁性微球为固相载体,从细胞裂解液中提取DNA的方法主要基于核酸在高浓度盐溶液中的脱水作用<sup>[4]</sup>。在高浓度的PEG/NaCl溶液中,DNA分子失去水分,弯曲折叠为密度较大的线团状结构,而Na<sup>+</sup>等金属阳离子可以中和DNA分子磷酸根上的负电荷,进一步对线性双螺旋DNA分子进行压缩。压缩后的DNA分子从溶液中析出,通过氢键作用附着在磁性微球表面。蛋白质分子和其他杂质组分仍然存在于缓冲溶液中,经磁分离后,即可将其与核酸分开。最后采用低盐溶液对吸附在磁性载体表面的核酸进行洗脱,实现对DNA分子的富集与纯化。与传统DNA提取法相比,磁性微球DNA提取法无需使用有机溶剂对蛋白进行抽提变性,省去了离心步骤,对样品的生物活性几乎无影响,操作步骤简单,绿色环保,且易于实现自动化<sup>[5-7]</sup>。笔者以磁性微球为吸附剂,建立中药材基因组核酸提取方法,并选用不同药用部位的干、鲜药材对提取方法的有效性进行验证,结合PCR和RAPD,将纯化的核酸应用于丹参真伪鉴定及柴胡品种的亲缘关系分析,旨在为基于基因的中药材质量管理提供参考。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

中药材(表1)鲜品、饮片及种子均为市售,经天

津大学药学院天然产物与中药系李霞老师鉴定。

表1 中药材名称及产地

Table 1 Name and origin of TCM

中药材	学名	产地
白果鲜品	<i>Ginkgo biloba</i> L.	天津
甘草鲜品	<i>Glycyrrhiza uralensis</i> Fisch	内蒙古赤峰
甘草饮片	<i>Glycyrrhiza uralensis</i> Fisch	内蒙古杭锦旗
枸杞饮片	<i>Lycium barbarum</i> L.	宁夏中宁
金银花饮片	<i>Lonicera japonica</i> Thunb.	河南封丘
丹参饮片	<i>Salvia miltiorrhiza</i> Bge.	山东
绞股蓝饮片	<i>Gynostemma pentaphyllum</i>	安徽黄山
丹参种子	<i>Salvia miltiorrhiza</i> Bge.	北京通州
牛蒡鲜品	<i>Arctium lappa</i> L.	天津
黑柴胡种子	<i>Bupleurum smithii</i> Wolff	河北保定
红柴胡种子	<i>Bupleurum scorzonifolium</i> Wolff	甘肃临洮
藏柴胡种子	<i>Bupleurum smithii</i> var. <i>parvifolium</i> Shan et Y. Li.	甘肃临洮
川岛柴胡种子	<i>Bupleurum falcatum</i> L.	河北保定

### 1.2 仪器与试剂

主要仪器:JEOL透射电子显微镜(TEM,日本电子株式会社);Tecnai G2 F20场发射透射电子显微镜(HR-TEM,荷兰FEI公司);XRD-7000 X射线粉末衍射分析仪(XRD,日本SHIMADZU公司);LDJ 9600-1振动样品磁强计(美国LDJ电子仪器公司);UV-2450紫外可见分光光度计(日本岛津公司);DYCP-31C水平电泳仪(北京六一仪器厂);BioDoc-IT凝胶成像系统(美国UVP公司);PTC-150 PCR仪(美国MJ RESEARCH公司)。

主要试剂:磁性四氧化三铁微球(Affimag FEO, 500 nm,天津市倍思乐色谱技术开发中心);四乙氧基硅烷(分析纯,武大有机硅新材料有限公司);磁分离架(1.5 mL×2孔,天津市倍思乐色谱技术开发中心);聚乙烯吡咯烷酮K30(PVP,分析纯,天津天泰精细化学品有限公司);维生素C(天津力生制药股份有限公司);蛋白酶K(生物级,德国Merck公司);RNase(生物级,上海生工生物工程技术有限公司)。

司); 盐酸胍(分析纯, 天津市光复精细化工研究所); 聚乙二醇 8000(PEG8000, 分析纯, 北京鼎国生物技术发展中心); 琼脂糖(电泳级, Bio Basic Inc.); DNA Primer(生物级, 上海生工生物工程技术有限公司);  $2\times Taq$  PCR Master Mix(生物级, 北京天根生化技术有限公司); 其他试剂均为分析纯。

### 1.3 中药材基因组核酸的磁性微球法提取

#### 1.3.1 磁性四氧化三铁微球的表面二氧化硅包覆

采用 sol-gel 法, 称取 1 g 磁性微球, 用 0.1 mol/L HCl 超声处理 1 h。蒸馏水洗涤后, 加入无水乙醇 40 mL, 蒸馏水 8 mL, 氨水 0.2 mL, 四乙氧基硅烷 0.25 mL, 室温振荡反应 3 h。产物依次用无水乙醇和蒸馏水洗涤, 60 °C 真空干燥, 获得表面二氧化硅包覆的磁性  $Fe_3O_4$  微球。

#### 1.3.2 磁性四氧化三铁微球的表征

分别用 TEM 和 HR-TEM 对磁性四氧化三铁微球和二氧化硅包覆的磁性微球的粒径和形貌进行分析; 用 XRD 对四氧化三铁的晶体结构进行考察(CuK $\alpha$  射线,  $\lambda=0.1541$  nm); 用振动样品磁强计测定磁性微球的饱和磁化强度。

#### 1.3.3 中药材基因组核酸的提取

中药材种类繁多, 药用部位不同, DNA 提取的难易程度也不同。为验证基于磁性微球核酸提取法的普遍适用性, 使用磁性微球提取不同部位入药的中药材鲜品和饮片的 DNA, 对制备得到的基因组 DNA 的纯度、产量、完整性进行分析。

样品前处理: 挑选无菌斑的药材适量, 剪碎后加入维生素 C 粉末(10%)、PVP 粉末(10%)和液氮研磨成粉。称取 3 g 上述粉末置于离心管中, 加入预冷的多糖洗涤液(0.25 mol/L NaCl, 0.2 mol/L Tris-HCl, pH 8.0, 50 mmol/L EDTA-2Na(乙二胺四乙酸二钠), 4% PVP), 冰浴静置 10 min, 离心, 弃去上清。重复洗涤 1 次, 在沉淀中加入 PVP 0.3 g, 维生素 C 0.3 g, 细胞裂解液(100 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 100 mmol/L EDTA-2Na, 500 mmol/L NaCl, 2% SDS) 4 mL, 5 mol/L 盐酸胍溶液 200  $\mu$ L, 5 mg/mL

蛋白酶 K 溶液 50  $\mu$ L, 振荡混匀, 55 °C 水浴 45 min。加入 5 mg/mL RNase 10  $\mu$ L, 4 °C 静置 30 min, 12 000 r/min 离心 5 min, 取上清液作为样品液备用。

DNA 的纯化: 参考文献[5], 用 PBS 缓冲液(800 mL 蒸馏水中溶解 8 g NaCl, 0.2 g KCl, 1.44 g  $Na_2HPO_4$ , 0.24 g  $KH_2PO_4$ , HCl 调 pH 至 7.4, 定容至 1 L)将磁性微球稀释成 10 mg/mL 的悬液, 取 500  $\mu$ L 置于 1.5 mL 的离心管中, 磁分离, 弃去清液; 加入 1 mL PBS 缓冲液, 洗涤 2 遍, 弃去清液; 在洗涤好的磁珠中加入吸附液(20% PEG8000, 2 mol/L NaCl) 1.0 mL, 振荡混匀, 加入上述处理好的样品液 500  $\mu$ L, 振荡混匀, 磁分离, 弃去清液; 再加入 1.0 mL 吸附液, 重复上述操作; 用 70%乙醇洗涤磁珠 2 遍, 弃去清液, 室温风干; 最后加入 TE 缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA-2Na, pH 7.8) 0.4 mL, 振荡混合, 使磁性微球分散均匀; 磁分离, 清液即为 DNA 提取液。空白组不加样品液, 其余操作均相同。

提取基因组的纯度、含量和片段完整性分别用紫外分光光度计和 1%琼脂糖凝胶电泳检测。

### 1.4 磁性微球提取法在中药材真伪鉴定和亲缘关系分析中的应用

#### 1.4.1 丹参及其伪品的鉴定

将上述磁性微球 DNA 提取方法应用于丹参种子、丹参饮片和牛蒡鲜品, 对获得的 DNA 模板进行特异性片段 PCR 扩增。根据参考文献[8], 选用 RYF(5'-TCA AAC AAA ATA GAT GAA T-3')和 RYR(5'-AGT TAA ATC AGT CAT ATC-3')分别作为上游和下游引物。

PCR 反应体系 50  $\mu$ L, 其中, 模板 DNA 1  $\mu$ L,  $2\times Taq$  PCR Master Mix 25  $\mu$ L, 100  $\mu$ mol/L 上下游引物各 1  $\mu$ L, ddH $_2$ O 22  $\mu$ L。扩增程序: 70 °C 预变性 4 min, 94 °C 变性 40 s, 40 °C 退火 20 s, 72 °C 延伸 2 min, 进行 4 个循环, 然后 94 °C 变性 20 s, 40 °C 退火 20 s, 72 °C 延伸 2 min, 进行 30 个循环, 最后 72 °C 保温 10 min。PCR 扩增产物进行 3%琼脂糖凝胶电泳检测。

### 1.4.2 柴胡的亲缘关系分析

以磁性微球提取的黑柴胡、红柴胡、藏柴胡、川岛柴胡种子的 DNA 为模板,进行随机扩增多态性 PCR(RAPD)检测。根据参考文献[9],选取对柴胡品种随机扩增重复性好、多态性高的随机引物进行 RAPD 扩增。

PCR 反应体系 50  $\mu$ L,其中,模板 DNA 1  $\mu$ L,  $2\times$ Taq PCR Master Mix 25  $\mu$ L,10  $\mu$ mol/L 引物 1  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 23  $\mu$ L。扩增程序:95  $^{\circ}$ C 预变性 5 min,95  $^{\circ}$ C 变性 50 s,34  $^{\circ}$ C 退火 45 s,72  $^{\circ}$ C 延伸 1 min,进行 30 个循环,最后 72  $^{\circ}$ C 保温 7 min。扩增产物进行 2%琼脂糖凝胶检测。

### 1.5 数据分析

用 SPSS 11.0 分析软件计算样品间的相似系

数,用 Withingroups linkage 法进行聚类分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 基于磁性微球的中药核酸提取

#### 2.1.1 磁性微球的粒径和形貌

分别用透射电子显微镜、高倍透射电子显微镜、X 射线衍射仪和振动磁强计对磁性微球的形貌、粒径、包覆层、晶体结构和磁学性质进行分析。从分析结果(图 1~3)可以看出,磁性微球粒径均一,球形规整,粒径约为 500 nm,包覆的二氧化硅层厚度约 3.5 nm。磁性微球的主要衍射峰的峰位(2 $\theta$ )和相对强度与标准 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 晶体<sup>[10]</sup>一致,可以确定该磁珠中所含铁氧体为单相立方晶系反尖晶石结构的 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>,而且具有较好的纯度和结晶度<sup>[9]</sup>。

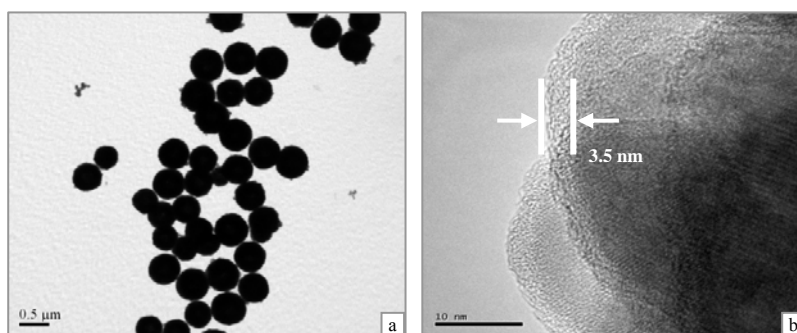


图 1 磁性微球的 TEM 照片(a)和硅修饰磁性微球的 HR-TEM 照片(b)

Fig.1 TEM image of the magnetic microspheres (a) and HR-TEM image of silica modified magnetic microspheres(b)

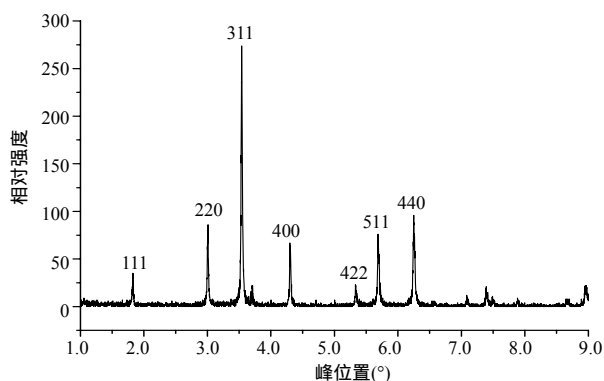


图 2 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 磁性微球的 XRD 图谱

Fig.2 XRD pattern of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> magnetic microspheres

从微球的磁滞回线(图 3)可以看出,其比饱和磁化强度为 77.83 emu/g,剩磁为 6.675 emu/g,矫顽力为 54.84 Oe。表明该磁性微球剩磁较小,比饱和磁化强度很高,在 10 s 内即可完全吸附到磁分离架一侧,获得透明澄清的溶液。对于含糖较多的中

药材等黏稠的生物样品,该磁性微球表现出更加明显的优势,可满足中药材 DNA 提取快速高效的分离需求。

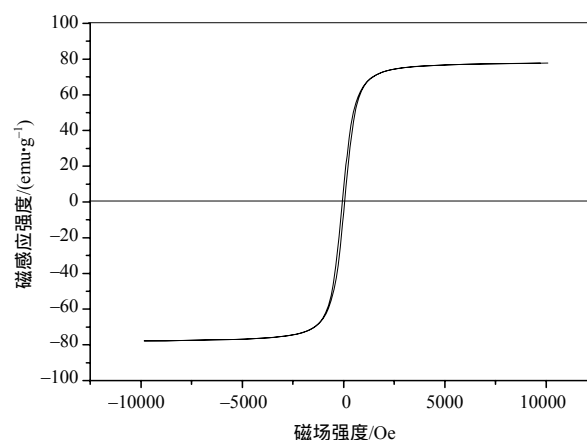


图 3 室温下 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 磁性微球的磁滞回线

Fig.3 Magnetization curve of the magnetic microspheres at room temperature

2.1.2 提取中药核酸的表征

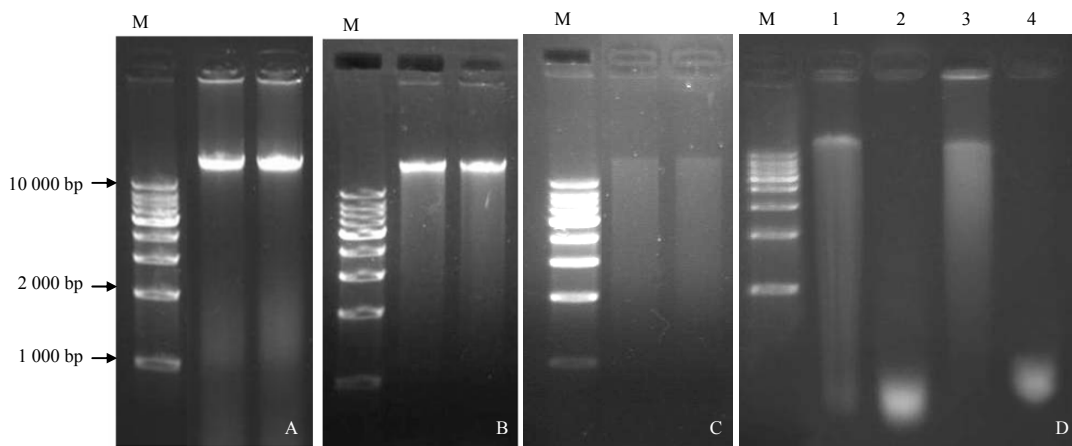
由表 2 可见，纯化核酸的  $OD_{260\text{ nm}}/OD_{280\text{ nm}}$  介于 1.6~2.0，纯度较好，含量较高，均在微克级以上，完全可以满足后续 PCR 等对于模板 DNA 的要求。

由图 4 可见，中药材鲜品的 DNA 条带整齐无降解，片段大小在 10 kb 以上，而中药材饮片的 DNA 条带大多呈弥散状，几乎观察不到大片段 DNA。这是因干药材在加工炮制过程中 DNA 出现不同程度的降解所致。

表 2 中药材 DNA 的紫外检测结果

Table 2 UV data of DNA extracted from TCM

中药材	$OD_{260\text{ nm}}$	$OD_{260\text{ nm}}/OD_{280\text{ nm}}$	DNA 含量/ ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	DNA 提取量/ ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )
白果鲜品	1.83	1.69	91.5	15.3
甘草鲜品	1.00	2.04	50.0	41.7
甘草饮片	0.28	1.60	14.0	9.3
枸杞饮片	0.46	1.77	23.0	3.8
金银花饮片	0.33	1.69	16.7	8.4
丹参饮片	2.99	1.98	149.5	24.8
绞股蓝饮片	0.37	1.93	18.5	3.1



A 白果鲜品；B 甘草鲜品；C 甘草饮片；D-1 枸杞饮片；D-2 金银花饮片；D-3 丹参饮片；D-4 绞股蓝饮片；M 1 000 bp ladder marker。

图 4 中药材鲜品及饮片的 DNA 电泳图

Fig.4 Agarose gel electrophoreses of DNA obtained from traditional Chinese medicine

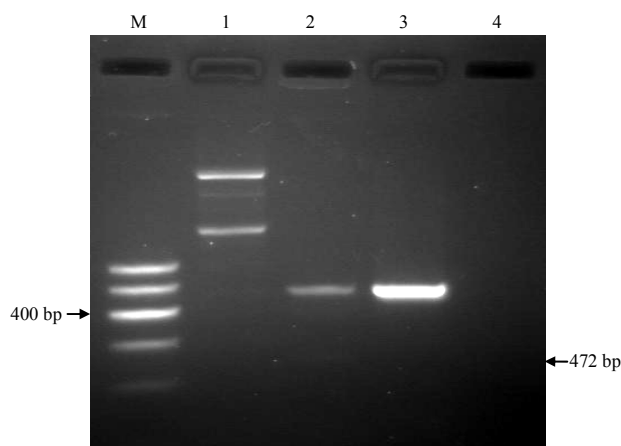
2.2 基于磁性微球提取法的中药材真伪鉴定和亲缘关系分析

2.2.1 丹参的真伪鉴定

为鉴定常用中药材丹参及其伪品牛蒡，采用磁性微球提取法从丹参种子及其饮片、牛蒡鲜品中提取出基因组 DNA。随后通过引物设计<sup>[8]</sup>，在此基础上扩增出 472 bp 的丹参特异性片段(图 5)，而牛蒡鲜品扩增出 2 条大于 600 bp 的片段。可见，产物不仅大小不同，数量也不同，所以，可通过对比 PCR 产物的大小和数量，对丹参及其伪品牛蒡进行鉴别。

2.2.2 柴胡亲缘关系分析

采用 3 条重复性好、多态性明显的 10 bp 随机引物对 4 种柴胡基因组进行 RAPD (图 6)。



M DNA marker I；1 牛蒡；2 丹参鲜品；3 丹参饮片；4 阴性对照 PCR 产物。

图 5 丹参及伪品牛蒡的 PCR 电泳图

Fig.5 Agarose gel electrophoresis of the PCR products obtained from *Salvia miltiorrhiza* and *Arctium lappa*

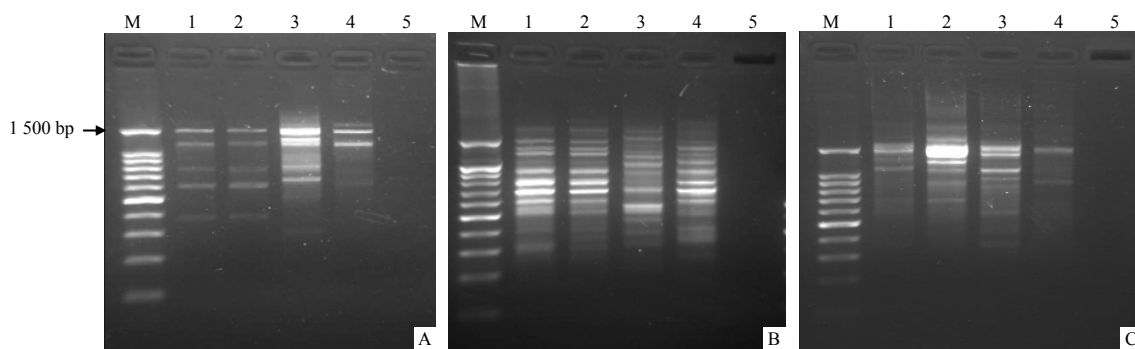


图 6 4 种柴胡基因组引物扩增产物电泳结果  
A 引物 AW56325; B 引物 AW56326; C 引物 AW56327; M 100 bp ladder marker; 1 黑柴胡; 2 红柴胡; 3 藏柴胡; 4 川岛柴胡; 5 阴性对照 RAPD 产物。

图 6 4 种柴胡基因组引物扩增产物电泳结果

Fig.6 RAPD products with three primers obtained from four species of *Bupleurum*

由表 3 可知, 3 个引物共扩增出了 37 个 DNA 片段。RAPD 分析中每条扩增片段至少代表基因组的 1 个与引物相对应的位点, 37 条扩增产物意味着对供试柴胡 DNA 的至少 37 个位点进行了检测。

表 3 3 个有效引物及其扩增结果

Table 3 Three primers and results of RAPD-PCR

引物名称	序列(5'-3')	片段数/个		
		平态性	多态性	总片段
AW56325	CAG GCC CTT C	2	7	8
AW56326	GTG TGC CCC A	2	15	17
AW56327	AGC GCC ATT G	2	9	11
合计		6	31	37

依据扩增产物在电泳上的位置, 以“1”和“0”记录条带的有无, 得到二元矩阵。由图7可见, 黑柴胡与红柴胡2个品种先聚在一起, 然后与川岛柴胡和藏柴胡聚在一起, 表明黑柴胡与红柴胡亲缘关系较近, 二者与川岛柴胡和藏柴胡的亲缘关系稍远。

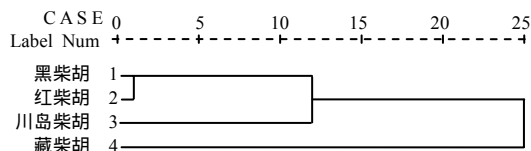


图 7 4 个柴胡品种间的 RAPD 聚类分析

Fig.7 Dendrogram of the four species of *Bupleurum*

### 3 结论与讨论

结合中药材特性和磁分离原理, 基于磁性微球的中药材核酸提取主要分为前处理和 DNA 纯化两大步骤。中药材中通常含有大量多酚和多糖类化合物。酚类物质在氧气环境中易被酶催化氧化成棕褐

色的醌类物质, 后者会和 DNA 分子产生不可逆的结合, 形成难以溶解的复合物, 甚至引起 DNA 分子降解<sup>[11]</sup>。酸性多糖和酚类物质均为聚合酶的强抑制剂<sup>[12]</sup>, 是基于 PCR 反应的核酸分析假阴性结果出现的主要原因, 所以, 在样品的前处理过程中需设计多个步骤以除去酚类和糖类物质。聚酰胺吡咯烷酮可与多酚以复合氢键结合, 从而防止酚类与 DNA 的结合<sup>[13]</sup>; 抗氧化剂维生素 C 能够防止酚类氧化为醌类。另外, 在裂解细胞核之前, 先用不含 SDS 的多糖洗涤液进行冰浴洗涤, 可以除掉部分多糖及其他水溶性成分, 这样得到的 DNA 纯度更高, 完整性更好。牛蒡外形与丹参类似, 常被不法分子用来冒充丹参。编码核蛋白体大亚基多肽 L16 基因 (*rpl16*) 是一段突变度非常高的植物内源片段, 通过设计引物, 可以从丹参基因组核酸中扩增出一段 472 bp 的特异性片段。另外, 在实际检测中, 由于难以获得中药材的鲜品或者嫩叶, 人们常常需要直接对中药材饮片进行真伪鉴定。本文中基于磁性微球 DNA 提取法和常规 PCR 技术, 可快速、准确地进行中药材鲜品及饮片的真伪鉴别, 这在中药材质量管理中具有广阔的应用前景。

由于中国柴胡品种众多, 对柴胡品种的分类一直是学者们关注的焦点。Wang 等<sup>[14]</sup>以柴胡的 *ITS* 和 *rpl16* 片段为对象, 通过聚类分析, 得出黑柴胡与红柴胡亲缘关系较近, 同属较小的一分支。本研究结果与此一致。柴胡是常用中药材, 不同柴胡品种所含皂苷量不尽相同, 药用功效相差很大。中国大部分地区的药用柴胡主要为伞形科北柴胡或红

柴胡的干燥根,在西北部分地区的主流品种为藏柴胡。川岛柴胡是从日本引进的品种,正确鉴定川岛柴胡可以保持其品种的优质性,防止属内杂交,提高经济效益。可见,正确区分不同柴胡品种,并根据不同品种采取不同的炮制方法,对于合理、安全使用柴胡具有重要意义。

#### 参考文献:

- [1] Heubl G. New aspects of DNA-based authentication of Chinese medicinal plants by molecular biological techniques[J]. *Planta Medica*, 2010, 76: 1963–1974.
- [2] Stephen C S, Song J X, Ricky N W, et al. Application of SCAR (sequence characterized amplified region) analysis to authenticate *Lycium barbarum* (Wolfberry) and its adulterants[J]. *Biotechnol Appl Biochem*, 2008, 51(1): 15–21.
- [3] Sue K L, Mark P S, Natascha T, et al. Molecular analyses of the Chinese herb Leigongteng (*Tripterygium wilfordii* Hook. f.)[J]. *Phytochemistry*, 2011, 72(1): 21–26.
- [4] Kathryn A M, Chris S S, Robin F B, et al. Driving forces for DNA adsorption to silica in perchlorate solutions[J]. *J Colloid Interf Sci*, 1996, 181: 635–644.
- [5] Shi R B, Wang Y C, Hu Y L, et al. Preparation of magnetite-loaded silica microspheres for solid-phase extraction of genomic DNA from soy-based foodstuffs[J]. *J Chromatogr A*, 2009, 1216: 6382–6386.
- [6] Zhang Z C, Zhang L M, Chen L, et al. Synthesis of novel porous magnetic silica microspheres as adsorbents for isolation of genomic DNA[J]. *Biotechnol Prog*, 2006, 22: 514–518.
- [7] 张志超, 袁翠, 万谦宏. 磁性二氧化硅微球的表面修饰及其在植物基因组核酸纯化中的应用[J]. *分析化学*, 2007, 35(1): 31–36.
- [8] Guo H F, Kan X Z, Zhang R, et al. Identification of *Salvia* species by nrDNA *ITS* and cpDNA *rpl16* sequence analyses[J]. *Acta Botanica Yunnanica*, 2008, 30(3): 345–350.
- [9] 梁之桃, 秦民坚, 王峥涛, 等. 柴胡属5种植物RAPD分析与分类鉴定[J]. *中草药*, 2002, 33(12): 1117–1119.
- [10] Deng H, Li X, Peng Q, et al. Monodisperse magnetic single-crystal ferrite microspheres[J]. *Angew Chem Int Ed*, 2005, 44(18): 2781–2785.
- [11] John M E. An efficient method for isolation of RNA and DNA from plants containing polyphenolics[J]. *Nucleic Acids Res*, 1992, 20: 2381.
- [12] Tigst D G, Ronald J. Influence of DNA extraction methods, PCR inhibitors and quantification methods on real-time PCR assay of biotechnology-derived traits[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2010, 396: 1977–1990.
- [13] Reza H J, Raheem H, Ghasem-Ali G. Rapid and efficient isolation of high quality nucleic acids from plant tissues rich in polyphenols and polysaccharides[J]. *Mol Biotechnol*, 2011, 49: 129–137.
- [14] Wang Q Z, Zhou S D, Liu T Y, et al. Phylogeny and classification of Chinese *Bupleurum* based on nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer and *rps16*[J]. *Acta Biol Cracov Bot*, 2008, 50(2): 105–116.

责任编辑: 王赛群