

中药材龟甲及原动物的高特异性 PCR 鉴定研究

刘中权, 王义权*, 周开亚, 杨学干, 曹琳¹, 刘舞霞¹

(南京师范大学遗传资源研究所, 南京 210097; ¹江苏省药品检验所, 南京 210008)

摘要 目的:建立一种简便、实用的龟甲药材 DNA 分子鉴定方法。方法:根据 22 种亚洲产龟类的线粒体 12S rRNA 基因片段序列,设计一对专用于鉴定中药材龟甲原动物乌龟的鉴别引物,用该对引物扩增从乌龟和其他 18 种龟共 48 个样品的 DNA 模板。结果:在 72℃ 的复性温度下进行 PCR,4 个乌龟的模板 DNA 均得到约 180 bp 的阳性扩增带,而其他各龟的模板 DNA,在同样条件下无扩增产物,用这对鉴别引物经一次 PCR 反应便可准确地鉴定受试原动物是否为乌龟。同法对江苏省药品检验所提供的 17 块样品龟甲进行了鉴定,结果表明只有 4 块样品为正品,其余皆为伪品,与性状鉴定和 DNA 序列分析鉴定结果完全一致。结论:所设计的鉴别引物对乌龟有高度特异性,所配制的龟甲药材鉴定试剂盒可在龟甲药材鉴定中使用。

关键词 龟甲; 乌龟; 鉴别引物; PCR 鉴定

龟甲(板)为常用中药材。《中国药典》(1995 年版)规定为爬行纲龟科动物乌龟 *Chine mys reevesii* (Gray) 的背甲和腹甲。有滋阴潜阳,益肾强骨,养血补心之功效。由于用量较大,资源紧张,来源复杂,品种混乱,因此药材市场中有大量混淆品^[1,2]。传统的以形态学特征为鉴别依据的鉴别方法有一定的主观性。虽有标准模式相似系数和比值图示法鉴定等新方法的报道^[3,4],但对于掉皮和破碎的龟甲往往不适用。理化鉴定研究发现真、伪品种间理化特征差别不明显,亦不宜做鉴定依据^[2]。

用 DNA 分子遗传标记技术分析龟甲药材 DNA 片段的核苷酸序列,已成功地鉴定出龟甲的真伪^[5],但 DNA 测序操作复杂,成本高,因此,在药材鉴定中的适用性差。本文用已建立的 22 种亚洲产龟类线粒体 12S rRNA 基因的 DNA 序列数据^[6],设计了 1 对用于中药材龟甲鉴定的 PCR 引物,对中药材龟甲及其混淆品的原动物乌龟等进行高特异性 PCR 鉴别研究,以期建立简便易行的龟甲药材 DNA 分子标记鉴别方法。

材 料 和 方 法

1 实验材料 实验用标本分别购自江苏南京、广西

南宁和重庆的市场。原动物标本存放于南京师范大学经吴平博士鉴定后,取适量肌肉组织于 -20℃ 冻存储备。样品来源和种类见表 1。用于鉴定的 17 件龟甲样品(IT1 ~ IT17)由江苏省药品检验所提供。

2 模板 DNA 的提取 取冻存的肌肉标本约 0.1 g,参照吴平等方法^[5]提取 DNA。药材龟甲 DNA 提取同王亚明等^[7]。

3 PCR 引物 本研究中设计的 1 对用于鉴别乌龟的引物,分别命名为 IT-L01 和 IT-H01(专利申请号 99114133.4),扩增约 180 bp 的 12S rRNA 基因片段。用扩增约 400 bp 12S rRNA 基因片段的通用引物 L1091 和 H1478 作为阳性对照,与用鉴别引物作的鉴别 PCR 同时对样品的 DNA 模板进行扩增。

4 PCR 反应条件及鉴定 PCR 反应体积为 30 μ L,反应液中含 10 mmol·L⁻¹ Tris-HCl, pH 8.3, 50 mmol·L⁻¹ KCl, 1.5 mmol·L⁻¹ MgCl₂, 0.1% Triton X-100, Taq 酶 1 U, 4 种 dNTP 各 150 μ mol·L⁻¹,两个引物各 10 pmol·L⁻¹,DNA 模板约 100 ng。反应在 PE2400 或 PTC200 型 PCR 仪上进行。循环参数为 95℃ 预变性 4 min,然后于 95℃ 变性 40 s,55℃ ~ 72℃ 复性 40 s,72℃ 延伸 60 s,共 30 个循环,最后 7 min 延伸补齐。取 5 μ L 反应液经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳,EB 染色,紫外检测并拍照。

用鉴别引物对乌龟和其它伪品原动物进行高特异性 PCR 鉴别时,PCR 反应参数中选用不同的复性温度,进行 PCR 循环,以寻找合适的鉴别 PCR 条

收稿日期:1999-04-06

基金项目:国家自然科学基金(39870913) 江苏省教委科学基金(98KJB360010)和江苏省“333 工程”人才培养基金

*联系人 Tel:(025)3598328, Fax:(025)3738174,

E-mail: yqw@pine.njnu.edu.cn

件。实验中设置不加模板 DNA 的阴性对照,阳性 对照的引物为 L1091 和 H1478。

Tab 1 Number and source of original animals of 19 species of turtles

Species	Code	Number	Source
潮龟科 (Bataguridae)			
乌龟 <i>Chinemys reevesii</i> (Gray)	Cr	4	Nanjing, Jiangsu
花龟 <i>Ocadia sinensis</i> (Gray)	Os	3	Nanning, Guangxi
马来龟 <i>Malayemyss subtrijuga</i> (Schlegel and Müller)	Ms	3	Nanning, Guangxi, Chongqing
马来巨龟 <i>Orlitia borneensis</i> (Gray)	Ob	1	Nanjing, Jiangsu
马来闭壳龟 <i>Cuora amboinensis</i> (Daudin)	Ca	3	Nanning, Guangxi, Chongqing
粗颈龟 <i>Siebenrockiella crassicollis</i> (Gray)	Sc	2	Nanjing, Jiangsu
地龟 <i>Geomyda spengleri</i> (Gmelin)	Gs	2	Nanning, Guangxi
四眼斑水龟 <i>Sacalia bealei</i> (Gray)	Sq	3	Nanning, Guangxi
眼斑沼龟 <i>Morenia ocellat</i> (Du méril and Bibron)	Mo	3	Nanjing, Jiangsu
大东方龟 <i>Heosemys grandis</i> (Gray)	Hg	2	Nanning, Guangxi
黑龟 <i>Melanochelys trijuga</i> (Schwegger)	Mt	2	Nanning, Guangxi
锯缘摄龟 <i>Pyxidea mouhotii</i> (Gray)	Pym	3	Nanning, Guangxi, Chongqing
黄喉拟水龟 <i>Mauremys mutica</i> (Cantor)	Mm	1	Nanjing, Jiangsu, Nanning, Guangxi
黄额盒龟 <i>Cistoclemmys galbini frons</i> (Bourret)	Cg	2	Nanning, Guangxi, Chongqing
齿缘摄龟 <i>Cyclemys dentata</i> (Gray)	Cd	3	Nanning, Guangxi, Chongqing
庙龟 <i>Hieremyss annandalei</i> (Boulenger)	Ha	2	Nanning, Guangxi
陆龟科 (Testudinidae)			
缅甸陆龟 <i>Indotestudo elongata</i> (Blyth)	Ie	3	Nanjing, Jiangsu
凹甲陆龟 <i>Manouria impressa</i> (Günther)	Mi	3	Nanning, Guangxi, Chongqing
鳄龟科 (Chelydridae)			
平胸龟 <i>Platysternon megacephalum</i> (Gray)	Plm	3	Nanjing, Jiangsu, Nanning, Guangxi

结 果

用鉴别引物 PCR 扩增原动物样品,当复性温度为 55℃时,乌龟(Cr)样品有明显的约 180 bp 扩增带,同时花龟(Os)和凹甲陆龟(Mi)的扩增带也很明显,马来龟(Ms)、马来巨龟(Ob)、马来闭壳龟(Ca)、地龟(Gs)、四眼斑水龟(Sq)、黑龟(Mt)、锯缘摄龟(Pym)、黄额盒龟(Cg)、齿缘摄龟(Cd)也有 1 条很弱的同样大小的扩增片段,而粗颈龟(Sc)、眼斑沼龟(Mo)、大东方龟(Hg)、缅甸陆龟(Ie)、黄喉拟水龟(Mm)、平胸龟(Plm)、庙龟(Ha)均无扩增产物(图 1A)。当复性温度提高到 67℃时,仅乌龟和花龟有良好的扩增带,其余样品均无明显扩增产物(图 1B)。当复性温度提高至 72℃,即退火和延伸合二为一共用 2 min 时,只有乌龟的模板 DNA 能很好地

扩增,花龟中原在 67℃复性时出现的扩增带也消失(图 1C),重复实验结果十分稳定。因此根据用鉴别引物扩增模板 DNA 时有无扩增带的出现,即可确定受试样品是否为乌龟。PCR 过程中用引物 L1091 和 H1478 在 55℃复性作阳性对照,所有样品均能很好地扩增出约 400bp 的 DNA 片段(图 1D)。

用鉴别引物 PCR 扩增龟甲药材样品,当复性温度为 55℃时,2,8,14,17 号有明显的约 180 bp 扩增带;3,4,6,11,13 号有 1 条很弱的同样大小的扩增片段;其余均无扩增产物(图 2E),当复性温度为 72℃时,2,8,14,17 号扩增带同样明显,其余样品均无明显扩增产物(图 2F)。表明 2,8,14,17 号样品为正品药材龟甲,其余皆为伪品。用通用引物作 55℃复性的阳性对照均能很好地扩增出约 400 bp 的带(图 2G)。

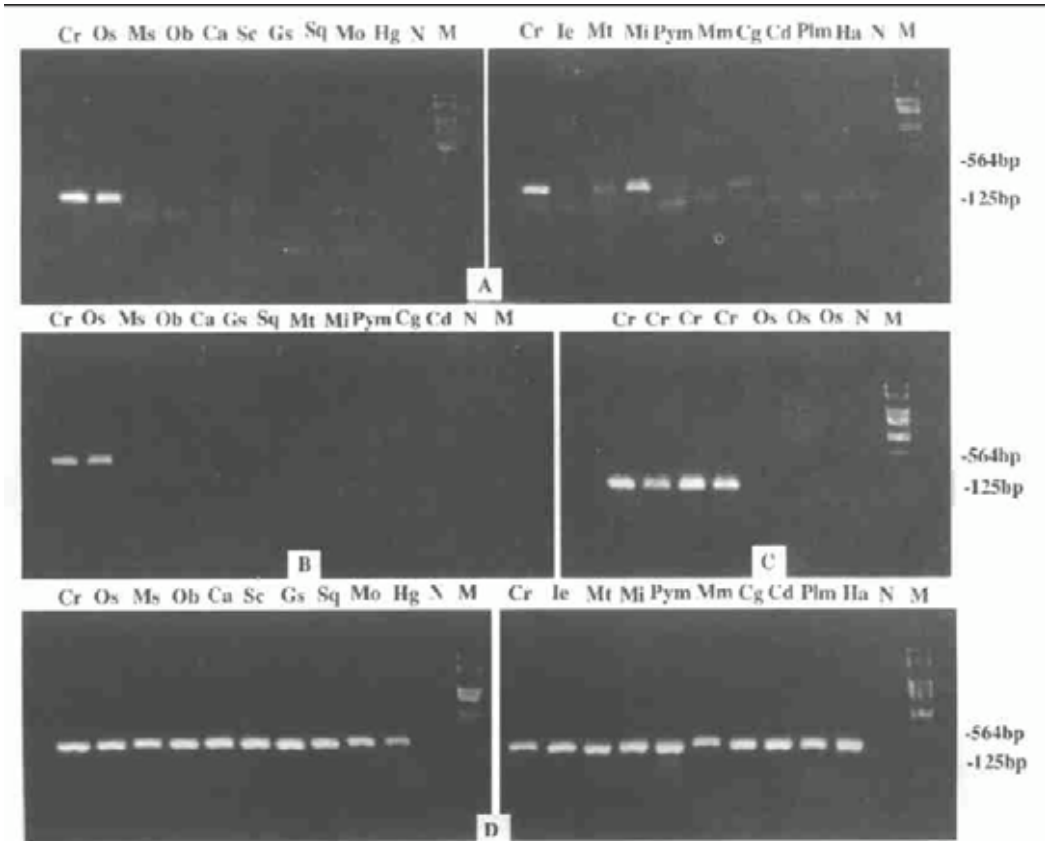


Fig 1 Agarose gel electrophoresis of PCR amplification of 12S rRNA gene fragments from turtle DNA templates. A,B,C: Annealed at 55 °C, 67 °C and 72 °C respectively with the primers IT-L01 and IT-H01; D: Positive control annealed at 55 °C with primers L1091 and H1478. N: Negative control without DNA template; M: DNA marker, λDNA-EcoRI/ HindIII digested. Codes are same as described in Tab 1.

讨 论

在动物类药材的分子标记鉴定研究中,随机扩增多态(RAPD)最早用于蛇类药材的鉴定^[8]。近年DNA序列分析用于海马、龟甲等药材的鉴别研究^[5,9]。由于RAPD对DNA模板质量要求较高,而药材DNA常有不同程度降解,影响RAPD反应结果,重现性较差,其鉴别标准在不同的实验室难以稳定地重复,在药材鉴别的应用上有一定的局限。DNA序列分析方法由于实验复杂、技术难度大、鉴定成本高,当前一般药检部门实验室不易完成,特别是昂贵的测序费用成为限制该方法在药检工作中实际应用的一个主要障碍。王义权等首次在金钱白花蛇及其伪品的PCR鉴定研究中,设计了1对金钱白花蛇的鉴别引物,通过简单的PCR,就可鉴定出药材的真伪,该鉴别引物扩增的DNA片段在100~200bp间,不会受药材DNA降解的影响,鉴定实验的成本低廉,从而建立了一种更具实用价值的中药

材DNA分子遗传标记鉴定的新方法^[11,12]。

本研究针对龟甲药材的鉴定需要,设计了1对具有高度特异性的龟甲原动物乌龟的鉴别引物IT-L01和IT-H01,这对引物的 T_m 理论值均达到78°C,用这对引物在较高的PCR复性温度条件下,以乌龟DNA样品为模板,能很显著地扩增出特定的约180bpDNA片段,而以除乌龟以外的其他龟类DNA样品为模板,在同样条件下都无扩增产物出现。为验证模板DNA的可靠性,实验中用通用引物L1091和H1478对全部样品的12S rRNA基因片段扩增,均能出现阳性的扩增结果,表明样品中模板DNA质量符合PCR反应的要求。鉴别引物却只能特异性地从乌龟的DNA模板中得到扩增产物,鉴别引物有很高的专属性,能高度特异性地从被检测物中鉴定出乌龟样品。在实际应用中,只要从商品龟甲中抽提出DNA,用这对引物在72°C复性温度进行PCR扩增,紫外光下观察有无扩增条带,即可鉴定出龟甲的真伪。

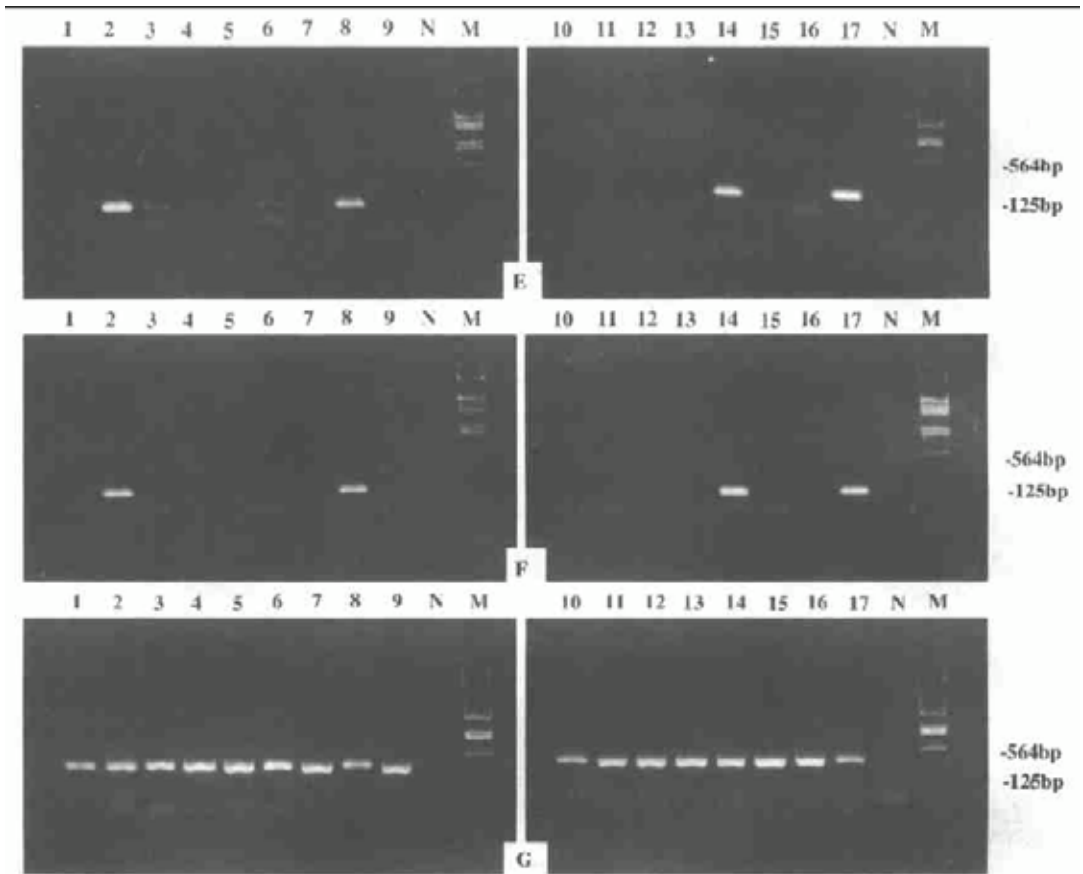


Fig 2 Agarose gel electrophoresis of PCR amplification of 12S rRNA gene fragments from turtle shells. E, F: Annealed at 55 °C, and 72 °C respectively with the primers IT-L01 and IT-H01. G: Positive control annealed at 55 °C with primers LI091 and HI478. 1 ~ 17: IT1 ~ IT17 turtle shells; N: Negative control without DNA template; M: DNA marker, λDNA-EcoRI/ HindIII digested.

为了验证该鉴别引物对乌龟及龟甲进行 PCR 鉴定的灵敏性,在 55 °C ~ 72 °C 复性温度下,我们选取了 4 个乌龟原动物样品和 44 个其它龟类原动物样品(表 1)进行实验,结果表明每次实验都能准确无误地对乌龟样品进行扩增,只有花龟 3 个样品在复性温度低于 67 °C 时有扩增产物,但当复性温度提高至 72 °C 后,只有 4 个乌龟样品有扩增的条带出现,其他样品扩增结果均为阴性(图 1C)。由江苏省药品检验所提供的 17 件龟甲药材样品,在未知名、伪品的情况下,直接用本鉴别引物对各样品的模板 DNA 扩增,结果表明其中有 4 件原动物是乌龟的正品药材,其余 13 件为伪品,经多次重复结果非常稳定。与本实验室用测序的鉴定结果和依药材外形特征的鉴定结果对照,均完全一致^[5]。用这对引物在对上述 4 个乌龟原动物和 4 件正品药材的正确检出率达 100 %。

目前市场上商品龟甲有大量的混淆品,且很多来自东南亚国家^[1,2]。本研究中所选样品,包括绝

大多数的伪品药材龟甲的原动物,其中花龟的 12S rRNA 基因序列与乌龟的差异最小,只有 2.06 % 的差异^[6],这是花龟 3 个样品在复性温度低于 67 °C 时有扩增产物出现的原因,但当复性温度高于 67 °C 时花龟亦无扩增带,这时只有乌龟样品有清晰的扩增带出现,说明该鉴别引物对乌龟有高度特异性。因此所设计的鉴别引物完全可以鉴定药材龟甲的真伪。用该对鉴别引物配制龟甲药材的鉴别试剂盒,供各地药检部门对龟甲药材鉴定使用,不仅准确性高,重现性好,抗污能力强,而且方法简便易行,成本低,有很大的实用价值。不足之处是仅用一对乌龟的鉴别引物时尚不能鉴别出伪品的种名。

References

- 1 Li YC(黎跃成), Yang XQ(杨修齐). Identification on imported "Guiban". J Chin Med Mater(中药材), 1988,11: 19
- 2 Wu DY(吴丹勇), Zhang SH(张淑环). The comparison

- of 22 elements in the Chinese drug turtle shells and its substitutes. *J Chin Med Mater*(中 药 材), 1992, **15**: 13
- 3 Li SF(李水福), Hu QY(胡清宇), Lü LQ(吕丽青), *et al.* Study on identification of *plastrum testudinis* by the standard pattern similar method. *Chin Trad Herbal Drugs*(中 草 药), 1996, **27**: 562
 - 4 Li SF(李水福), Hu QY(胡清宇), Wu HQ(吴慧清). Identification of *plastrum testudinis* and its adulterant by ratio diagrammatic method. *J Chin Med Mater*(中 药 材), 1995, **18**: 449
 - 5 Wu P(吴平), Zhou KY(周开亚), Xu LS(徐珞珊), *et al.* Molecular identification of the Chinese drug turtle shells. *Acta Pharm Sin*(药 学 学 报), 1998, **33**: 304
 - 6 Wu P(吴平), Zhou KY(周开亚), Yang Q(杨群). Molecular systematics of Asian turtles based on sequence of 12 S rRNA gene. *Acta Zool Sin*(动 物 学 报), 1999: (in press)
 - 7 Wang YM(王亚明), Zhou KY(周开亚), Wu P(吴平), *et al.* Isolation and amplification of DNA from tortoise and turtle shells. *Acta Pharm Sin*(药 学 学 报), 1996, **31**: 472
 - 8 Wang YQ(王义权), Zhou KY(周开亚). A preliminary study on the identification of crude snake drugs by molecular genetic markers. *Acta Pharm Sin*(药 学 学 报), 1997, **32**: 384
 - 9 Hashimoto A, Nishimura N, Kokusenya Y, *et al.* Studies on "signal" constituents for evaluation of animal crude drugs. IV: Application of DNA analytical technique to quality evaluation of medicines containing animal crude drugs. *Nat Med*, 1998, **52**: 38
 - 10 Wu P(吴平), Zhou KY(周开亚), Zhang CH(张朝晖), *et al.* Molecular genetic marker identification of traditional Chinese drug hippocampus. *Acta Pharm Sin*(药 学 学 报), 1998, **33**: 226
 - 11 Wang YQ(王义权), Zhou KY(周开亚), Xu LS(徐珞珊), *et al.* Sequencing of Cyt b gene fragments and PCR identification of "Jinqian baihuashe" (*Bungarus parvus*) and its adulterants. *Acta Pharm Sin*(药 学 学 报), 1998, **33**: 941
 - 12 Wang YQ(王义权), Zhou KY(周开亚), Xu LS(徐珞珊), *et al.* PCR identification: a new method for the authentication of Chinese crude drugs. *J Nanjing Univ (Natural sciences)* (南 京 大 学 学 报 自 然 科 学 报), 1997, **33**(Special issue): 136

STUDY ON HIGHLY SPECIFIC DIAGNOSTIC PCR OF THE TRADITIONAL CHINESE MEDICINE TORTOISE PLASTRON AND ITS ORIGINAL ANIMALS

Liu Zhongquan(Liu ZQ), Wang Yiquan(Wang YQ), Zhou Kaiya(Zhou KY),
Yang Xuegan(Yang XG), Cao Lin(Cao L)¹ and Liu Wuxia(Liu WX)¹

(*Institute of Genetic Resources, Nanjing Normal University, Nanjing 210097;*
¹*Jiangsu Institute for Drug Control, Nanjing 210008*)

ABSTRACT **AIM:** To develop a convenient and effective method for the identification of tortoise plastron. **METHODS:** Based on the sequence of mitochondrial 12S rRNA gene fragment of 22 species of Asian turtles, a pair of highly specific primers were designed for distinguishing Reeves' turtle (*Chinemys reevesii*), the original animal of tortoise plastron, from other turtles. The primers were employed to amplify the DNA templates extracted from *Chinemys reevesii* and 18 other species of turtles that amounted to 48 samples. **RESULTS:** An about 180 bp DNA fragment was amplified respectively from 4 individuals of *Chinemys reevesii* in PCR with anneal temperature at 72 °C, whereas no any DNA fragment was amplified from other turtle samples under the same reaction condition. *Chinemys reevesii* could be clearly distinguished from others by PCR reaction with the highly specific primers. Seventeen 'tortoise plastrons', provided by the Jiangsu Institute for Drug Control, were also identified by the highly specific PCR with the primers in the present study. The results indicated that only 4 samples were the shells of *Chinemys reevesii* specified in *Pharmacopoeia of the People's Republic of China* and the others were substitutes, which was consistent with the conclusion of authentication based on the morphological and DNA sequence analyses. **CONCLUSION:** The primers designed in the present study were highly specific for *Chinemys reevesii*. They could be used as key components in the tortoise plastron identification kit.

KEY WORDS tortoise plastron; *Chinemys reevesii*; highly specific primer; diagnostic PCR