

中药材蛇胆的 DNA 分子标记鉴定研究

刘向华, 王义权*, 刘忠权, 童宗中, 周开亚

(南京师范大学遗传资源研究所, 江苏 南京 210097)

摘要: 目的 运用分子标记技术鉴定药材蛇胆的真伪, 以克服目前仅依据形态、显微特征及理化性状进行鉴别的不足。方法 分别从药材蛇胆的胆衣和胆汁、原动物棕黑锦蛇的肌肉和胆汁中提取 DNA, 经 PCR 扩增得到约 400 bp 的 12S rRNA 基因片段, 并对该基因片段进行测序研究。结果 从少量药材蛇胆的胆衣和胆汁中可提得足够用于 PCR 扩增的 DNA 模板, 扩增产物的测序结果表明同一动物的胆衣和胆汁、肌肉和胆汁的碱基序列完全一致。结论 DNA 分子标记技术可用于中药材蛇胆和胆汁的鉴定, 提示该技术也可用于其他动物分泌物类型药材的鉴别。目前市场上药材蛇胆来源较复杂, 需加强质量监督和控制。

关键词: 蛇胆; 胆衣; 胆汁; PCR 扩增; DNA 测序

中图分类号: R286.0; R282.5 文献标识码: A 文章编号: 0513 - 4870(2001)03 - 0229 - 04

蛇胆为传统中药, 有祛风、清热、化痰、明目等功效。近年来市场上伪品蛇胆时有出现, 常见伪品有鳖、青蛙、鱼和多种家禽等小动物的胆, 影响了临床疗效和用药安全^[1]。杨育民等^[2]曾对蛇及一些小动物胆进行外观形态和显微特征的对照鉴别, 该方法虽简单易行, 但受主观影响较大, 并且胆的形态学特征因加工的方法和条件不同, 及取胆时动物的生理状态差异而变化。根据蛇胆所含成分的特点, 一些常用的理化鉴别方法, 如糠醛—硫酸法、薄层色谱和紫外光谱等也用于真伪蛇胆及其制剂的鉴别^[3-5]。但是蛇胆的薄层色谱鉴别容易造成误差^[6]; 不同动物胆汁间的紫外光谱有一定程度的相似性, 有时难以找出具有特征性的吸收峰波长^[7]。因此, 有必要寻找更准确的蛇胆真伪鉴别方法。

分子标记技术已开始应用于一些动植物药材及其混淆品、伪品的鉴定研究^[8-10]。药材蛇胆通常经过干燥或白酒浸泡, 胆汁是动物肝脏的分泌物, 其主要成份为胆汁酸、胆色素、粘蛋白、无机盐等。各种动物胆汁因成分、种类、含量不同, 药效各异, 但不易区别^[11]。DNA 分子标记鉴别是否适用于药材蛇胆和胆汁品种鉴定, 迄今尚未见报道。为此, 本文从干

蛇胆和白酒浸泡蛇胆的胆衣和胆汁中分别提取 DNA, PCR 扩增和 DNA 测序, 并就动物胆汁等分泌物药材是否可用 DNA 分子标记加以鉴定进行讨论。

材料与 方法

1 材料 药材蛇胆分别购于江苏南京、苏州、福建福州的市场。实验中以家鸭 *Anas platyrhynchos domestica* 的胆(南京菜市场)和乌梢蛇 *Zaocys dhumnades* 的冻存肌肉组织作为 DNA 提取、扩增对照, 并分别选取 1 枚干蛇胆和 1 枚白酒浸泡蛇胆的胆衣和胆汁及棕黑锦蛇 *Elaphe schrenckii* 的冻存肌肉和胆汁进行测序研究。实验材料由本文作者王义权鉴定(表 1)。

2 方法

2.1 模板 DNA 提取 干蛇胆用双蒸水浸泡 6 h, 其间更换水数次, 使其软化并洗去表面污染物; 白酒浸泡蛇胆, 用流水浸泡 1 d, 以除去酒精及表面污染物; 鸭胆、蛇胆用双蒸水冲洗干净。用一次性使用无菌注射器抽取胆汁或剪破胆衣收集胆汁, 然后将胆衣和胆汁分别转入 5 mL 离心管中, 加入裂解液(含 Tris-HCl 0.01 mol·L⁻¹ pH 8.0, EDTA 0.1 mol·L⁻¹, NaCl 0.1 mol·L⁻¹) 2.0 mL; 1/10 体积的 100 g·L⁻¹ SDS 和蛋白酶 K(终浓度 100 μg·mL⁻¹) 混匀, 56℃水浴中保温 8 - 10 h, 其间轻摇数次, 至样品完全消化。消化液用等体积饱和酚抽提 1 次, 等体积酚-氯仿抽提两次, 氯仿-异戊醇(24:1) 抽提 1

收稿日期: 2000-08-14

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

作者简介: 刘向华, 女, 硕士研究生。
王义权, 男, 教授, 博士生导师。

* 通讯作者 Tel: (025) 3598328, Fax: (025) 3738174,

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

Tab 1 Samples used in the present study

Sample	Locality	Number	Condition	Material	Code
Snake gallbladder	Fuzhou, Fujian	2	Dried	Membrane of gallbladder, bile	F1-y, F2-y F1-z, F2-z
Snake gallbladder	Wuxi, Jiangsu	2	Dried	Membrane of gallbladder, bile	W1-y, W2-y W1-z, W2-z
Snake gallbladder	Suzhou, Jiangsu	2	Immersed in white spirit	Membrane of gallbladder, bile	S1-y, S2-y S1-z, S2-z
Zaocys dhumnades	Qimen, Anhui	1	Frozen	Muscle	W-j
Elaphe schrenckii	Lianyungang, Jiangsu	1	Frozen	Muscle, bile	Z-j, Z-z
Duck gallbladder	Nanjing, Jiangsu	1	Fresh	Membrane of gallbladder, bile	Y-y, Y-z

次,加1/10体积的 $3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NaAc}$ 和 2.1 倍体积无水乙醇沉淀 DNA,置 $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱中 2 h, $12\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 20 min,沉淀物用 70%乙醇洗涤 2 次,置室温晾干后加入适量 TE 溶解 DNA, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存备用。

冻存肌肉组织 DNA 提取方法参照前文^[10]。

2.2 PCR 扩增 所用引物为特异性扩增约 400 bp 长的线粒体 12S rRNA 基因片段的通用引物 L1091 (5'-AAAAAGCTTCAAACCTGGGATTAGATACCCCACTAT-3') 和 H1478 (5'-TGACTGCAGAGGGTGACGGGCGGTGTGT-3'),由生工公司合成,双蒸水配制成 $10 \text{ pmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的溶液待用。

PCR 反应体积 $30 \text{ }\mu\text{L}$,含 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Tris-HCl}$ pH 8.0, $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ KCl}$, 0.1% TritonX100, $1.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ MgCl}_2$, $2.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ dNTPs}$,引物 L1091、H1478 各 $10 \text{ pmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 1 U *Taq* 酶和模板 DNA 约 100 - 150 ng。扩增反应在 PTC-200 型基因扩增仪 (MJ Research Inc.) 上进行, $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 预变性 4 min,然后 $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 40 s 变性, $58 \text{ }^\circ\text{C}$ 30 s 复性, $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 1 min 延伸,完成 35 个循环后, $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 5 min 补齐。PCR 实验中设无模板 DNA 的阴性对照。

取扩增产物 $4 \text{ }\mu\text{L}$,经 1.0%琼脂糖凝胶电泳,EB 染色,图像分析系统 DGS-7600 (美国 UVP, Inc.) 上紫外扫描检测 拍照。

2.3 PCR 产物的纯化及测序 分别选取 1 枚干蛇胆的胆衣和胆汁 (F2-y, F2-z) 和 1 枚白酒浸泡蛇胆的胆衣和胆汁 (S2-y, S2-z) 及原动物棕黑锦蛇的冻存肌肉和胆汁 (Z-j, Z-z) 的扩增产物,用 1.0%琼脂糖凝胶电泳分离目的片段,再用柱离心式胶回收试剂盒 (上海华舜生物试剂公司) 回收。纯化后的 PCR 产物用 BigDyeTM 测序试剂盒 (PE Applied Biosystems) 和 ABI 310 全自动测序仪 (PE 公司) 测序,操作过程按产品说明书。

结 果

1 模板 DNA 的检测及 12S rRNA 基因片段的扩增

除 W2-z 外,所有样品的 DNA 提取液经电泳检测,均能检测到 DNA。而对 W2-z 样品进行 PCR 反应时得到了扩增条带 (图 2A),说明在作模板 DNA 电泳检测时该样品点样量不足。从图 1 可见,与冻存肌肉中所提的 DNA 相比较,从干蛇胆和白酒浸泡蛇胆的胆衣和胆汁中所提的 DNA 降解程度较大。鸭胆的降解程度较大与收集样本之前较长时间于室温保存有关。

提得的模板 DNA 直接用于 PCR 扩增时,鸭胆及乌梢蛇肌肉扩增效率高,药材蛇胆中,除部分外均能扩增出约 400 bp 的 DNA 片段 (图 2A)。将未扩增出目的片段的药材模板 DNA 用 DNA 纯化试剂盒 (上海华舜公司) 纯化后再进行 PCR 扩增,在约 400bp 处均有显著的目的片段,其前是引物二聚体,扩增对照中无目的片段,仅有引物二聚体 (图 2B)。

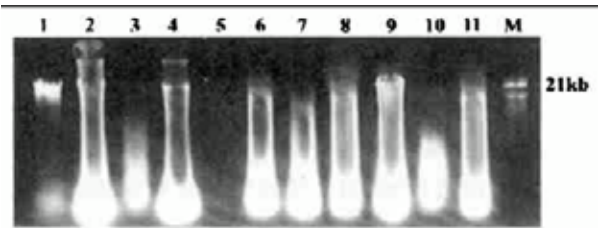


Fig 1 Agarose gel electrophoresis of DNA extracted from crude snake gallbladder, fresh duck gallbladder and frozen snake muscle
Lane 1 - 11: W-j, W1-y, W1-z, W2-y, W2-z, F1-y, F1-z, S1-y, S1-z, Y-y, Y-z, respectively; M: DNA size marker, λ DNA-EcoRI, HindIII digested

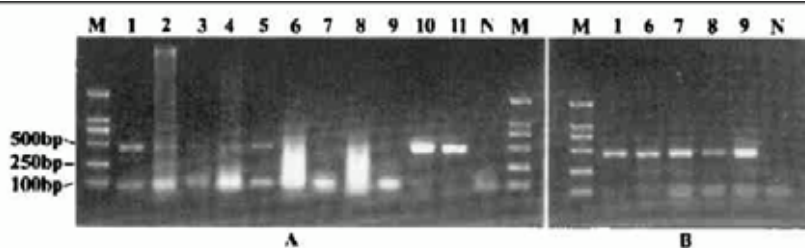


Fig 2 Agarose gel electrophoresis of PCR amplifications of 12S rRNA gene fragment from template DNA (A) and purified template DNA (B)

Lane 1 - 11: The codes were the same as described in Fig 1; N: Negative control. M: DNA size marker, DL 2 000. The sample codes were shown in Tab 1

2 12S rRNA 基因片段的序列分析

对原动物棕黑锦蛇的肌肉(*Z-j*)和胆汁(*Z-z*)、干蛇胆的胆衣(*F2-y*)和胆汁(*F2-z*)及白酒浸泡蛇胆的胆衣(*S2-y*)和胆汁(*S2-z*)的扩增产物分别用 L1091 进行 12S rRNA 基因片段测序分析。结果表明:*Z-j* 和 *Z-z* 的 12S rRNA 基因片段碱基排列顺序完全一致;*F2-y* 和 *F2-z*, *S2-y* 和 *S2-z* 的碱基排列顺序完全一致,经 GenBank 中 BLAST 分析后表明:本研究的干蛇胆为网斑蟒 *Python reticulatus* 的胆,白酒浸泡的胆则为桓仁林蛙 *Rana huanrenensis* 的胆。

讨 论

模板 DNA 的提取与扩增是 DNA 分子标记研究的前提。中药材表面的外源性 DNA 污染及药材自身 DNA 的不同程度的降解,会影响 DNA 提取和扩增,给药材 DNA 的分析带来困难。对于外源性 DNA 的去除,通常采用刮去表层、洗涤和紫外线照射等方法^[12]。本文对药材进行流水浸泡及双蒸水冲洗以除去外源性 DNA 的污染。PCR 扩增时,模板 DNA 中杂质(如蛋白质、色素物质、多糖类和多酚类)去除的是否彻底,是影响 PCR 反应的关键。通过模板 DNA 的纯化,加入小牛血清白蛋白(BSA)和过量的 Taq 酶可达到成功的扩增^[13,14]。本实验在直接以药材蛇胆的胆衣或胆汁中所提取的 DNA 为模板扩增时,扩增效率低,甚至得不到目的片段,说明胆衣和胆汁的 DNA 提取液中含有抑制 PCR 反应的抑制物。胆衣的抑制物可能主要为一些降解的小分子 DNA,而从胆汁的 DNA 提取液除了一些降解的小分子 DNA 外,还可能有残留的胆色素和 Ca^{2+} 等金属离子。本实验中,用 DNA 纯化试剂盒纯化模板 DNA 可成功地去除抑制物,实现较高效率的扩增。

从蛇胆汁中提取到 DNA,其来源可能为胆衣脱

落的细胞以及伴随胆汁流入胆囊内的肝组织脱落细胞,胆汁 DNA 是否能用于 DNA 分子标记鉴定研究?本研究选取了冻存棕黑锦蛇的肌肉和胆汁、1 枚干蛇胆和 1 枚白酒浸泡蛇胆药材的胆衣和胆汁分别做 12S rRNA 基因片段测序研究。结果表明:同一种动物的胆衣和胆汁,肌肉和胆汁的碱基序列完全一致,证明胆汁中 DNA 确实来源于动物自身组织脱落细胞,可用于 DNA 分子标记鉴定研究;也证明本文在药材标本 DNA 提取、扩增和测序分析中无污染,所得序列结果可靠。提示 DNA 分子标记技术可用于动物分泌物类型的药材,如胆汁、蛇毒、蟾酥、麝香等的鉴定。

对两枚药材蛇胆的 DNA 测序分析表明:本研究中所用的干蛇胆为网斑蟒的胆,酒泡蛇胆为桓仁林蛙的胆。网斑蟒的分布地区为南亚和东南亚地区,我国无该种蛇分布,桓仁林蛙仅分布于中国辽宁,可见目前市场上药材蛇胆来源较广,存在伪品。加强质量管理,探索准确的鉴别方法很有必要。

在爬行动物中,12S rRNA 基因已被用于蛇类科级分类单元的系统发生、亚洲产龟类系统发生、三种鳄的亲源关系的研究。研究表明在引物 L1091 和 H1478 所扩增的约 400 bp 的 12S rRNA 基因片段序列中,不同蛇类和龟类之间有约 2% - 25% 的差异^[15-17]。此外,还有通过该基因片段对中药材龟甲进行分子标记鉴定^[18]。药材蛇胆伪品的原动物多属于鱼类、蛙类、鳖类和鸟类,它们的 12S rRNA 基因序列与蛇类有很大差异。本文成功地从蛇胆药材中提取到 DNA 并扩增得到约 400 bp 的 12S rRNA 基因片段,表明该基因片段可应用于蛇胆药材的鉴定。

REFERENCES:

- [1] Lu ZS. Identification of snake gallbladder [J]. *Bull Chin Mater Med* (in Chinese), 1985, 10(1): 18 - 19.

- [2] Yang YM, Xu XD, Xu GX, *et al.* Differentiation and identification of snake bile and the bile of some small animals [J]. *Bull Chin Mater Med* (in Chinese), 1987, **12**(6) :7 - 9 .
- [3] Zhi DS. A simple identification of snake gallbladder and its adulterants [J]. *Bull Chin Mater Med* (in Chinese), 1988, **13**(5) :13 .
- [4] Zhang H. A study on quality of snake gallbladder [J]. *Bull Chin Mater Med* (in Chinese), 1989, **12**(7) :10 - 13 .
- [5] Zhou SY. Preliminary trial on distinguishing snake bile and its reagents by ultra violet spectrum [J]. *Chin Pharm J* (in Chinese), 1989, **24**(5) :296 .
- [6] Wang Y, Wang YJ. A review of study on snake gallbladder [J]. *J Shenyang Coll Pharm* (in Chinese), 1993, **10**(1) :76 - 78 .
- [7] Lu GY, Cai QM, Wang YW. Ultraviolet spectrum is not proper to authenticate snake bile and its reagents . *Chin Pharm J* (in Chinese), 1994, **29**(3) :158 .
- [8] Cao H, But PPH, Shaw PC. Authentication of the Chinese drug “ Ku-Di-Dan ” (Herba Elephantopi) and its substitutes using random-primed polymerase chain reaction (PCR) [J]. *Acta Pharm Sin* (in Chinese), 1996, **31**(7) :543 - 553 .
- [9] Fushimi H, Komatsu K, Isobe M, *et al.* Application of PCR-RFLP and MASA analyses on 18S ribosomal RNA gene sequence for the identification of three ginseng drugs [J]. *Biol Pharm Bull*, 1997, **20**(6) :765 - 770 .
- [10] Wang YQ, Zhou KY, Xu LS, *et al.* Authentication of an animal crude drug, *Zaocys*, by diagnostic PCR [J]. *Biol Pharm Bull*, 2000, **23**(5) :585 - 588 .
- [11] Zhang NR. Research in medicinal worth of bile in various kinds of animals [J]. *Zhengjiang J Trad Chin Med* (in Chinese), 1985, (9) :428 - 429 .
- [12] Wang YQ, Xu LS, Xu GJ, *et al.* Prospects of application of DNA molecular genetic marker to pharmacognostical identification [J]. *China J Chin Mater Med* (in Chinese), 1997, **22**(10) :583 - 586 .
- [13] Cai ZH, Li P, Tong TX, *et al.* Molecular biological identification of the Chinese drug “ Bei Mu ” (*Bulbus Fritillariae*) [J]. *Acta Pharm Sin* (in Chinese), 2000, **35**(4) :309 - 312 .
- [14] Wang YM, Zhou KY, Wu P, *et al.* Isolation and amplification of DNA from tortoise and turtle shells [J]. *Acta Pharm Sin* (in Chinese), 1996, **31**(6) :472 - 476 .
- [15] Herse PJ, Maxson LR, Dowling HG, *et al.* Higher-level snake phylogeny inferred from mitochondrial DNA sequences of 12S rRNA and 16S rRNA genes [J]. *Mol Biol Evol*, 1995, **12**(2) :259 - 265 .
- [16] Wu P, Zhou KY, Yang Q. Molecular systematics of Asian turtles based on sequence of 12S rRNA gene [J]. *Acta Zool Sin* (in Chinese), 1999, **45**(3) :260 - 267 .
- [17] Gatesy J, Amato GD. Sequence similarity of 12S ribosomal segment of mitochondrial DNAs of gharial and false gharial [J]. *Copia*, 1992, **1**:241 - 243 .
- [18] Liu ZQ, Wang YQ, Zhou KY, *et al.* Study on highly specific diagnostic PCR of the traditional Chinese medicine tortoise and its original animals [J]. *Acta Pharm Sin* (in Chinese), 1999, **34**(12) :941 - 945 .

IDENTIFICATION OF CHINESE CRUDE DRUG SNAKE GALLBLADDER BY DNA MOLECULAR MARKER

LIU Xiang-hua, WANG Yi-quan, LIU Zhong-quan, TONG Zong-zhong, ZHOU Kai-ya

(*Institute of Genetic Resources, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China*)

ABSTRACT: AIM It is difficult to identify the Chinese crude drug snake gallbladder accurately by morphological and microscopical characteristics or chemical components only. In order to solve the problem, the technique based on DNA molecular marker was introduced into the authentication of snake gallbladder.

METHODS DNA templates were extracted from the membrane or the bile of snake gallbladder, and also from the muscle of the original animal *Elaphe schrenckii*. About 400 bp DNA fragments of 12S rRNA gene were amplified from the templates and sequenced subsequently. **RESULTS** Enough amounts of DNA templates could be extracted from a bit of membrane or bile of snake gallbladder. The sequence of amplicons from the membrane, bile and muscle of the same individual were identical completely. **CONCLUSION** The technique of DNA molecular marker could be used for the authentication of snake gallbladder and bile. The results indicate that the technique could be used for the identification of crude drugs from other animal secretion. DNA sequence analysis also demonstrated that the origins of commercial snake gallbladder were complicated and more efficient quality control was necessary for supervising the crude drug in the market.

KEY WORDS: snake gallbladder; membrane of gallbladder; bile; PCR amplification; DNA sequence