

# 中药材龟甲的分子鉴定研究

吴平\* 周开亚 徐珞珊\*\* 滕健昌\*\*\*

(南京师范大学生物系,南京 210097; \*\* 中国药科大学药学研究室,南京 210009; \*\*\* 江苏省药品检验所,南京 210008)

**摘要** 用 PCR 产物直接测序法对中药材龟甲(板)进行鉴别。从乌龟 *Chine mys reevesii* 和其他 20 种产地为中国或东南亚国家的龟类的组织材料中提取 DNA,扩增约 110 bp 的线粒体 12S rRNA 基因片段并进行序列分析,构建了 21 种龟类的 12S rRNA 基因片段序列数据库。序列比较的结果表明乌龟与其它 20 种龟类的这段序列均有差别,序列差异在 3.7 ~ 15.7% 之间。从江苏省药品检验所提供的 19 块龟甲样品上各取样 0.1 ~ 0.5 g 提取 DNA,扩增与上述相同的基因片段,与构建的数据库进行比较,结果表明 19 块龟甲中只有 3 块的原动物为乌龟,其余的龟甲均为混淆品。本文的结果为药材龟甲的鉴定找到了有效、可靠的分子遗传标记方法。

**关键词** 龟甲(板);分子鉴定;PCR;12S rRNA 基因片段序列

中国药典(1995 年版)规定中药材龟甲(板)为乌龟 *Chine mys reevesii* Gray 的背甲和腹甲。由于乌龟资源减少,加之东南亚国家的商品龟甲进入国内市场<sup>[1]</sup>,致使商品龟甲中出现大量混淆品,据报道有 17 种之多<sup>[1-7]</sup>。龟甲的鉴定主要以纹理、颜色等形态学特征为主<sup>[8]</sup>,但由于乌龟的龟甲(特别是腹甲)纹理、颜色存在个体差异,鉴定工作有一定难度,特别是当龟甲已被去除角质(皮)或为碎片时,鉴定工作就更加困难<sup>[9]</sup>。用理化分析方法对龟甲鉴定的研究虽也有报道<sup>[3,4]</sup>,但由于正品与一些混淆品的差别并不显著,不能作为正确鉴定的依据。

分子遗传标记技术为中药材的鉴别提供一条新途径。随机扩增多态 DNA(RAPD)技术已分别用于苦地胆和蛇类药材及它们的混淆品的鉴定研究<sup>[10,11]</sup>。作者已用 PCR(聚合酶链式反应)技术从中药材龟板及鳖甲的 DNA 提取液

中扩增了线粒体 DNA 细胞色素 b 基因片段<sup>[12]</sup>;用 PCR 产物直接测序技术和 PCR 产物的限制性片段长度多态分析(PCR-RFLP)技术对海马类药材的分子鉴定研究也已完成<sup>[13]</sup>。

本文用 PCR 产物直接测序技术对中药材龟甲进行鉴别。

## 材 料 和 方 法

**检品** 用于鉴定的 19 号龟甲(JP1 ~ JP19)由江苏省药品检验所提供。

**对照品** 乌龟和其它 20 种龟分别在江苏南京、广西南宁、四川重庆及安徽的市场上购得,包括文献报道过 17 种混淆品中的 12 种原动物,其中有市场主流混淆品缅甸陆龟、眼斑沼龟和齿缘摄龟<sup>[5]</sup>。所有种类均分布在中国和东南亚国家,除马来闭壳龟 *Cuora amboi mensis*、马来龟 *Malaye mys subtrijuga*、眼斑沼龟 *Morenia ocellata*、马来巨龟 *Orlitia borneensis*、黑龟 *Melanochelys trijuga*、粗颈龟 *Siebenrockiella crassicollis* 和庙龟 *Hiere mys annandalei* 等 7 种外,其余均在中国有分布。样品来源、取样的个体数及组织见表 1。

本文于 1997 年 1 月 13 日收到。

本文为国家自然科学基金项目, No. 39570865

\* 现址:中国科学院南京地质古生物研究所现代古生物学与地层学开放实验室,南京 210008

Tab 1 Source, number and tissue of 21 species of turtles

Species	Code	Source	Number	Tissue
乌龟 <i>Chine mys reevesii</i>	Cr	Nanjing, Jiangsu	4	Blood, Muscle
* 黄喉拟水龟 <i>Maure mys mutica</i>	Mu	Nanjing, Jiangsu	2	Blood
花龟 <i>Ocadia sinensis</i>	Os	Nanning, Guangxi	2	Blood, Muscle
四眼斑水龟 <i>Sacalia bealei</i>	Sb	Nanning, Guangxi	3	Blood, Muscle
金头闭壳龟 <i>Cuora aurocapitata</i>	Cau	Anhui	2	Muscle
* 马来闭壳龟 <i>Cuora amboi mensis</i>	Ca m	Nanning, Guangxi, Chongqing, Sichuan	3	Blood
黄额盒龟 <i>Cistoclemmys galbini frons</i>	Cg	Nanning, Guangxi, Chongqing, Sichuan	4	Muscle, shell
* 黄缘盒龟 <i>Cistoclemmys flavo marginata</i>	Cf	Nanjing, Jiangsu, Anhui	3	Blood, Muscle
* 马来龟 <i>Malayemyss subtrijuga</i>	Ms	Nanning, Guangxi, Chongqing, Sichuan	2	Blood
马来巨龟 <i>Orlitia borneensis</i>	Ob	Nanjing, Jiangsu	2	Muscle
* 大东方龟 <i>Heosemys grandis</i>	Hg	Nanning, Guangxi	2	Blood, Muscle
* 齿缘摄龟 <i>Cyclemys dentata</i>	Cd	Nanning, Guangxi, Chongqing, Sichuan	3	Blood, Muscle
锯缘摄龟 <i>Pyxidea mouhotii</i>	P m	Nanning, Guangxi, Chongqing, Sichuan	2	Blood, Muscle
黑龟 <i>Melanochelys trijuga</i>	Mt	Nanning, Guangxi	2	Blood
粗颈龟 <i>Siebenrockiella crassicollis</i>	Sc	Nanjing, Jiangsu	2	Muscle
* 地龟 <i>Geomyda spengleri</i>	Gs	Nanning, Guangxi	3	Blood, Shell
* 庙龟 <i>Hieremyss annandalei</i>	Ha	Nanning, Guangxi	2	Blood
* 眼斑沼龟 <i>Morenia ocellata</i>	Mo	Nanjing, Jiangsu	3	Muscle
* 缅甸陆龟 <i>Indotestudo elongata</i>	Ie	Nanjing, Jiangsu	3	Blood, Muscle
* 凹甲陆龟 <i>Manouria impressa</i>	Mi	Nanning, Guangxi, Chongqing, Sichuan	2	Blood, Muscle
* 平胸龟 <i>Platysternon megacephalum</i>	Pl m	Nanjing, Jiangsu, Nanning, Guangxi	3	Blood, Muscle

\* Substitutes of turtles

活体龟类 DNA 提取和检测 通过腹甲作心脏穿刺术取约 100  $\mu$ l 血液或取肌肉 0.05 g, 参照 Kocher 等<sup>[14]</sup>的方法提取总 DNA, 将 DNA 提取液分别取 10  $\mu$ l 点样于 1% 琼脂糖凝胶上电泳, EB 染色, 紫外透射仪观察。

龟甲 DNA 的提取和检测 为防止可能来自外源的 DNA 污染, 实验前对实验室环境、试剂及设备进行了严格的灭菌处理。离心管、吸头均为一次性使用, 实验操作过程在超净工作台上进行。

取龟甲约 0.1 ~ 0.5 g, 用解剖刀细心将表面一层刮去。家用洗涤剂 and 双蒸水清洗后, 在离 20 W 紫外杀菌灯 20 cm 处照射 30 min。用铜药臼捣成粉末, 转入 1.5 ml 离心管中, 并取另 1 管作提取空白对照。加入约 20 倍体积的 0.5 mol·L<sup>-1</sup> EDTA (pH 8.0), 56 °C 脱钙 48 h, 其间换 2 次 EDTA 溶液。离心倒去 EDTA 溶液, 加入 0.5 ml 裂解液 (含 Tris-HCl 0.01 mol·L<sup>-1</sup>, pH 8.0, EDTA 0.01 mol·L<sup>-1</sup>, NaCl 0.1 mol·L<sup>-1</sup>, SDS 2%, 蛋白酶 K 20  $\mu$ g·ml<sup>-1</sup>,

DTT 0.039 mol·L<sup>-1</sup>), 56 °C 水浴中保温过夜。酚、氯仿抽提, 乙醇或异丙醇沉淀, 离心后用 100  $\mu$ l 双蒸水溶解沉淀。

检测同活体龟类 DNA 的检测。

PCR 扩增 所用引物为 L1373 5'-CGCTG CAGAGAAATGGGCTACATTTTCT-3', H1478 5'-TGACTGCAGAGGGTGACGGGCGGTGTGT-3'<sup>[15]</sup>, L、H 分别为轻链和重链, 数字与人 mtDNA 序列对应。用于扩增约 110 bp 的线粒体 12S rRNA 基因片段。

PCR 反应体积为 100  $\mu$ l, 反应液中含 10 mmol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl, pH 8.3, 50 mmol·L<sup>-1</sup> KCl, 0.1% Triton X-100, 2.5 mmol·L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>, 200  $\mu$ g·ml<sup>-1</sup> BSA, 100  $\mu$ mol·L<sup>-1</sup> 四种 dNTP, 10 pmol·L<sup>-1</sup> 两个引物, 3U Taq 酶。PCR 反应在 PE2400 型 PCR 仪上进行, 循环参数为 95 °C 变性 40 s, 52 °C 退火 60 s, 72 °C 延伸 60 s, 循环次数为 35 次。提取液和对照管同时进行扩增, 另设 1 管扩增对照。取 5  $\mu$ l 扩增产物点样于 2.5% 琼脂糖凝胶上电泳, EB 染色,

紫外透射仪观察。

序列分析 扩增产物用 Wizard™ PCR Preps DNA 纯化试剂盒 (Promega 公司) 纯化, 微量荧光计进行纯化产物的定量后, 在 Bio Rad 3000 Xi 型测序仪上用银染方法 (Promega 公司) 测序。

### 结 果

从新鲜组织中提取到的 DNA 经 PCR 反

应, 所有样品均可获得阳性扩增产物。用 L1373 和 H1478 两条引物分别测序, 测序结果稳定, 重复性好。每种龟均测序 2 个以上的个体, 未检测到个体差异。用所得到的序列构建龟类动物的 12S rRNA 基因片段序列数据库 (图 1)。从数据库中可以看出, 乌龟与其余所有龟类的序列均有差别, 与花龟的序列差异最小, 为 3.7% (4/109 bp), 与眼斑沼龟的序列差异最大, 为 15.7% (17/108 bp)。

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	
Cr	ATACTAGAAA	TAA-ATTTAC	GGAAAGGAAC	TATGAAATAA	GTCCACACAAG	TAGGATTITAG	CAGTAAAACCG	GGATCATGAA	TACCCGATTT	AAGTCGGTCC	TGAGGTCCG	
Mu	.C.T.....	.C.....	.G.....	.C.....	-.....T.....	.....	.....	.....	.G..A.....	.....	.....	
Os	.C.....	.....	.....	.....	C.....	.....	T.....	A.....	.....	.....	.....	
Sb	.C.....	T.....	.....T.....	.....	.....	.....	T.....	G..A.....	.C.....	.....	.....	
Cau	.C.....	T...C.....	.....	C.....	.....	G.T.....	T...G	CG..A.C.....	.....	.....	.....	
Cam	.T.....	TT...C.....	.....	.....	.....	G.....	-C	CG..A.C.....	.....	.....	.....	
Cg	.....	T...C.....	.....	T.....	.....	G.....	-.....	A.C.....	.....	.....	.....	
Cf	G.....	T...C.....	.....	.....	T.....	T...G.T.....	-G	G..A.C.....	.....	.....	.....	
Ms	.C.T.....	T.....	C.A.....	CT.....	TG.....	.....	T.....	-G..TA.....	AC.....	.....	.....	
Ob	.CCT.....	T.AT.....	G.A.....	CT.....	T.....	.....	T.....	-G..TAG.....	C.....	.....	.....	
Hg	.C.....	-C.....	.....	T.....	C.....	.....	T.....	-G..TA.....	AC.....	.....	.....	
Cd	.C.....	T.....	G...C.....	T.....	.....	TA.....	T...G	G..TA.....	CT..C..C.....	.....	.....	
Pm	.....	T...C.....	A.....	.....	.....	G.....	-G..A.C.....	.....	.....	.....	.....	
Mt	.CTT.....	C...C.....	G.....	.....	C.....	.....	T.A.....	-G..A.....	CT.....	.....	.....	
Sc	.C.....	C.C...A.....	.....	CT.....	T.G.....	.....	GT.....	-G..G..A.C.....	T.....	C.....	.....	
Gs	.G.....	T.....	CGAA.....	T.....	.....	.....	A.....	-AC..G.....	C.....	A.....	.....	
Ha	.C.....	-.....	.....	T.T.....	C.....	.....	TA.A..G.....	-G..TA.....	CT.....	T.....	.....	
Mo	.....	T...C.....	A..G.A..C.....	TG A.....	T.....	C.....	.....	-G..TA.....	AC.....	.....	.....	
Ie	.A.....	T...-.....	.....	C...TT.T.....	.....	.....	TAA.....	-G..T.....	C...C..A..CA.....	.....	.....	
Mi	.C.....	T...ACC.....	.....	C.....	T.....	C.....	.....	T.....	-A.....	C.....	.....	
Pm	T.T.....	G.C.A..A.....	C.....	-.....	T.....	.....	T.....	A...G	AG..A.....	.....	.....	

Fig 1 Sequence database of 12S rRNA gene fragment from 21 species of turtles. Dots indicate sequence identity with Chinese three-keeled pond turtle, whereas dashes denote deletions.

从大多数的龟甲检品的 DNA 提取液中能够检测到 DNA。从图 2 可见, 龟板中的 DNA 均有不同程度的降解。提取对照管未检测到 DNA。经 PCR 扩增所有的样品均得到阳性产物, 而提取对照和扩增对照均为阴性 (图 3), 说明提取试剂和扩增试剂中均无外源 DNA 污染。所有鉴定样品的序列分析结果见图 4。

与构建的 21 种龟类的 12S RNA 基因片段序列数据库进行比较, 只有 1 块 (检品 14 号) 在数据库中不能确定其原动物来源, 但可以确定其为混淆品。19 号检品的鉴定结果见表 2。从表 2 可以看出, 所有检品中除 3 块符合中国药典规定外, 其余均不属药典品种。混淆品中最多为缅甸陆龟, 其次为眼斑沼龟, 这与文

献<sup>[5]</sup>基本相符。



Fig 2 Agarose gel electrophoresis of DNA extracts from turtle shells. Lane 1, 2, 3: DNA extracts from turtle shells No. 1, No. 2 and No. 3, respectively; lane 4: extract control; M: DNA size marker: *EcoRI*, *HindIII* digested DNA.

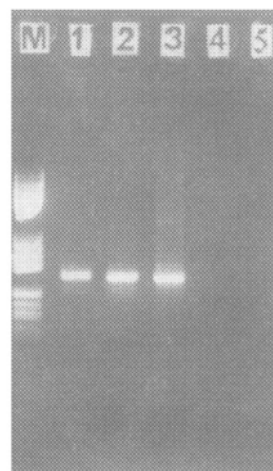


Fig 3 Agarose gel electrophoresis of PCR amplifications of gene fragment of 12S rRNA from DNA extracts. Lane 1, 2, 3: PCR products from turtle shell No. 1, No. 2 and No. 3, respectively; lane 4: extract control; lane 5: amplify control; M: DNA size marker: *HaeIII* digested PBR322.

JP1 AAAC TAGAAATA-TTTTACGGAAG-AACTATGAAACAAGTCTTATAAGTAGGATTTAGCAGTAAATAAGGATCAG-AATGCCCTATTTAAGCCGGCCCTAAGGCACGC  
 JP2 ACATTAGAAATTAATTTACGGAAGGAAACTATGAAACTAGTCTCTGCAAGTAGGATTTAGCAGTAAACCTGGATCAT-AATGCCCTAATTTAAACCCGGTCTGAGGTCCGC  
 JP3 ACATTAGAAATTAATTTACGGAAGGAAACTATGAAACTAGTCTCTGCAAGTAGGATTTAGCAGTAAACCTGGATCAT-AATGCCCTAATTTAAACCCGGTCTGAGGTCCGC  
 JP4 ACATTAGAAATTAATTTACGGAAGGAAACTATGAAACTAGTCTCTGCAAGTAGGATTTAGCAGTAAATAAGGATCAG-AATGCCCTATTTAAGCCGGCCCTAAGGCACGC  
 JP5 AAAC TAGAAATA-TTTTACGGAAG-AACTATGAAACAAGTCTTATAAGTAGGATTTAGCAGTAAATAAGGATCAG-AATGCCCTATTTAAGCCGGCCCTAAGGCACGC  
 JP6 AAAC TAGAAATA-TTTTACGGAAG-AACTATGAAACAAGTCTTATAAGTAGGATTTAGCAGTAAATAAGGATCAG-AATGCCCTATTTAAGCCGGCCCTAAGGCACGC  
 JP7 AAAC TAGAAATA-TTTTACGGAAG-AACTATGAAACAAGTCTTATAAGTAGGATTTAGCAGTAAATAAGGATCAG-AATGCCCTATTTAAGCCGGCCCTAAGGCACGC  
 JP8 ACTTTAGAAATCAATTCACGGAAGGAACTATGAAATAAGTCCCAAGCAGGATTTAGCAGTAAACTGAGATCAG-AGTGCCCAATTTAAGCTGGTCTGAGGTCCGC  
 JP9 ACTTTAGAAATCAATTCACGGAAGGAACTATGAAATAAGTCCCAAGCAGGATTTAGCAGTAAACTGAGATCAG-AGTGCCCAATTTAAGCTGGTCTGAGGTCCGC  
 JP10 AAAC TAGAAATA-TTTTACGGAAG-AACTATGAAACAAGTCTTATAAGTAGGATTTAGCAGTAAATAAGGATCAG-AATGCCCTATTTAAGCCGGCCCTAAGGCACGC  
 JP11 ATACTAGAAATTAATTCACAGAAGGAAACCATGAAATTGATCCCATAGCAGGATTTAGCAGTAAACCCGGATCAG-AATGCCCTAATTTAAACCCGGTCTGAGGTCCGC  
 JP12 ATACTAGAAATTAATTCACAGAAGGAAACCATGAAATTGATCCCATAGCAGGATTTAGCAGTAAACCCGGATCAG-AATGCCCTAATTTAAACCCGGTCTGAGGTCCGC  
 JP13 ATACTAGAAATTAATTCACAGAAGGAAACCATGAAATTGATCCCATAGCAGGATTTAGCAGTAAACCCGGATCAG-AATGCCCTAATTTAAACCCGGTCTGAGGTCCGC  
 JP14 AAAC TAGAAATA-TTTTACGGAAG-AACTATGAAACAAGTCT?ATAAGTAGGATTTAGCAGTAAATAAGGATCAG-AATGCCCTATTTAAGCCGG?CCTAAGGCACGC  
 JP15 ATACTAGAAATTAATTCACAGAAGGAAACCATGAAATTGATCCCATAGCAGGATTTAGCAGTAAACCCGGATCAG-AATGCCCTAATTTAAACCCGGTCTGAGGTCCGC  
 JP16 ACATTAGAAATTAATTTACGGAAGGAAACTATGAAACTAGTCTCTGCAAGTAGGATTTAGCAGTAAACCTGGATCAT-AATGCCCTAATTTAAACCCGGTCTGAGGTCCGC  
 JP17 ATACTAGAAATAAATTTACGGAAGGAACTATGAAATAAGTCCCAAGTAGGATTTAGCAGTAAACCCGGATCATGAAATACCCGATTTAAGTCGGTCTGAGGTCCGC  
 JP18 ATACTAGAAATAAATTTACGGAAGGAACTATGAAATAAGTCCCAAGTAGGATTTAGCAGTAAACCCGGATCATGAAATACCCGATTTAAGTCGGTCTGAGGTCCGC  
 JP19 ATACTAGAAATAAATTTACGGAAGGAACTATGAAATAAGTCCCAAGTAGGATTTAGCAGTAAACCCGGATCATGAAATACCCGATTTAAGTCGGTCTGAGGTCCGC

Fig 4 Sequences of 12S rRNA gene fragment from 19 turtle shells. Dashes indicate deletion, whereas ? Indicate the unknown nucleotide.

Tab 2 Identification results of 19 turtle shell samples\*

No.	Identification results	No.	Identification results
JP1( Plastron, Fragment)	Substitutes( Ie)	JP11( Carapace)	Substitutes( Mo)
JP2( Plastron)	Substitutes( Ms)	JP12( Carapace)	Substitutes( Mo)
JP3( Plastron)	Substitutes( Ms)	JP13( Carapace)	Substitutes( Mo)
JP4( Plastron)	Substitutes( Ie)	JP14( Plastron)	Substitutes( Original animal not identified)
JP5( Plastron)	Substitutes( Ie)	JP15( Plastron)	Substitutes( Mo)
JP6( Plastron)	Substitutes( Ie)	JP16( Plastron)	Substitutes( Ms)
JP7( Plastron)	Substitutes( Ie)	JP17( Plastron)	Quality goods
JP8( Plastron)	Substitutes( Mt)	JP18( Plastron)	Quality goods
JP9( Plastron)	Substitutes( Mt)	JP19( Plastron)	Quality goods
JP10( Carapace)	Substitutes( Ie)		

\* Code is identity with Tab 1.

## 讨 论

龟甲的鉴定是一项非常重要的工作,但传统的性状鉴别存在着很大的局限性,理化分析的结果表明各种龟板之间差别不大,亦不宜作为鉴别的依据。DNA 的信息量大,又具有物种特异性的特点,如何利用 DNA 的这些特点寻找到乌龟所特有的分子遗传标记用于龟甲的鉴定有 3 个需要解决的问题。一是龟甲中还有没有可被利用的 DNA? 二是如果有残存的 DNA,如何将其直接用于龟类种间的鉴别比较? 三是能否找到可区别乌龟和其它龟类,但在种内又比较保守的基因。

对中药材龟甲、鳖甲的研究<sup>[12]</sup>给我们一个重要的启示就是龟甲中残存着可用于 PCR 扩增的微量 DNA。本文从乌龟和龟甲混淆品的原动物入手,用 PCR 技术扩增 12S rRNA 基因片段,测定其序列。然后再利用龟甲中残存的 DNA,用 PCR 技术扩增相同的基因片段,与乌龟及其它龟的序列进行比较,达到对龟甲正品和混淆品的鉴别目标。12S rRNA 基因属于线粒体基因组中的非蛋白编码基因,在线粒体基因组中又相对保守,将该基因的片段用于龟甲鉴别的结果显示乌龟与其它 20 种龟均有明显差别,且缺乏个体差异,表明我们的选择是合适的。

虽然我们构建的 21 种龟类 12S rRNA 基

因片段序列数据库未能包括所有文献报道的混淆品,但正品和商品流通中数量较大的混淆品均已包含在其中。在实际工作中,只要从大量的龟甲(整片或碎片)中随机抽取若干块各取少量样品用本文提供的方法和数据分析鉴别,就可以大致确定药源中的正品比例及混淆品种类。当然在实验中必须严格防止外源 DNA 特别是来自人的 DNA 污染,才能确保鉴定的准确性。

致谢 本文的样品采集得到南京师范大学生物系徐信荣、江建平同志的帮助,安徽师范大学生物系聂刘旺同志提供了金头闭壳龟和黄缘盒龟的 DNA 样品。

## 参 考 文 献

- 1 张继. 龟板及几种进口“龟板”的鉴定. 药物分析杂志, 1987, 7: 90
- 2 章容. 两种闭壳龟龟板的鉴别及本草考证. 中药通报, 1985, 10: 13
- 3 陆敏仪, 钟丽新. 4 种龟板的鉴别和化学成分含量测定的比较. 中药通报, 1986, 11: 15
- 4 王建云, 李自林, 王达瑞, 等. 凹甲陆龟腹甲与乌龟腹甲的鉴别及部分化学成分的比较. 中药通报, 1988, 13: 6
- 5 黎跃成, 杨修齐. 进口“龟板”的鉴定. 中药材, 1988, 11: 19
- 6 文瑞良, 郭振良. 三种龟板混淆品的性状鉴别. 中药材, 1994, 17: 24
- 7 安然, 任伟, 赵玉香, 等. 龟板及其混淆品眼斑沼龟的鉴别. 中草药, 1995, 26: 312
- 8 林惠蓉, 陈绍基主编. 中药材鉴别原色图谱. 广州:

- 广东科技出版社, 1988: 102 ~ 114
- 9 全俊太, 孙景安, 孙秀珍, 等. 如何鉴别掉皮龟甲和破碎龟甲. 中药材, 1994, 17: 20
- 10 Cao H, But PPH, Shaw PC. Authentication of the Chinese drug "ku-di-dan" (Herda Elephantopi) and its substitutes using random primed polymerase chain reaction (PCR). *Acta Pharma Sini*, 1996, 31: 543
- 11 王义权, 周开亚. 蛇类药材分子遗传标记鉴别的初步研究. 药 学 学 报, 1997, 32: 384
- 12 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. 药 学 学 报, 1996, 31: 472
- 13 吴平, 周开亚, 张朝晖, 等. 海马类药材分子遗传标记鉴定研究. 药 学 学 报, 1998, 3: 226
- 14 Kocher TD, Thomas WK, Meyer A, *et al.* Dynamics of mitochondrial evolution in animals: a mplification and sequencing with conserved primers. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, 86: 6196
- 15 Thomas RH, Schaffner S, Wilson A, *et al.* DNA phylogeny of the extinct marsupial wolf. *Nature*, 1989, 340: 465

## MOLECULAR IDENTIFICATION OF THE CHINESE DRUG TURTLE SHELLS

Wu Ping( Wu P), Zhou Kaiya( Zhou KY), Xu Luoshan( Xu LS)<sup>\*</sup> and Teng Jianchang( Teng JC)<sup>\*\*</sup>

( Department of Biology, Nanjing Normal University, Nanjing 210097 ;

<sup>\*</sup> Division of Pharmacognosy, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009 ;

<sup>\*\*</sup> Jiangsu Institute for Drug Control, Nanjing 210008)

**ABSTRACT** This paper reports a new method to identify the Chinese drug turtle shells using PCR product direct sequencing method. DNA was extracted from tissues of the Chinese three-keeled pond turtle *Chinemys reevesii* and 20 other species of turtles occurring in China and Southeast Asian countries. One hundred and ten base pairs of mitochondrial 12S rRNA gene fragment were amplified from the extract using PCR technique and obtained sequences. These sequences were used to construct 12S rRNA gene fragment sequence database for the 21 turtle species. Comparison of these sequences indicated that the sequence from the Chinese three-keeled pond turtle is different from that of all the other 20 turtle species. The sequence divergence is 3.7 ~ 15.7%. DNA was extracted from 0.1 ~ 0.5 g of shell from 19 turtle shells provided by the Jiangsu Institute for Drug Control and 12S rRNA gene fragment was amplified and sequenced. Comparison of the sequences from the 19 turtle shells and 12S rRNA gene fragment sequence database indicated that only 3 samples are shells of the Chinese three-keeled pond turtle specified in the Pharmacopoeia of the People's Republic of China and the others are substitutes. The technique used in the present paper was found to be effective and reliable for the identification of turtle shells.

**KEY WORDS** Turtle shell; Molecular identification; PCR; Sequence of 12S rRNA gene fragment