

· 药材

中药材鳖甲的位点特异性 PCR鉴定研究

刘忠权,王义权,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 本研究旨在建立一种简便、实用的鳖甲 DNA 分子鉴定方法。方法 根据中华鳖和鳖甲混淆品原动植物的 12S rRNA 基因片段的序列数据库,找出中华鳖与其它鳖科动物有明显区别的位点,设计 1 对能特异性鉴别中华鳖的引物,然后利用鳖甲中残存的 DNA,通过 PCR 扩增,即可准确鉴别鳖甲。结果 用这对引物对不同来源的 10 块鳖甲进行鉴定结果表明,其中有 3 块为伪品,结果与 DNA 序列分析鉴定一致。还测定了斑鳖和鳖甲—伪品 12S rRNA 基因片段序列。结论 该引物配置药材鉴定试剂盒可在鳖甲类药材鉴定使用。

关键词: 鳖甲;位点特异性引物;鉴别 PCR。

中图分类号: R282.740.3 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2001)08-0736-03

Authentication of TCM *Carapax Trionycis* by allele-specific diagnostic polymerase chain reaction

LIU Zhong-quan, WANG Yi-quan, ZHOU Kai-ya

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

Abstract Object To develop a convenient and practical method for the identification of *Carapax Trionycis*. **Methods** Based on the sequence variations of 12S rRNA gene between *Pelodiscus sinensis* and other softshell turtles, a pair of allele-specific primers was designed to distinguish *P. sinensis* from other species of Trionychidae. DNA were extracted and amplified and *Carapax Trionycis* could be identified accurately by polymerase chain reaction (PCR) using the primers. **Results** Ten samples of turtle shell from different sources were indentified by the allele-specific PCR with the primers. The result indicated that three samples were substitutes of *Carapax Trionycis*, consistent with the result from DNA sequence analysis. The mitochondrial 12S rRNA gene fragment of *P. maculatus* and a faked imitation had also been sequenced. **Conclusion** The primers could be used as key components in *Carapax Trionycis* identification kit.

Key words *Carapax Trionycis*; allele-specific primer; diagnostic polymerase chain reaction (PCR)

早在《神农本草经》就有鳖甲可入药记载,李时珍在《本草纲目》中又增添了鳖甲的药用总结。1995 年版中国药典规定中药鳖甲为鳖科动物鳖 *Trionyx sinensis* Wiegmann 的背甲^[1](*Trionyx sinensis* 现为 *Pelodiscus sinensis*^[2])。具有滋阴潜阳,软坚散结,退热除蒸之功效。但药材原动物来源较复杂,据报道伪混品有山瑞鳖 *Pelea steindachneri* (Siebenrock) 和缘板鳖 *Lissemys punctata* (Bonnaterre) 以及鼋 *Platemys bibroni* (Owen) 的背甲^[3,4],由于药材进口,鳖甲的商品药材来源可能还要复杂一些。鳖甲传统鉴定主要依据药材性状,粉末特征及组织结构等形态学特征^[3]。由于传统鉴定方法与鉴定者的经验有

关,受主观影响程度较大。为寻找新的鉴定方法,王亚明等首次从药材鳖甲中抽提出 DNA 并扩增约 500bp 的线粒体 *Cyt b* 基因片段^[5];吴平等从中华鳖和山瑞鳖原动物组织材料中提取 DNA,扩增约 110 bp 的线粒体 12S rRNA 基因片段并测序,结果表明,中华鳖与其它 2 种鳖科动物的这段 DNA 序列有明显差异^[6],从而达到鉴定鳖甲原动物的目的。然而 DNA 测序成本高,技术复杂,实际应用有困难。

本文根据已有的中华鳖和鳖甲混淆品原动物山瑞鳖、缘板鳖的 12S rRNA 基因片段的序列数据库,以及测定的斑鳖该段序列,经对位排列,找出中华鳖与其它鳖有明显区别的位点,设计 1 对能特异性鉴

收稿日期: 2000-11-10

基金项目: 国家自然科学基金 (No. 39870913)、江苏教委科学基金 (98KJB360010) 和江苏省“333 工程”人才培养基金资助

作者简介: 刘忠权 (1963-),男,江苏兴化市人,副教授,博士生。分别在《Planta Medica》、《药学报》、《中草药》等刊物上发表论文 10 多篇。现从事动物分子生物学和中药材分子鉴定等研究工作。

定中华鳖的引物,然后利用鳖甲中残存的 DNA,通过 PCR扩增,即可准确鉴别鳖甲。

1 材料与方法

1.1 实验材料:共 4个属 4种鳖科动物 中华鳖和山瑞鳖为新鲜冻存标本,由吴平博士鉴定,存放在南京师范大学遗传资源研究所。斑鳖 *Pelochelys maculatus* (Heude)为干燥标本蹠趾皮下少许肌肉,由苏州铁道师范学院生物系提供,详见表 1 鳖甲共 10块,4块 (JP1-JP4)由江苏省药品检验所提供;6块 (JP5-JP10)收集于南京某些饭店

表 1 4种鳖科原动物样品

种名	代码	数量	来源
中华鳖 <i>Pelodiscus sinensis</i> [2]	Pi	4	江苏南京,广西南宁
山瑞鳖 <i>Palea steindachneri</i>	Pt	2	广西南宁
斑鳖 <i>Pelochelys maculatus</i>	Pm	1	苏州铁道师范学院生物系
缘板鳖 <i>Lissemys punctata</i>	Lp		Genbank

1.2 总 DNA的提取:肌肉和鳖甲 DNA的提取,采用 SDS蛋白酶裂解,酚氯仿抽提,详见文献的龟类肌肉和龟甲的 DNA的提取 [7,12]。

1.3 PCR扩增和测序:PCR反应条件同文献 [7]。序列采取本实验室的 ABI 310基因分析仪测定。BigDye DNA测序试剂盒购自 PE Applied Biosystems,按试剂盒手册操作。

1.4 序列分析和引物设计:用 ClustalW 程序对 DNA序列进行对位排列,用分子进化遗传分析软件 MEGA分析各物种间 DNA序列差异。根据中华鳖与其它鳖间的序列差异位点,设计能特异性扩增中华鳖的专一性位点特异性引物 IT-L02和 IT-H02 (序列正在申请专利),能扩增约 170 bp的基因片段。用于序列测定和阳性对照的引物为扩增线粒体 12S rRNA基因片段的通用引物 L1091和 H1478

1.5 PCR产物检测:PCR产物经 EB染色的琼脂糖凝胶电泳后,在图像分析系统 DGS-7600(美国 UVP, Inc.)上紫外扫描检测

2 结果

2.1 序列分析:用通用引物 L1091和 H1478对斑鳖样品 DNA扩增、测序,所得序列已送至 GenBank 数据库中,登录号为 AF321281,另外还测定了由江苏省药品检验所提供的鳖甲伪品 (JP2)序列。中华鳖和山瑞鳖的序列来自文献 [8],缘板鳖的序列来自 GenBank(登录号 U81337)。根据对位排列结果,共有 405 bp, 161个变异位点。种与种之间的序列差异为 6.92% ~ 32.63%。JP2与中华鳖 (Pi)之间的序列差异为 9.4%;与山瑞鳖 (Pt)间为 8.62%;与斑鳖

(Pm)间为 32.3%;与缘板鳖 (Lp)间为 16.38% (表 2)。

表 2 5种鳖科动物的 12S rRNA基因序列转换 颠换数 (上三角)和序列差异百分比 (下三角) (%)

OTU	1	2	3	4	5
1 H		19/8	64/55	29/22	23/13
2 Pt	6.92		67/57	35/16	22/11
3 Pm	31.48	32.63		58/49	64/56
4 Lp	14.41	14.41	31.10		34/24
5 JP2	9.40	8.62	32.35	16.38	

2.2 PCR鉴定

2.2.1 原动物的位点特异性 PCR鉴别:在进行原动物鉴别时,退火温度为 55°C, DNA模板用通用引物 L1091和 H1478同时对 DNA模板进行阳性对照扩增,三种鳖都能扩增约 400 bp的 DNA片段 (图 1-A),中华鳖 (Pi)能扩增约 170 bp的 DNA片段,而山瑞鳖 (Pt)和斑鳖 (Pm)无扩增产物 (图 1-B)。

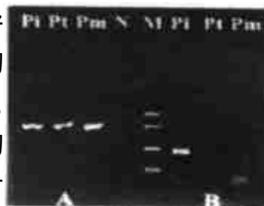


图 1 鳖甲原动物鉴别 PCR产物的琼脂糖凝胶电泳

2.2.2 鳖甲药材的位点特异性 PCR鉴别:

当退火温度为 55°C,用通用引物同时对模板进行阳性对照扩增时,所有 10个鳖甲样品都有明显扩增产物 (图 2)。在同样的退火温度条件下,用鉴别引物对鳖甲进行扩增时,1, 5- 10号都有明显的扩增产物,而 2~ 4号无扩增产物 (图 2)。



图 3 鳖甲的鉴别 PCR产物的琼脂糖凝胶电泳

3 讨论

位点特异性鉴别引物对 10块鳖甲的 PCR鉴定结果表明,由江苏省药品检验所提供的 4块鳖甲样品,其中 3块为伪品。这与测序结果是一致的 [6]。另外又对其中一块鳖甲伪品 (JP2)进一步测序和排序分析,并经 GenBank 的 BLAST分析,结果表明,该鳖甲即不是中华鳖和山瑞鳖,也不是斑鳖和缘板鳖,

提示鳖甲伪品还有其他来源。至于其原动物是哪一种鳖,还需进一步研究。而收集的 6块鳖甲皆为正品,由于野生鼋及斑鼋几乎绝灭,山瑞鳖数量亦不多^[9],因此这几种鳖掺伪的可能性不大。药材鳖甲伪品可能为一些从东南亚进口的鳖类。

在位点特异性鉴别引物设计时,我们选择了鳖科 4个属的 4种代表动物以及 JP2进行序列分析,基本上包括了鳖甲常见伪品的原动物种类。又经过 10件鳖甲样品鉴别试验,鉴别引物 IT-L02和 IT-H02能够特异性的鉴别出全部中华鳖样品。该鉴别引物的理论 T_m 值, IT-L02为 72°C , IT-H02为 68°C 。有了这对鳖甲鉴别引物后,当鳖甲样品需要鉴定时,只要从中抽提出 DNA,鉴别引物进行 PCR扩增,经琼脂糖凝胶检测,即可鉴别出真伪。

运用位点特异性引物鉴定中药材已在蛇类、龟甲等药材中取得成功^[10-12]。本研究设计的位点特异性鉴别引物可以配制成鉴定试剂盒,从而便于药检部门用该分子标记技术鉴定鳖甲。

参考文献:

- [1] 中国药典 [M]. 1995年版. 一部.
- [2] 张孟闻,宗榆,马积藩. 中国动物志 [M]. 爬行纲. 第一卷. 总论. 龟鳖目. 鳄形目. 北京: 科学出版社, 1998.
- [3] 李军德,涂海宁,赵丽云,等. 鳖甲的生物学研究 [J]. 中国中药杂志, 1996, 21(9): 518-522.
- [4] 周晓英. 鳖甲与鼋甲的鉴别 [J]. 中药材, 1998, 11(1): 32.
- [5] 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]. 药理学报, 1996, 31(6): 472-476.
- [6] 吴平,周开亚,徐珞珊,等. 用聚合酶链式反应产物直接测序技术鉴定中药材鳖甲 [J]. 中国药科大学学报, 1998, 29(1): 28-30.
- [7] 刘忠权,王义权,周开亚. 从高温高压蒸煮过的中华鳖甲和骨骼中提取及扩增 DNA [J]. 中草药, 2000, 31(5): 343-345.
- [8] 吴平,周开亚,杨群. 亚洲产淡水和陆生龟类 12S rRNA 基因片段的序列分析和系统发生研究 [J]. 动物学报, 1999, 45(3): 260-267.
- [9] 赵尔宓,马积藩,马长夫,等. 中国濒危动物红皮书——两栖类和爬行类 [M]. 北京: 科学出版社, 1998.
- [10] 王义权,周开亚,徐珞珊,等. 金钱白花蛇及其伪品的 *Cyt b* 基因片段序列分析及 PCR鉴别研究 [J]. 药理学报, 1998, 33(12): 941-947.
- [11] Wang Y Q, Zhou K Y, Xu L S, et al. Authentication of an animal crude drug, *Zaocys*, by diagnostic PCR [J]. Biol Pharm Bull, 2000, 23(5): 585-588.
- [12] 刘中权,王义权,周开亚,等. 中药材龟甲及原动物的高特异性 PCR鉴定研究 [J]. 药理学报, 1999, 34(12): 941-945.

红树莓植株再生系统的建立

肖娅萍,王喆之,张志勤,刘全宏

(陕西师范大学生命科学院,陕西 西安 710062)

摘要: 目的 建立红树莓的再生系统,短期内获得大量优质种苗。方法 利用红树莓的茎尖和茎段作为外植体,采用正交实验设计筛选培养基。结果 筛选出了红树莓愈伤组织、不定芽及不定根的最佳诱导培养基,在实验室建立了程序简单、重复性好的再生系统,实现了红树莓组培苗的快速繁殖。结论 用 MS培养基作为基本培养基,附加 BA 0.2 mg/L+ NAA 1.0~1.5 mg/L适用于愈伤组织的诱导;附加 BA 1 mg/L+ NAA 0.1~0.2 mg/L+ GA₃ 6~8 mg/L+ CH 300 mg/L适于芽的诱导;附加 BA 1 mg/L+ NAA 0.1 mg/L+ GA₃ 2 mg/L适于芽的繁殖;附加 IBA 0.1 mg/L+ NAA 0.5 mg/L适于根的诱导。

关键词: 红树莓;组织培养;植株再生系统;快速繁殖

中图分类号: R282.13 文献标识码: B 文章编号: 0253-2670(2001)08-0738-04

Establishment of plantlet regeneration system of *Rubus idaeus*

XIAO Ya-ping, WANG Zhe-zhi, ZHANG Zhi-qin, LIU Quan-hong

(College of Life Science, Shanxi Normal University, Xi'an Shanxi 710062, China)

Abstract Object To establish a plantlet regeneration system of *Rubus idaeus* L. for the purpose to obtain a large number of high quality seedling in a short time. **Methods** Stem apex and part of the stem were used as the explant and the optimal culture media and conditions were selected by orthogonal design. **Results** An optimum culture medium for the induction of callus, adventitious bud and root was obtained which can be carried out in the laboratory with comparative ease and good repeatability. **Conclusion** A basic medium + BA 0.2 mg/L+ NAA 1.0~1.5 mg/L was most suitable for the induction of callus; a

收稿日期: 2001-02-08

作者简介: 肖娅萍 (1956-),女,1981年 2月毕业于陕西师范大学生物系,副教授。主要从事植物学及植物组织培养方面的教学与科研工作。近年来先后承担国家自然科学基金 3项,省部级研究基金 1项。曾分别获得陕西省教委二等奖 2项,省政府三等奖 2项,发表学术论文 20余篇。