

蕲蛇药材及其市售混淆品的 Cyt b 基因序列与分析

宋文成¹, 宋社吾^{2*}, 刘道芳², 刘海兵¹, 宋礼华²

(1. 安徽大学生命科学学院, 安徽 合肥 230001; 2. 安徽省生物研究所, 安徽 合肥 230088)

摘要:目的 分析蕲蛇药材正品及其市场收集样品的 Cyt b 基因序列, 为蕲蛇药材分子鉴别提供依据。方法 利用 Cyt b 基因, 对蕲蛇药材及其市场收集样品进行了序列测定和分析。结果 蕲蛇药材存在着混杂现象; 蕲蛇药材正品与其市售混淆品的 Cyt b 基因序列有着显著差异, 该序列在蕲蛇种内差异率为 0%~0.91%, 与混淆品间的差异率为 18.57%~23.78%。结论 Cyt b 基因序列是一种鉴别蕲蛇药材与其混淆品较好的分子遗传标记。

关键词: 蕲蛇; Cyt b 基因; 分子鉴别

中图分类号: R282.7

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2006)12-1862-04

Sequence and analysis of Cyt b gene of *Agkistrodon* and its adulterants sold in market

SONG Wen-cheng¹, SONG She-wu², LIU Dao-fang², LIU Hai-bing¹, SONG Li-hua²

(1. College of Life Science, Anhui University, Hefei 230001, China; 2. Anhui Institute of Biology, Hefei 230088, China)

Abstract: Objective To differentiate the sequences of Cyt b gene *Agkistrodon* from its adulterants sold in the market in order to provide molecular evidence for identification of *Agkistrodon*. **Methods** Cyt b gene was used to sequence and analyze *Agkistrodon* and its adulterants sold in the market. **Results** There was a mixed phenomenon in *Agkistrodon* species. The differences of Cyt b gene sequence between *Agkistrodon* and its adulterants sold in the market are significant; the difference rates among the species of *Agkistrodon* are 0%—0.91%, the difference rates between *Agkistrodon* and its adulterants are 18.57%—23.78%. **Conclusion** The characteristics of Cyt b gene sequence can be used as a better molecular marker for authenticating *Agkistrodon* from its adulterants.

Key words: *Agkistrodon*; Cyt b gene; molecular identification

蕲蛇是一种贵重的中药材, 具有祛风、通络、止痉的功效。用于风湿痹痛、中风麻木拘挛、口眼喎斜、半身不遂、抽搐痉挛、破伤风症、麻风疥癣。本品为蝮科动物五步蛇 *Agkistrodon acutus* (Genther) 的干燥体^[1]。近年来, 由于动物类药材资源有限, 用量较大, 价格昂贵, 出现了用其他蛇冒充蕲蛇或在蕲蛇体内掺假的现象^[2,3], 特别是炮制的蕲蛇和蕲蛇肉等, 除去了头、鳞、骨, 更易混杂。

由于中药传统上对动物类药材品种进行鉴定, 是采用经典的形态分类学和解剖学特征, 有时结合理化分析。不仅费时费力, 且准确鉴定存在相当难度, 特别是经炮制和储藏的动物类药材, 其在外形态和组织构造等方面都有改变, 依据传统的鉴定方法更加难以准确鉴别。蕲蛇药材的鉴别, 目前主要也是根据其外部形态特征和骨骼、鳞片的形态特征^[4]。因此, 市售的蕲蛇药材也较为普遍地存在着伪品和

混淆品现象。随着分子生物学技术的迅猛发展, DNA 分子遗传标记方法被引入药材品种鉴别领域^[5], 其中 DNA 序列分析技术具有准确性高、重复性好等优点, 而被有效地用于中药材的真伪鉴定。本研究利用 Cyt b 基因, 对蕲蛇药材正品及其市场收集样品进行了序列测定与分析。

1 材料与方法

1.1 样品来源: 采用样本分别购自蕲蛇产地的药材市场和药房。其中 5 个为未经炮制蛇的药材, 另外 5 个为炮制过的蛇块。同时, 从安徽中医学院药学系选用经形态学准确鉴定确认的蕲蛇药材正品 1 条。药材经安徽中医学院药学系王德群教授鉴定。样品来源及编号见表 1。

1.2 总 DNA 的制备: 从经过前处理的样品中, 取蛇肌肉, 并刮去表层肌肉, 用双蒸水清洗 2~3 次, 加入研钵中用液氮研成粉末, 称取 1 mg。以下方法

收稿日期: 2006-02-06

基金项目: 安徽省自然科学基金资助项目 (03043101); 安徽省优秀青年科技基金资助项目 (04043056)

作者简介: 宋文成(1981—), 男, 安徽省明光市人, 安徽大学生命科学学院在读硕士研究生, 研究方向中药分子鉴别与新药开发。

Tel: (0551) 5317751 E-mail: wencheng_4318@sina.com

* 通讯作者 宋社吾 Tel: (0551) 5317751 E-mail: songshewu@126.com

表 1 试验所用的蛇类药材样品及分析结果

Table 1 Tested samples of snake crude drug and their analytic results

样品编号	原动物名	采集地点	状态
1	蕲蛇 <i>Deinagkistrodon acutus</i>	安徽亳州	正品
2	蕲蛇	浙江	未经炮制
3	蕲蛇	江西	未经炮制
4	蕲蛇	江苏	未经炮制
5	蕲蛇	四川	炮制
6	银环蛇 <i>Bungarus multicinctus multicinctus</i>	湖南	未经炮制
7	王锦蛇 <i>Elaphe carinata</i>	广西	炮制
8	眼镜蛇 <i>Naja naja</i>	安徽亳州	未经炮制
9	眼镜蛇	安徽合肥	炮制
10	银环蛇	广东	炮制
11	腹斑水蛇 <i>Enhydryis bocourti</i>	安徽合肥	炮制

参见文献报道^[6]。

1.3 Cyt *b* 基因片段的 PCR 扩增:PCR 扩增的引物为 Cyt *b* 基因通用引物 L14841, H15149', 由 Kocher 等设计的^[7]。其序列为: L14841 5' AAAAAGCTTCCATCCAACATCTCAGCATGATGAAA3' 和 H15149 5'AAACTGCAGCCCC-TCAGAATGATATTTGTCCTCA3'。扩增体积为 20 μL, 包括: 12 μL ddH₂O, 2 μL 10×buffer, 2 μL 25 mmol/L MgCl₂, 0.5 μL dNTPs (10 mmol/L each), 1 μL 10 μmol/L 上游和下游引物, 1 U *Taq* DNA 聚合酶以及 50~100 ng DNA 模板。扩增反应在 T1 Thermocycle PCR 仪上进行, 95 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 40 s, 55 °C 复性 1 min, 72 °C 延伸 2 min, 扩增 35 个循环; 最后 72 °C 延伸 5 min。取以上 PCR 产物 5 μL, 用 1% 的琼脂糖凝胶电泳, EB 染色, 紫外灯下观察结果。

1.4 序列测定与分析: 采用克隆测序, PCR 产物经过 Gel Extraction Mini Kit (上海华舜生物工程有限公司) 纯化后 (步骤参照说明书), 通过 pUCM-T Vector System (上海生工生物工程技术有限公司) 与 pUCM-T 载体连接, 转化感受态宿主菌 (JM109), 通过蓝白斑筛选和特异 PCR 鉴定重组质粒。交由上海生工生物工程技术有限公司进行测序, 每个样重复测 2 次, 每次测 3 个以上克隆。所测的 DNA 序列样本通过“BLAST”工具 (NCBI 站点) 进行序列检索和同源性比较, 再用 CLUSTALX、MEGA 等软件分析。

2 结果

2.1 Cyt *b* 基因片段在所收集样本中的 PCR 扩增: 本研究用 L14841 和 H15149 引物可以在所收集的所有样品中, 扩增出 380 bp 左右的目的片段, 见图 1。

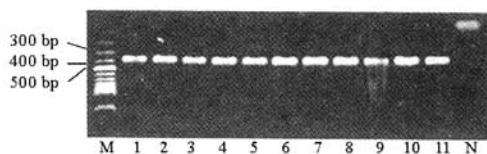


图 1 所收集样品中 Cyt *b* 基因片段 PCR 产物电泳图

Fig. 1 Electrophoretogram of PCR products of Cyt *b* gene fragments from collected samples of *Agkistrodon*

2.2 蕲蛇药材正品及其市场收集样品的 Cyt *b* 基因片段序列: 所测蕲蛇药材正品 1 的 Cyt *b* 基因片段长度, 不含引物为 307 个 bp; 其 (GC) 量为 42.99% (图 2)。同一样品克隆间测序没有发现序列差异。

在市场收集的样品中, 有 4 个样品的 Cyt *b* 基因序列与蕲蛇药材正品的序列高度同源。共仅有 3 个碱基对发生了替换: 样品 2 中第 278 位点 A 替换了 G; 样品 4 中第 78 位点 G 替换了 A 和样品 5 中第 50 位点 C 替换了 T, 而样品 3 的序列与蕲蛇药材正品的序列完全相同, 重复测样和克隆间也没有发现序列差异。可以认为, 这 4 个市场收集样品为蕲蛇正品 (图 2)。

将所测的蕲蛇正品的 Cyt *b* 基因序列与 GenBank 中注册的核苷酸序列进行同源性比较。所测的蕲蛇正品的 Cyt *b* 基因序列与数据库中的 3 段蕲蛇序列, 同源性均超过了 97% (AY223560, 99%; AF038883, 98% 和 AF171919, 97%)。Cyt *b* 基因序列在蕲蛇种内变异小, 碱基序列差异率为 0%~0.91%, 小于 1%。

其余 6 个市场收集样品的 Cyt *b* 基因序列出现了分化 (图 2)。通过 BLAST 的同源性分析, 样品 8 和 9 的序列与眼镜蛇 *Naja naja* (Stejneger) 的 Cyt *b* 基因序列高度同源 (DQ272477, 同源性百分率 96%; DQ272477, 同源性百分 99%; 样品 6 和 10 与银环蛇 *Bungarus multicinctus multicinctus* Blyth 的 Cyt *b* 基因序列高度同源 (DQ272478, 同源性百分率 100%; DQ272478, 同源性百分率 99%); 样品 7 的序列与王锦蛇的 Cyt *b* 基因序列高度同源 (AF036017, 同源性百分率 97%); 而样品 11 的序列则与腹斑水蛇 *Enhydryis bocourti* (Jan) 高度同源 (AF499265, 同源性百分率 92%)。在重复测样和克隆间也没有发现序列差异。

通过 Cyt *b* 基因的序列测定和分析, 在市场收集的 10 个样品中, 真正的蕲蛇药材正品有 4 个, 其

1	CTTTGGATCC ATATTATTTA CCTGCCTAAT AATCCAAATC ATAACCGGCT TCTTCTTGGC AATCACTAC ACAGCCAACA TCAACTTAGC CTTTTCATCC ATCATCCACA	[110]
2	[110]
3	[110]
4G.....	[110]
5C.....	[110]
6	T..C..C..T..GC.TA.A.....T..TT..C.A.....T.....A..T..T...C.A...C....T.....T..T..TG.....T..C....T.G.G....T.	[110]
7A.....C..C.A.....T..GC.TC.A...C.....A.....C.A.....T..TC.....A..TG.A..T.	[110]
8C..T...C..C.AG..T.....C.A.....T.....A.....C.A.....T.....C.G...C....A.G.A..T....	[110]
9	T.....C..T...C..C.AG.....C.A.....T.....A.....C.A.....T.....C....C....G.G..T....	[110]
10	T..G..C..T..GC.TA.A.....T..TT..C.A.....T.....A.....T...C.A...C....T.....T..T..TG.....T..C....T.G.G....T.	[110]
11C.....C.TC.AG.....TT..GC.CC.A.....C...A.G..T...C.A...C.CC....T.....TG.....A.....A.G.A..T....	[110]
1	TCTCCCGAGA CGTGCCATAC GGCTGAATCA TACAAAATAC ACACGCCATC GCGCATCCC TATTCTTTAT CTGTATCTAT ATOCATATTG CACGAGGACT CTACTACGGC	[220]
2	[220]
3	[220]
4	[220]
5	[220]
6	TATA..T...A..C..T..A...C.....T..T..A..T..A.....A.....T..C..T...A...T..T	[220]
7	..ATA.....T..T...G...CA.....CTT...T..A..T.....TA.....C....C..T..C....C.....A	[220]
8	..A.A..G.....T...G.....CCT..A.A..A.....C..T..C..C....C.....T..T	[220]
9	..A.G..G.....T...G.....CCT..A.A..A.....C....C.....C.....C.....T..T	[220]
10	TATA..T...A..C..T..A...C.....T..T..A..T..A.....A.....T..C..T...A...T..T	[220]
11	C.ATA.....C.....C.....CT..T...A...T...A...T..C....C....C.....A..T.....	[220]
1	TCGTACTTGA ACAAGAAGT TTGACTATCA GGCACCACCC TTITTAATTAT CCTAATAGCC ACCGCCCTTCT TTGGCTATGT CCTACCA	[307]
2A.....	[307]
3	[307]
4	[307]
5	[307]
6	TA..C.C..T.....C..T.....A..G.T..A.....C.....A..A.T.....C...T...[307]	
7	..C..C.A..T..A.C..A.....T..A...TAT..A.....T..T...A..A.....A.....C...[307]	
8	TA..C.A..T.....A..AG...CC.GG...T...A..A.....C..A..C...C...[307]	
9	TA..C.A..T.....A..AG...CC.GG...T...A..A.....C..A..C...C...[307]	
10	TA..C.C..T.....C..T.....A..G.T..A.....C.....A..A.T.....C...T...[307]	
11	..A..C.A.....C..T..T...G..TT..TA..A...C.....A..A.....[307]	

图 2 蕲蛇药材正品及其混淆品的 Cyt b 基因片段序列

Fig. 2 Sequence alignment of Cyt b gene fragment of *Aghistrodon* and its adulterants

余分别为混淆品,其中 2 个眼镜蛇,2 个银环蛇,1 个王锦蛇和 1 个腹斑水蛇(表 1)。

2.3 蕲蛇与其混淆品的 Cyt b 基因片段的序列分

析:混淆品中,2 个银环蛇和王锦蛇的 GC 量分别为 35.18%、35.51%、37.78%,与蕲蛇药材正品的 GC 含量有显著差异;2 个眼镜蛇和腹斑水蛇的 GC 量

分别为 42.67%、43.32%、41.37%，与蕲蛇药材正品的 GC 量无明显差异。

蕲蛇药材正品与王锦蛇间有 63~64 个碱基差异，差异率为 20.52%~20.85%；与腹斑水蛇间有 64~65 个碱基差异，差异率为 20.85%~21.17%。

表 2 蕲蛇药材正品及其混淆品 Cyt b 基因序列的差异率 (下表:碱基差异率;上表:碱基差异数)

Table 2 Different rate of Cyt b gene sequence among *Agkistrodon* and its adulterants (down: different rate of base sequence, up: different number of base sequence)

样品号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1		1	0	1	1	72	63	59	57	71	64
2	0.0033		1	2	2	73	64	60	58	72	65
3	0.0000	0.0033		1	1	72	63	59	57	71	64
4	0.0033	0.0065	0.0033		2	73	64	60	58	72	65
5	0.0033	0.0065	0.0033	0.0065		73	64	60	58	72	65
6	0.2345	0.2378	0.2345	0.2378	0.2378		71	59	59	1	61
7	0.2052	0.2085	0.2052	0.2085	0.2085	0.2313		59	58	71	62
8	0.1922	0.1954	0.1922	0.1954	0.1954	0.1922	0.1922		13	59	69
9	0.1857	0.1889	0.1857	0.1889	0.1889	0.1922	0.1889	0.0423		59	67
10	0.2313	0.2345	0.2313	0.2345	0.2345	0.0033	0.2313	0.1922	0.1922		61
11	0.2085	0.2117	0.2085	0.2117	0.2117	0.1987	0.2020	0.2248	0.2182	0.1987	

蕲蛇药材正品与其混淆品间, Cyt b 基因片段碱基序列的差异率为 18.57%~23.78%。因此, 该基因序列在蕲蛇种内的差异远远小于蕲蛇与混淆品的种间差异。

3 讨论

本研究所收集的蕲蛇药材均购买于蕲蛇产地的药材市场和药房, 但通过 Cyt b 基因的序列测定和分析, 发现混杂现象较为严重。来自于药材市场和药房的 10 个样品中, 蕲蛇正品的比例不到一半。研究中还发现主要的混杂方式有: 直接将其他蛇类混杂为蕲蛇, 如样品 6 将眼镜蛇混杂为蕲蛇; 在蕲蛇药材内加入其他物质以增加体重。如样品 4, 虽然为蕲蛇正品, 但其体内两侧各有一块游离的肌肉。通过对该肌肉的 Cyt b 基因序列测定和分析, 其序列与小家鼠 (*Mus musculus* Linne') Cyt b 基因序列的同源性达 99% (V00711, X57780), 两次重复结果一致。另外, 通过加工制成蕲蛇块或是将蕲蛇头、尾和皮剥离, 粘贴在其他蛇体上来作为蕲蛇出售等, 也是常见的混杂方式。

Cyt b 基因是生物体内编码 Cyt b 蛋白质的基因, 在线粒体基因组中, 进化速度适中, 在同种内个体间保守性高, 是动物类药材的理想分子遗传标记

2 个眼镜蛇样品之间有 13 个碱基差异, 它们与蕲蛇药材正品的差异率为 18.57%~19.64%; 而 2 个银环蛇样品之间仅有 1 个碱基差异, 它们与蕲蛇药材正品差异率为 23.13%~23.78%, 以上差异包括了碱基的置换和颠换。见表 2。

物之一, 已被有效地运用于多种动物类药材的分子遗传标记鉴别^[8]。本研究中, 蕲蛇药材正品的种内个体间 Cyt b 基因序列差异率为 0%~0.91%, 而与常见的混伪品之间的序列差异率为 18.57%~23.78%。因此, 提示该基因片段可应用于蕲蛇药材的分子鉴定。

References:

- [1] Ch P (中国药典) [S]. Vol 1. 2005.
- [2] Leng A J. Identification of *Agkistrodon acutus* its adulterants [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res* (时珍国医国药), 2003, 14(3): 154.
- [3] Wang Z. Experience identification of *Agkistrodon acutus* and its adulterants [J]. *Beijing J Tradit Chin Med* (北京中医), 2004, 23(4): 234-235.
- [4] Lai F G. Identification of *Agkistrodon acutus* and its adulterants [J]. *J Chin Med Mater* (中药材), 1988, 11: 31.
- [5] Xiao X H, Liu F Q, Yuan H L, et al. Advances in study on DNA molecular Markers of Chinese medicinal materials [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2000, 31(8): 561-564.
- [6] Shao P Z, Cao H, Wang J, et al. Authentication of Chinese Medicinal Materials (中药分子鉴定) [M]. Shanghai: Fudan University Press, 2004.
- [7] Kocher T D, Thomas W K, Meyer A, et al. Dynamics of mitochondrial evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, 86: 6196.
- [8] Liu X H, Wang Y Q, Zhou K Y, et al. Study on allele-specific diagnostic PCR of the traditional Chinese medicine the deers [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2001, 36(8): 631-635.