

利用 DNA 条形码检验中药制剂中的羚羊角药材

张龙霏¹, 陈绍民², 田景振¹, 张永清^{1*}

1. 山东中医药大学, 山东 济南 250355

2. 山东省食品药品监督管理局, 山东 济南 250011

摘要: **目的** 研究以线粒体细胞色素 C 氧化酶亚基 I (COI) 基因作为 DNA 条形码检验中药制剂中羚羊角的可行性。**方法** 以不同厂家生产的 8 种含羚羊角中药制剂为材料, 经充分研磨后, 采用 DNA 提取试剂盒提取样品中 DNA, 以引物 LCO1490 和 HCO2198 或特异性引物 0703 扩增线粒体 COI 基因片段序列, PCR 产物直接双向测序, 将测序结果在 GenBank 中进行 BLAST 比对, 并以 DNAMAN 和 MEGA5.2 软件构建同源树和 NJ 树, 以赛加羚羊 (gb|JN632700.1) 和羚羊角标准药材序列为对照, 判定制剂中羚羊角的真实性, 并以 Kimura-2-parameter 模型计算种内、种间遗传距离。**结果** 8 种中药制剂中羚羊角的 COI 基因序列长度均为 658 bp, 在同源树和 NJ 树中可与赛加羚羊和羚羊角标准药材聚成一支, 并与 outgroup 完全分开。种内遗传距离为 0~0.064, 平均遗传距离为 0.020, 种间遗传距离为 0.167~0.195。**结论** 以线粒体 COI 基因作为 DNA 条形码检验中药制剂中羚羊角方法是可行的, 但因羚羊其他器官也含有相同基因, 为保证检验结果的准确性, 还需配合使用其他检验方法。

关键词: 羚羊角; 细胞色素 C 氧化酶亚基 I; DNA 条形码; 中药制剂; PCR 扩增

中图分类号: R282.12 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2014)23-3467-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.23.021

Identification of *Saigae Tataricae* Cornu in Chinese materia medica preparation using DNA barcoding

ZHANG Long-fei¹, CHEN Shao-min², TIAN Jing-zhen¹, ZHANG Yong-qing¹

1. Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China

2. Shandong Food and Drug Administration, Jinan 250011, China

Abstract: Objective To discuss the feasibility of using partial sequence of mitochondrial cytochrome C oxidase subunit I (COI) gene as DNA barcoding to identify *Saigae Tataricae* Cornu (STC) in Chinese materia medica (CMM) preparation. **Methods** The DNA barcoding identification was constructed in STC samples from eight different manufactories. The genome DNA was extracted by DNA extraction kit from adequately ground samples. The COI nucleotide sequences were PCR amplified with the Primers LCO1490 and HCO2198 or specified primer 0703 and sequenced bi-directionally. The BLAST comparison was made in GeneBank, and the phylogenetic trees were constructed with the homology tree (DNAMAN) and Neighbor-Joining (NJ, MEGA 5.2) method. *Saiga tatarica* (gb|JN632700.1) and STC were selected as reference medicinal materials and the genetic distance was calculated using Kimura-2-parameter. **Results** The lengths of partial mitochondrial COI gene collected from STC in eight samples of CMM preparation were about 658 bp. The phylogenetic tree showed that the samples of CMM preparation and reference substance assembled distinctly, and were completely separated from the outgroup. The intraspecific genetic distances of these samples ranged in 0—0.064 with an average of 0.020, and the interspecific genetic distances ranged in 0.167—0.195. **Conclusion** The mitochondrial COI gene is a valid DNA barcoding gene for STC identification in CMM preparation. But other organs in antelope also contain the same gene. In order to ensure the accuracy of the results, other text methods also need to be used cooperatively.

Key words: *Saigae Tataricae* Cornu; cytochrome C oxidase subunit I; DNA barcoding; Chinese material medica; preparation; PCR amplification

收稿日期: 2014-04-09

基金项目: 山东省自主创新专项 (2013CX20401)

作者简介: 张龙霏 (1988—), 女, 中药学硕士, 讲师, 从事中药质量分析研究。E-mail: zlfelf@126.com

*通信作者 张永清 (1962—), 男, 山东平邑人, 理学博士, 教授, 博士生导师, 从事中药资源及其质量控制研究。E-mail: zyzq622003@126.com

羚羊角 *Saigae Tataricae Cornu* 为牛科动物赛加羚羊 *Saiga tatarica* Linnaeus 的角,属于名贵中药材,性寒,味咸,归肝、心经,可平肝熄风、清肝明目、散血解毒,主治肝风内动、惊痫抽搐、妊娠子痫、高热痉厥、癫痫发狂、头痛眩晕、目赤翳障、温毒发斑、痈肿疮毒等症^[1],其临床疗效卓著,在小儿高热等危重病症治疗中发挥着重要作用。由于野生资源逐年减少,赛加羚羊已被世界自然保护联盟(IUCN)列入了世界濒危动物红色名录,且标注为极濒危类群^[2]。在资源减少、货源短缺、市场价格居高不下的情况下,加强中药制剂中羚羊角药材的检测尤为重要。目前,《中国药典》2010年版检测中药制剂是否含有羚羊角的方法,一是显微观察,二是薄层色谱,二者操作复杂,且结果受仪器和操作者的影响较大,因此寻找一种简便快捷、准确性高的检测方法非常有必要。DNA条形码(DNA barcoding)作为一种现代生物技术,是以DNA为基础的系統分类新方法之一,能够弥补传统形态学鉴定的某些局限,有效实现少量甚至微量样品中物种的鉴定^[3-4],并迅速在动植物甚至微生物领域发挥了卓越作用^[5-10],引起了国内外极大的关注和愈发深入的研究。目前国内外尚无以DNA条形码方法检视中药制剂中羚羊角的相关报道,本实验将该技术应用於中药制剂中羚羊角的检测,旨在为提高中药制剂质量控制技术水平提供新的思路与方法。

1 仪器设备、试剂与材料

1.1 仪器设备

DNA样品粉碎研磨仪(Retsch, MM400, 德国),水浴锅(上海申光, 双列四孔, 中国),梯度PCR扩增仪(Eppendorf, Mastercycler gradient, 德国),离心机(Thermo, LEGEND MICRO 21, 美国),移液器(Thermo, Scientific Finn timer F1, 美国),电泳仪(BIO-RAD, Power pac 300, 美国),紫外凝胶成像仪(Syngene, 英国),ABI 3730XL测序仪(Applied Biosystems Co., 美国)。

1.2 试剂

血液/细胞/组织基因组DNA提取试剂盒(Tian-gen Biotech Co., 中国), 2×Taq PCR Master Mix(Tian-gen Biotech Co., 中国), 100 bp DNA Ladder Marker(Tian-gen Biotech Co., 中国), 溴化乙锭(EB, ethidium bromide)。

1.3 材料

羚羊角标准药材, 编号LYBZ01YP(简称YP),

中国食品药品检定研究院, 批号1064-0301; 羚羊角粉, 编号LYDP01LA(简称LA), 山东嘉泰中药饮片公司生产, 批号121102, 经山东中医药大学周凤琴教授鉴定为羚羊角 *Saigae Tataricae Cornu* 粉末; 羚羊清肺散, 编号LYZJ01AA(简称AA), 哈尔滨儿童制药有限公司生产, 批号110201; 复方西羚解毒片, 编号LYZJ01AB(简称AB), 山东宏济堂制药集团有限公司生产, 批号121010; 羚羊感冒片, 编号LYZJ01AC(简称AC), 北京同仁堂科技发展股份有限公司生产, 批号1120665; 奇特羚羊清肺丸, 编号LYZJ01AD(简称AD), 赤峰天奇制药有限公司生产, 批号20120408; 羚羊角颗粒, 编号LYZJ01AE(简称AE), 吉林省健今药业股份有限公司生产, 批号20120805; 金羚感冒片, 编号LYZJ01AF(简称AF), 山东润华药业有限公司生产, 批号121008; 小儿七珍丸, 编号LYZJ01AG(简称AG), 山西双人药业有限责任公司生产, 批号121104。以上除羚羊角标准药材购自山东省食品药品检验所外, 其他样品均购自济南漱玉平民大药房有限公司。

2 方法

2.1 DNA提取

各样品先以研钵研碎(糖衣片须先去糖衣),再以DNA样品粉碎研磨仪研磨2 min(30次/s),必要时可重复研磨2 min。研磨后,称取一定量,羚羊角对照品与羚羊角粉20~25 mg, 其他制剂30~35 mg, 每样品重复5次。采用DNA提取试剂盒进行提取,在每份称量好的样品中加缓冲液200 μL,振荡至彻底悬浮,然后加入蛋白酶K(Proteinase K)20 μL, 56℃水浴8 h或过夜(水浴过程中颠倒离心管数次以混匀样品); 简短离心后加缓冲液200 μL, 70℃水浴10 min; 加无水乙醇200 μL, 充分振荡15 s; 将所得溶液及絮状沉淀完全转移至吸附柱中, 12 000 r/min离心30 s; 加缓冲液500 μL, 12 000 r/min离心30 s, 弃废液; 加入漂洗液700 μL, 12 000 r/min离心30 s, 弃废液; 再次加入漂洗液700 μL, 12 000 r/min离心30 s, 弃废液; 12 000 r/min空离30 s, 弃废液, 室温放置15 min; 将吸附柱和所得产物转移至干净离心管中, 于吸附柱上悬空滴加洗脱缓冲液70 μL, 室温放置2~5 min, 12 000 r/min离心2 min; 收集离心得到的试液, 并将收集到的试液悬空滴加至吸附柱, 室温放置2~5 min, 12 000 r/min离心2 min, 以提高DNA得率。最后离心得

到的试液即为所需的样品 DNA, 弃置吸附柱, 编号后于-20 ℃冻存。

2.2 PCR 扩增

参考陈士林^[11]方法。采用 25 μL PCR 反应体系: 样品 DNA 模板 2 μL, 2×Taq PCR Master Mix 12.5 μL, 正反向引物 (COI: LCO1490、HCO2198; 设计引物: 0703-01、0703-02) 分别 1 μL, ddH₂O 8.5 μL, 以封口膜封盖体系后进行 PCR 扩增。PCR 反应条件为 COI 体系: 94 ℃预变性 5 min, 94 ℃变性 1 min, 45 ℃退火 1.5 min, 72 ℃延伸 1.5 min, 5 个循环; 94 ℃变性 1 min, 50 ℃退火 1.5 min, 72 ℃延伸 1 min, 35 个循环; 72 ℃再延伸 5 min, 4 ℃保存。设计引物体系: 94 ℃预变性 5 min, 94 ℃变性 1 min, 53 ℃退火 1.5 min, 72 ℃延伸 1.5 min, 40 个循环, 72 ℃延伸 5 min, 4 ℃保存。所用引物均由北京六合华大基因合成, 见表 1。

表 1 引物序列信息

Table 1 Primer sequence information

引物名称	序列信息
正向 LCO1490	5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3'
反向 HCO2198	5'-TAAACTTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3'
正向 0703-01	5'-AATCAAACCCCTGTTCTTAG-3'
反向 0703-02	5'-TGATGTAAAGTAGGCTCGTG-3'

其中, COI 引物为动物 DNA 提取通用引物, 0703 为混合动物样品条件下专属性较强的特异性引物, 以 Primer5.0 在赛加羚羊线粒体全基因组 (gb|JN632700.1) 中寻找 COI 序列设计并经验证。必要时可将 PCR 产物作为 DNA 模板重复进行 PCR 扩增程序, 以提高样品浓度。PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖 EB 凝胶电泳检测, 其长度用 100 bp DNA Ladder Marker 确定, 有单一明亮条带的样品送北京六合华大基因科技股份有限公司青岛测序部进行纯化和双向测序。

2.3 序列比对

测序信息返回后, 采用 CodonCode Aligner V2.06 对所得峰图进行处理, 将同一样品的 5 个序列数据拼接并校正, 去除引物及低质量区域, 每个样品均获得长度为 658 bp 的单一序列, 且各序列均已上传至美国国立生物技术信息中心 (简称 NCBI), GenBank 登录号为 KF735178~KF735210。

在采用 DNA 条形码鉴定物种时, 一般采用相似性搜索法 BLAST-Based Method、距离法

Distance-Based Method 及建树法 Tree-Based Method^[12-13], 此外还有学者提出了 PCI (probability of correct identification)^[14]等方法。本实验采用了相似性搜索法和建树法 2 种方法。

3 结果与分析

将各样品序列与赛加羚羊基因组的 BLAST 进行比对, 结果显示, 羚羊角标准药材及 8 个中药制剂样品 DNA 提取物与赛加羚羊线粒体全基因组 (gb|JN632700.1) 高度相似, 相似度均达到 98% 以上, 说明上述中药制剂中均含有赛加羚羊 DNA 组分, 提示所用羚羊角为正品羚羊角。只有 AD 的相似度较低, 仅为 96%, 因此不能排除后者有采用赛加羚羊近缘种的角作为原料的可能。为深入研究样品 AD 所用羚羊角与赛加羚羊之间的亲缘关系, 本课题组进行了进一步的数据处理和分析。

采用 DNAMAN 对上述样品序列进行多序列比对并建树 (同源树), 因赛加羚羊是高鼻羚羊属中的唯一种, 因而选择以同科近缘种灰小羚羊 *Sylvicapra grimmia* (Huiling, gb|HQ644119.1) 作为 outgroup 进行对照, 结果见图 1。

图 1 结果显示, 各样品序列和 GenBank 中下载的赛加羚羊序列能与 outgroup 完全分开并聚类成为一支, 且支持率均 ≥70%, 因此基本可以认定各样品均含有赛加羚羊 DNA 组分。各样品序列存在微小差异, 可能与赛加羚羊因生活环境不同而导致的基因突变有关, 其中 AD 与其他样品在进化距离上存在一定差异的原因尚需深入探究。

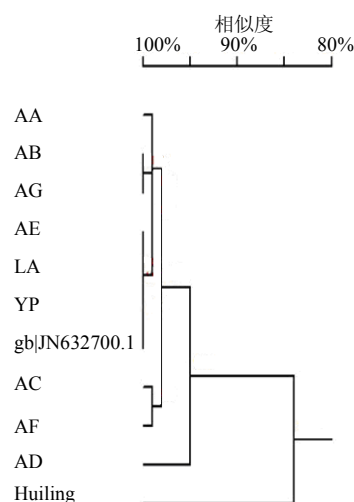


图 1 样品序列同源树图

Fig. 1 Phylogenetic tree of sample sequence

另通过 MEGA5.2 建 NJ 树 (Neighbor-Joining Tree, bootstrap 1 000 次重复) 得到相同结果, 并能显示更高精度的图像, 可以观察到更全面的各样品序列差异程度, 见图 2。

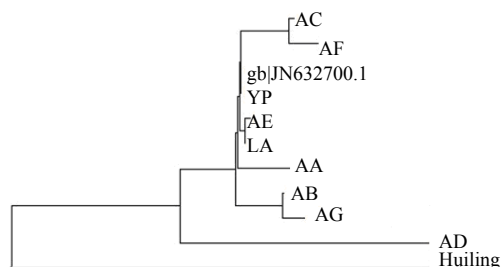


图 2 样品序列 NJ 树

Fig. 2 NJ tree of sample sequence

在 MEGA5.2 中, 采用 Kimura-2-parameter 模型计算各样品序列间的遗传距离发现, 各样品序列中种内遗传距离为 0~0.064, 平均遗传距离为 0.020, 种间遗传距离为 0.167~0.195。可用于物种检验的理想 DNA 条形码应当具有足够小的种内变异, 同时具有明显的种间变异, 见表 2。结果显示, 各序列数据中种间最小变异明显大于种内最大变异, 因此, 基于 COI 序列的 Kimura-2-parameter 模型可以用来检验中药制剂中的羚羊角。

4 讨论

羚羊角在中药制剂中多以原药材粉碎配方入药, 除药典中规定的显微鉴别和薄层鉴别是其主要检测方法外^[15-19], 还有蛋白电泳法^[20]。显微鉴别主

表 2 序列距离矩阵分析表

Table 2 Distance-matrix analysis of each sequence

编号	AA	AB	AC	AD	AE	AF	AG	LA	YP	Huiling	JN632700.1
AA	0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
AB	0.020	0	—	—	—	—	—	—	—	—	—
AC	0.022	0.020	0	—	—	—	—	—	—	—	—
AD	0.059	0.052	0.057	0	—	—	—	—	—	—	—
AE	0.014	0.012	0.011	0.049	0	—	—	—	—	—	—
AF	0.028	0.027	0.008	0.064	0.019	0	—	—	—	—	—
AG	0.020	0.000	0.020	0.052	0.012	0.027	0	—	—	—	—
LA	0.012	0.011	0.009	0.047	0.002	0.017	0.011	0	—	—	—
YP	0.012	0.011	0.009	0.047	0.002	0.017	0.011	0.000	0	—	—
Huiling	0.179	0.179	0.175	0.195	0.169	0.185	0.179	0.167	0.167	0	—
JN632700.1	0.012	0.011	0.009	0.047	0.002	0.017	0.011	0.000	0.000	0.167	0

要是观察是否具有稍有光泽的不规则碎块, 并均匀分布有裂缝状或长圆形空隙等; 薄层鉴别是取样品和羚羊角对照药材, 加石油醚加热回流 1.5 h, 滤过并挥去石油醚后加乙醇加热回流, 滤过并蒸干, 残渣以乙醇 1 mL 溶解, 作为供试品溶液和对照药材溶液, 以薄层色谱检验, 于同一硅胶 G 薄层板上以正丁醇-冰醋酸-水 (3:1:1) 为展开剂, 喷以茚三酮试液, 加热至斑点清晰后, 观察两者是否在相应位置显示相同颜色^[1]; 蛋白电泳中正品羚羊角共有 6 条谱带, 与伪品有一定区别。

以上几种方法均存在明显缺点, 显微鉴别不仅对检验人员要求较高, 而且羚羊角的显微特征均数远小于普通中药材, 例如只占黄芩显微特征均数的一半不到^[21]; 薄层鉴别难以与其他动物角类相区别, 且重复性较差。由于对中药制剂中的羚羊角至

今没有较为完善的检验方法, 从而存在着检测漏洞。DNA 条形码技术用于物种鉴定得到了国际认可和肯定, 但主要集中于植物方面^[22-23], 动物类研究较少, 尤其以 DNA 条形码技术检验中药制剂中的动物类药材目前尚未见报道。本研究证明, 以 DNA 条形码技术检验中药制剂中的动物类药材是可行的, 且需样量少、简单快速、重复性和稳定性高, 且可通过现代技术平台实现与国际信息的共享等优点。但是, 该技术对以整体动物入药的中药材是适用的, 而对以某一器官入药的动物来讲, 若以其他器官代用则容易导致检验错误, 因此在具体工作中仍然需要配合使用其他方法, 才能确保检验结果的准确性。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [2] Navinder J, Singh E J. Milner-Gulland. Monitoring

- ungulates in Central Asia: current constraints and future potential [J]. *Fauna Flora Int*, 2011, 45(1): 38-49.
- [3] Hebe P D N, Stoeckle M, Zemlak T S, *et al*. Identification of birds through DNA barcode [J]. *PLoS Biol*, 2004, 2(10): 1657-1663.
- [4] Kress W J, Wurdack K J, Zimmer E A, *et al*. Use of DNA barcodes to identify flowering plants [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 2: 8369-8374.
- [5] Paul D N H, Sujeevan R, Jeremy R. deWaard. Barcoding animal life: cytochrome oxidase subunit divergences among closely related species [J]. *Proc R Soc Lond B*, 2003, 270: 96-99.
- [6] Hebert P D N, Cywinska A, Ball S L, *et al*. Bio-logical identifications through DNA barcodes [J]. *Proc R Soc London Biol Sci*, 2003a, 270: 313-321.
- [7] Yancy H F, Zemlak T S, Mason J A, *et al*. Potential use of DNA barcodes in regulatory science: Applications of the regulatory fish encyclopedia [J]. *J Food Prot*, 2008, 71: 210-217.
- [8] Chodon S, Damon P L, Dennis W, *et al*. DNA Barcoding in the Cycadales: testing the potential of proposed barcoding markers for species identification of Cycads [J]. *PLoS One*, 2007, 2(11): 1-9.
- [9] 夏至, 冯翠元, 高致明, 等. 黄芩及其同属近缘种的DNA条形码鉴定研究 [J]. *中草药*, 2014, 45(1): 107-112.
- [10] 石召华, 陈士林, 姚辉, 等. 娑罗子基原物种的DNA条形码鉴定研究 [J]. *中草药*, 2013, 44(18): 2593-2599.
- [11] 陈士林. 中药DNA条形码分子鉴定 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2012.
- [12] 陈士林, 宋经元, 姚辉, 等. 药用植物DNA条形码鉴定策略及关键技术分析 [J]. *中国天然药物*, 2009, 7(5): 322-327.
- [13] 陈士林, 庞晓慧, 姚辉, 等. 中药DNA条形码鉴定体系及研究方向 [J]. *世界科学技术—中医药现代化*, 2011, 13(5): 747-754.
- [14] Erickson D L, Spouge J, Resch A, *et al*. DNA barcoding in land plants: developing standards to quantify and maximize success [J]. *Taxon*, 2008, 57(4): 1304-1316.
- [15] 李生华. 蒙药鲁曼12散的鉴别研究 [J]. *中国民族医药杂志*, 2012, 9(9): 36-37.
- [16] 金卓, 丁晴. 羚羊感冒胶囊中掺杂水牛角粉的鉴别 [J]. *安徽医药*, 2007, 11(6): 521-522.
- [17] 朴华英, 刘继平, 孙朗. 羚羊清肺胶囊的质量标准研究 [J]. *中成药*, 2001, 23(8): 566-569.
- [18] 朱山寅. 息热静口服液的制备及质量控制 [J]. *中国药师*, 2002, 5(10): 600-601.
- [19] 梅娇, 刘兴文. 脑血灵口服液制备方法改进及薄层色谱鉴别 [J]. *中国药业*, 2011, 20(24): 57-58.
- [20] 赵华英, 许欣荣, 陈永林, 等. 羚羊角及其伪品的蛋白电泳鉴别 [J]. *中国中药杂志*, 1994, 19(9): 524-525.
- [21] 洪霞, 王利华. 中药显微定量的方法研究 [J]. *黑龙江医药科学*, 2002, 25(3): 40.
- [22] Chen S L, Yao H, Han J P, *et al*. Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species [J]. *PLoS One*, 2010, 5(1): 1-8.
- [23] Li D Z, Liu J Q, Chen Z D, *et al*. Plant DNA barcoding in China [J]. *J System Evol*, 2011, 49(3): 165-168.