

金钱白花蛇快速 PCR 鉴别方法的建立

赵静雪^{1,2}, 崔光红^{2*}, 辛敏通³, 唐仕欢²

(1. 首都医科大学中医药学院, 北京 100069; 2. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700;
3. 北京市药品检验所, 北京 100035)

摘要: 本文旨在建立一种快速、高效的鉴别金钱白花蛇药材及其伪品的 PCR 方法。通过对金钱白花蛇及其伪品的 Cyt *b* 序列进行序列比对分析, 设计 1 对能准确鉴别正品金钱白花蛇和其伪品的引物。采用商品化基因组 DNA 提取试剂盒提取基因组总 DNA, 采用两步循环 PCR 程序进行 PCR 鉴别, 并对影响 PCR 结果的主要因素(退火温度、Taq 酶用量、循环次数等)进行方法学考察和优化, 对不同公司 PCR 仪、Taq 酶产品进行普适性试验。在方法学考察的基础上, 以试剂盒提取药材正品 13 批、伪品 20 批, 反应参数: 95 °C 预变性 5 min, 循环反应 30 次 (95 °C 30 s, 55 °C 45 s), 72 °C 延伸 5 min 的条件可使所有受检样品得到准确鉴定, 鉴别过程可在 4 h 内完成, 适合于金钱白花蛇 PCR 鉴别方法的推广应用。

关键词: 金钱白花蛇; PCR; 鉴别

中图分类号: R931

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2010) 10-1327-06

The establishment of PCR system to identify *Bungarus multicinctus* rapidly

ZHAO Jing-xue^{1,2}, CUI Guang-hong^{2*}, XIN Min-tong³, TANG Shi-huan²

(1. College of Traditional Chinese Medicine, Capital Medical University, Beijing 100069, China;
2. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medicinal Sciences, Beijing 100700, China;
3. Beijing Institute for Drug Control, Beijing 100035, China)

Abstract: The purpose of the present study is to establish a rapid and effective PCR method for the identification of *B. multicinctus*. Based on sequence alignment of *B. multicinctus* and its adulterants, we found that Cyt *b* gene is a good molecular genetic marker for the authentication of *B. multicinctus*. On the basis of the sequence data, a pair of highly specialized primers was designed. The templates were extracted by the DNA purification system. Key factors such as annealing temperature, concentration of Taq enzyme and cycle numbers were analyzed and optimized. The modified PCR program consisted of an initial denaturation step at 95 °C for 5 min, followed by 30 cycles of 95 °C for 30 s and 55 °C for 45 s and a final extension at 72 °C for 5 min. Thirteen samples of *B. multicinctus* were identified accurately from their 20 adulterants in 4 hours. The results indicated it is a highly accurate, rapid and applicable method for the authentication of *B. multicinctus*.

Key words: *B. multicinctus*; PCR; identification

收稿日期: 2010-05-04.

基金项目: 国家重点基础研究发展计划 (2006CB504700); 《中国药典》2010 版一部标准研究项目 (YD-195); 中国中医科学院自主选题项目 (02085).

*通讯作者 Tel: 86-10-64014411-2956, Fax: 86-10-84027175, E-mail: guanghongcui@163.com

金钱白花蛇为眼镜蛇科动物银环蛇 (*Bungarus multicinctus*) 的幼蛇干燥体。气微腥, 味微咸。具有祛风、通络、止痉的功效。用于风湿顽痹、麻木拘挛、中风口眼歪斜、半身不遂、抽搐痉挛、破伤风、麻风、疥癣等^[1]。

随着分子生物学的发展, 利用分子标记技术鉴别中药材已广泛应用。已建立的 PCR 鉴别金钱白花蛇的方法^[2, 3], 从模板的提取、PCR 反应到最终凝胶成像分析, 单个样品的鉴定步骤繁琐, 耗时长。从鉴别方式上讲, 主要为序列比对, 难于推广。笔者采用高特异 PCR 技术, 利用金钱白花蛇 Cyt *b* 区域特定序列设计引物, 通过对模板提取过程、PCR 反应条件、试验稳定性及一系列方法学的考察, 在保证准确鉴定的基础上, 建立了一种更加快速、简便、有效的鉴别金钱白花蛇的新方法。

仪器与材料

仪器 PCR 仪 (① 英国 Techne, 型号: TC-512; ② 德国 Eppendorf 公司, 型号: 5332; ③ 美国 MJ, 型号: PTC-100); 电泳系统 (北京市六一仪器厂); 离心机 (德国 Eppendorf 公司, 型号: 5415D); 紫外凝胶成像分析仪 (英国 Syngene 公司)。

试剂 DNA 提取试剂盒 (Promega 公司, Wizard SV genomic DNA purification system); 蛋白酶 K (Promega 公司); DNA Taq 聚合酶 (① Takara 公司, Takara Ex Taq; ② 上海生工生物工程有限公司, Pfu DNA polymerase; ③ Invitrogen 公司, Platimun Taq DNA 聚合酶); DL2000 Marker: 从上至下为 2 000、1 000、750、500、250 和 100 bp (Takara 公司); 琼脂糖 (上海生工生物工程有限公司); 电泳缓冲液配制试剂 EDTA、Tris 为分子生物学级试剂, 冰醋酸为分析纯。

金钱白花蛇和其伪品分别来自中国药品生物制品检定所中药标本室、江西樟树药材市场以及北京地区的药店等 (表 1)。所有样品均经中国药品生物制品检定所张继研究员鉴定。

实验结果

1 特异性鉴别引物的设计

从 GenBank 查找金钱白花蛇、黑眉锦蛇、红点锦蛇、灰鼠蛇、赤练华游蛇、赤练蛇等伪品的 Cyt *b* 序列。用 DNAMAN 软件进行序列比较, 找到差异片段, 设计鉴别引物 5'-GAAATTTCGGCTCTATGCTT

Table 1 Detailed sources of materials used in this study. NICPBP: National Institution for the Control Pharmaceutical and Biological Products

No.	Name of original animals	Source
1	<i>B.multicinctus</i>	Anguo, Hebei
2	<i>B.multicinctus</i>	Beijing Tongrentang
3	<i>B.multicinctus</i>	Beijing Golden Elephant Pharmacy
4	<i>B.multicinctus</i>	Beijing Yangguangtongren Pharmacy
5	<i>B.multicinctus</i>	Beijing Jinglongtang Pharmacy
6	<i>B.multicinctus</i>	Beijing Traditional Chinese Medical Hospital
7	<i>B.multicinctus</i>	Beijing Baoxing Pharmacy
8	<i>B.multicinctus</i>	Beijing Lijuntang Pharmacy
9	<i>B.multicinctus</i>	Beijing Dongdan Chinese Medicine Clinics
10	<i>B.multicinctus</i>	Beijing Kaierkang Pharmacy
11	<i>B.multicinctus</i>	Beijing Yongantang
12	<i>B.multicinctus</i>	Beijing Shanhetang Pharmacy
13	<i>B.multicinctus</i>	Beijing Quanxin Pharmacy
14	<i>Rhabdophis tigrinus</i>	Anguo, Hebei
15	<i>Elaphe mandarina</i>	NICPBP
16	<i>Lycodon fasciatus</i>	Anguo, Hebei
17	<i>Ptyas korros</i>	Anguo, Hebei
18	<i>Ptyas mucosus</i>	NICPBP
19	<i>Elaphe rufodorsata</i>	NICPBP
20	<i>Elaphe carinata</i>	NICPBP
21	<i>Sinonatrix annularis</i>	Zhangshu, Jiangxi
22	<i>Enhydryis chinensis</i>	Anguo, Hebei
23	<i>Agkistrodon halys</i>	Anguo, Hebei
24	<i>Elaphe moellendorffi</i>	Anguo, Hebei
25	<i>Naja naja</i>	NICPBP
26	<i>Dinodon rufozonatum</i>	Zhangshu, Jiangxi
27	<i>Enhydryis plunbea</i>	Anguo, Hebei
28	<i>Bungarus fasciatus</i>	Anguo, Hebei
29	<i>Ovophis monticola</i>	Anguo, Hebei
30	<i>Elaphe taeniura</i>	Anguo, Hebei
31	<i>Lycodon ruhstrati</i>	Changbei, Jiangxi
32	<i>Agkistrodon acutus</i>	Zhejiang
33	<i>Zaocys dhumnades</i>	Zhangshu, Jiangxi

ATAACCTGTCTTT-3' 和 5'-GGAATCTTATCGATATC TGAATTAGTA-3' (图 1)。引物由北京英俊生物有限公司合成。

2 基因组 DNA 提取方法考察

为减少样品用量, 简化试剂配制和操作过程, 本研究采用商品 DNA 提取试剂盒进行 PCR 模板 DNA 的提取, 供试品用量为 0.1 g 干燥药材粉末。考察了国产上海生工生物工程有限公司的 DNA 提取试剂盒和 Promega 公司的 DNA 提取试剂盒, 按照试剂盒说明书进行基因组 DNA 的提取, 结果两个公司的试剂

<i>B.multicinctus</i> AJ565001	CTGATGAAATTCGGCTCTATGCTTATAACCTGTCTTTACTA	105
<i>R.tigrinus</i> AF471051	G--G--G--C-----A--A--A--AT-T-----CTCAGCC---	105
<i>E.mandarina</i> DQ902115	-----C--T--A--C--A--AC-----TCAGCC---	105
<i>L.fasciatus</i> EU999215	--AT-A--GG----TT-G--TCAACG--T-A-A---C-ACGTG-	484
<i>P.korros</i> AY486929	A--G----C--T--A--C-----AC--G---CTCAGCCA--	105
<i>P.mucosus</i> AF471054	-----C--T--A--C-----AT---T--CTCAGCCA--	105
<i>E.rufodorsata</i> AF036016	-AT-CA---C--ACA-G-A--TGGCGC-T--ATAT-C---A-C	137
<i>E.carinata</i> DQ902133	-----C--T--A--A--A--AC-----AGCT---	105
<i>S.annularis</i> AF036024	-CACGC--T-GG--C---A--TT--T-C-TT---A-C-ACA-C	161
<i>E.chinensis</i> GU997184	TGATACT---A-A--CTC--A--CCCTG-ACA---CCT--C	545
<i>A.halys</i> AY223564	-----C--T--A--A--A--AC-C-----CT-AA--A-C	104
<i>E.moellendorffi</i> AF036020	TCATGC--T-GGA-C---C--AT-CT-C-T---A-C-ATA-T	161
<i>N.naja</i> GQ359506	--C-CCCG---TTTGC-CTACA--T--T---AC-A---TC-	465
<i>D.rufozonatum</i> AF471063	-----C-----A--C--A--AC-----TCAGCC---	105
<i>E.plunbea</i> GU997211	-----A--T-----C--AACT---	117
<i>B.fasciatus</i> EU547086	-----C--T-----AT-AC-----C-----	104
<i>O.monticola</i> DQ305463	T----G--C-----G--A--A--AC-CG---CT-AA--A-C	104
<i>E.taeniura</i> AF036011	TCATGC--T-GG--CA----AT-CT-T-T---A-C-ATA-T	162
<i>L.ruhrstrati</i> EU999209	--AT-A--GG----TT-G--TCAACG--T-A-A---C-ACGTG-	484
<i>D.acutus</i> AY223560	T-----C--T--A--C--AT-AT-T---C--AA--A-C	104
<i>Z.dhumnades</i> DQ272474	TACTAACCGC--A-----CAAA-C-C---G--T-C--C---	58
<i>B.multicinctus</i> AJ565001	CTTGGTACTAATTCAGATATCGATAAGATTCCACTACACC	640
<i>R.tigrinus</i> AF471051	--A--A--C--C-----A--C---T-C---	640
<i>E.mandarina</i> DQ902115	--A--A--C--C-----C--T--C--A-----T-C---	640
<i>L.fasciatus</i> EU999215	G---GG-G-CC-TG--A-AAA-A-GA-C-T-CAACAC-A	273
<i>P.korros</i> AY486929	--A--A--A--C--T---T--C--A--C---T-T---	640
<i>P.mucosus</i> AF471054	--A--A--C-----C-----C--A-----GT-T---	640
<i>E.rufodorsata</i> AF036016	---ACACGC---GGCGC---C---TTC--TAT--G--T-	142
<i>E.carinata</i> DQ902133	--A--A--A--C-----C--T---A-----GT-C---	640
<i>S.annularis</i> AF036024	ACAAAC-A-C-CCGAT-T-TCC--GC-A-----T--A	41
<i>E.chinensis</i> GU997184	-C--A-GAATG---CTA-C-T-AT-A--ATTG-A-----	416
<i>A.halys</i> AY223564	--G--A--A--C-----T--C--A--C---T-C---	639
<i>E.moellendorffi</i> AF036020	-C-TCATGC---GGAGCC--C---TTC---AT--GT-T-	175
<i>N.naja</i> GQ359506	----C--C--C-----T--C--A--C---T-C---	563
<i>D.rufozonatum</i> AF471063	--A--A--A--C-----C--T---A--C---T-T---	640
<i>E.plunbea</i> GU997211	--A--A--C--C--C-----T---A--C---T-C---	652
<i>B.fasciatus</i> EU547086	----C-----C-----T---A--C---T---T-	639
<i>O.monticola</i> DQ305463	--A--A--A--C-----C-----C--A--C---T-T---	639
<i>E.taeniura</i> AF036011	--GTA-CTAT---T--CG-ACGGG--C-AT-----GGA	188
<i>L.ruhrstrati</i> EU999209	G---GG-G-CC-TG--A-AAA-A-GA-C-T-CAACAC-A	273
<i>A.acutus</i> AY223560	T-A--G--A--C-----C--T--C--A--C-----C---	639
<i>Z.dhumnades</i> DQ272474	CC-TCATGC---GGAGC---C---TTT--TAT--G--T-	189

Figure 1 Sequence alignment of Cyt *b* gene fragment of *B. multicinctus* and its adulterants. The primers were underlined. Lines indicate identity to the first line

盒均能得到弥散的 DNA 条带, 能满足 PCR 的要求 (图 2)。由于 Promega 提取试剂盒提取更方便, 操作时间短, 因此, 对 Promega 试剂盒中的 55 °C 温育时间进行进一步的考察。分别温育 0.5、1 和 2 h 及过夜, 结果均能提取到 DNA, 且满足 PCR 反应的要求 (图 3)。从图可见, 随着温育时间的延长, 其 DNA 提取量有较明显的增加, 故对于降解比较严重的药材, 可采用温育过夜的方法, 也可根据实验进度合理选用温

育时间。

3 对照 PCR 的确定

PCR 鉴别极易出现假阳性和假阴性结果, 为防止误差的产生, PCR 鉴别须建立严格的阳性、阴性及空白对照。阳性对照为经过中国药品生物制品检定所中药室标本馆张继馆长鉴定的正品金钱白花蛇, 阴性对照为目前市场上充伪最严重的赤练蛇, 空白对照为无菌双蒸水。

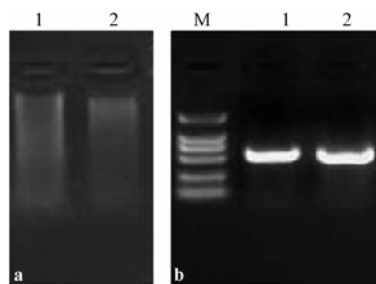


Figure 2 *B. multicinctus* extracted from two species of DNA purification system. a: DNA; b: PCR products. M: DL2000 Marker; 1: Wizard SV genomic DNA purification system (Promega); 2: EZ spin column animal genomic DNA isolation kit (Sangon, Shanghai)

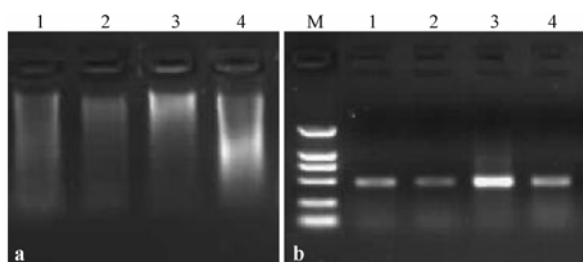


Figure 3 *B. multicinctus* incubated for a series of time. a: DNA; b: PCR products. M: DL2000 Marker; 1: 0.5 h; 2: 1 h; 3: 2 h; 4: Overnight

4 PCR 扩增及检测

在 200 μL 离心管中进行 PCR 反应。反应总体积为 25 μL , 包括 10 $\times$ PCR 缓冲液 2.5 μL 、dNTP (2.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 2 μL 、鉴别引物 (10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 各 0.5 μL 、高保真 Taq DNA 聚合酶 (5 $\text{U}\cdot\text{L}^{-1}$) 0.2 μL 和模板 0.5 μL , 用无菌双蒸水补足反应体积。将离心管置 PCR 仪, PCR 反应参数: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min, 循环反应 30 次 (95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 45 s), 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保温结束反应。取 5 μL 反应液经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, EB 染色, 接通电源按 5 $\text{V}\cdot\text{cm}^{-1}$ 恒压进行电泳 20 min, 电泳结束后, 将凝胶置于凝胶成像仪上或紫外透射仪上成像。上述 PCR 各主要参数均经过系统的考察。

4.1 退火温度考察 分别设置退火温度 55、60、65 和 68 $^{\circ}\text{C}$, 结果表明在 55~60 $^{\circ}\text{C}$ 范围内, 金钱白花蛇

正品能扩增得到 565 bp 的亮带, 65 $^{\circ}\text{C}$ 时只能产生很弱的条带, 68 $^{\circ}\text{C}$ 时无扩增; 阴性对照在此范围内均未扩增 (图 4)。可见, 金钱白花蛇引物特异性很好, 为保证 PCR 反应的重复性, 确定 PCR 退火温度为 55 $^{\circ}\text{C}$ 。

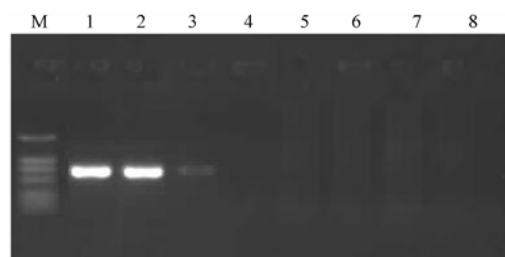


Figure 4 The PCR program with a series of annealing temperature. M: DL2000 Marker; 1, 5: 55 $^{\circ}\text{C}$; 2, 6: 60 $^{\circ}\text{C}$; 3, 7: 65 $^{\circ}\text{C}$; 4, 8: 68 $^{\circ}\text{C}$; 1-4: *B. multicinctus*; 5-8: Negative control

4.2 Taq 酶用量考察 25 μL 体系中 Taq 酶分别加 0.1 μL (0.5 U)、0.2 μL (1 U)、0.3 μL (1.5 U)、0.4 μL (2 U)、0.5 μL (2.5 U)、0.6 μL (3 U) 和 0.8 μL (4 U), 结果表明: 当 Taq 酶用量为 0.1 μL 时, 金钱白花蛇和阴性对照均未扩增出任何片段, 当 Taq 酶用量在 0.2~0.8 μL 时, 金钱白花蛇均扩增出 565 bp 片段, 阴性对照均未扩增 (图 5)。可见金钱白花蛇引物非常特异, Taq 酶不会引起假阳性结果的产生。确定 25 μL 体系中 Taq 酶用量为 0.2 μL , 即 1 U。

4.3 循环次数考察 分别选用 25 个循环和 30 个循环进行考察, 结果表明 25 个循环无明显条带, 而 30 个循环能得到准确鉴别 (图 6), 故将循环次数确定为 30 个循环。

4.4 DNA 模板量考察 对 25 μL PCR 反应体系中的模板 DNA 用量进行了考察, 分别设置为 0.1、0.2、0.5、1.0、1.5 以及 2 μL , 结果表明 0.1~1.5 μL 均能扩增, 2 μL 条带消失。随模板浓度加大, 扩增条带逐渐明显, 增加到 1.0 μL 后, 条带逐渐减弱 (图 7)。为防止模板浓度过高抑制 PCR 反应, 选择 25 μL 体系中加入 0.5 μL 作为最终模板浓度。

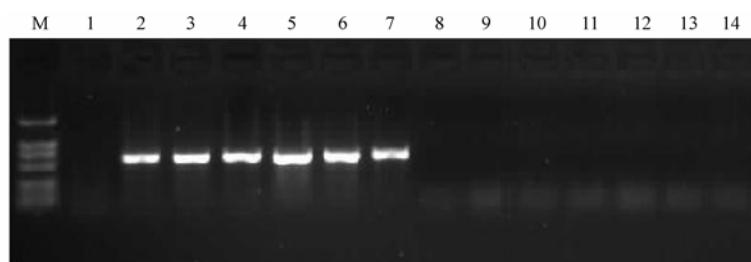


Figure 5 A series of volume of Taq enzyme in 25 μL PCR reaction mixture. M: DL2000 Marker; 1, 8: 0.1 μL ; 2, 9: 0.2 μL ; 3, 10: 0.3 μL ; 4, 11: 0.4 μL ; 5, 12: 0.5 μL ; 6, 13: 0.6 μL ; 7, 14: 0.8 μL ; 1-7: *B. multicinctus*; 8-14: Negative control

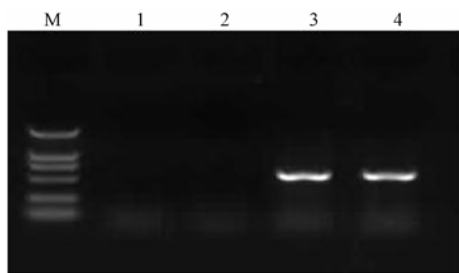


Figure 6 The PCR program amplified *B. multicinctus* followed by two species of cycle numbers. M: DL2000 Marker; 1, 2: Amplification for 25 cycles; 3, 4: Amplification for 30 cycles

5 普适性试验

5.1 不同 PCR 仪考察 将金钱白花蛇分别用 5332、TC-512 以及 PTC-100 型基因扩增仪进行 PCR 扩增, 结果表明金钱白花蛇均能稳定的扩增 565 bp 条带, 阴性对照均无条带。不同 PCR 仪上扩增条带的亮度稍有差异 (图 8), 但不影响 PCR 鉴别结果。

5.2 不同 Taq 酶考察 分别使用 Takara、Promega、

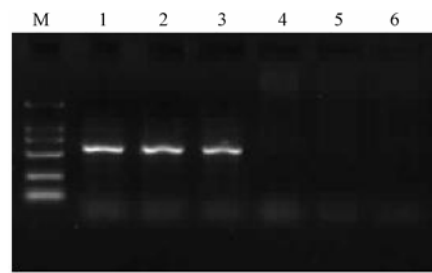


Figure 8 The PCR reaction mixture amplified by three species of PCR systems. M: DL2000 Marker; 1, 4: 5332; 2, 5: TC-512; 3, 6: PTC-100; 1-3: *B. multicinctus*; 4-6: Negative control

上海生工生物工程有限公司的高保真 Taq DNA 聚合酶进行试验, 结果表明均能得到准确的鉴别, 不同公司的酶由于活力不同而表现出扩增条带的亮度稍有差异 (图 9), 但不影响 PCR 鉴别结果。

6 PCR 鉴别结果

采用上述确定的体系, 对金钱白花蛇 13 批样品及 20 批伪品进行鉴别 (图 10、图 11), 结果表明该体

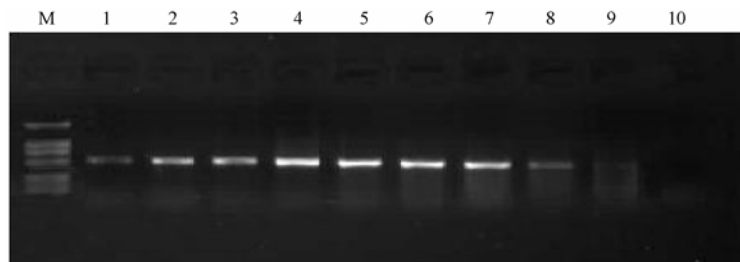


Figure 7 A series of volume of DNA templates in 25 μ L PCR reaction mixture (*B. multicinctus*). M: DL2000 Marker; 1: 0.1 μ L; 2: 0.2 μ L; 3: 0.3 μ L; 4: 0.5 μ L; 5: 0.6 μ L; 6: 0.8 μ L; 7: 1.0 μ L; 8: 1.5 μ L; 9: 2.0 μ L; 10: Negative control

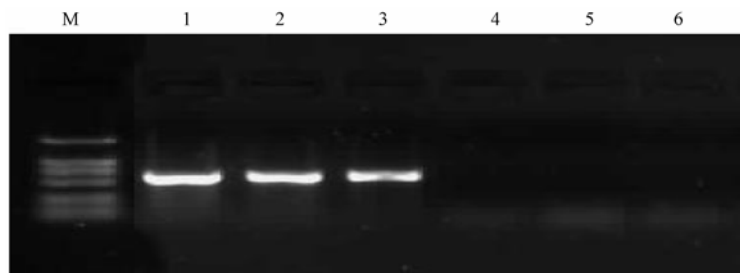


Figure 9 The PCR reaction mixture contained three species of Taq enzyme separately. M: DL2000 Marker; 1, 4: Sangon; 2, 5: Promega; 3, 6: Takara; 1-3: *B. multicinctus*; 4-6: Negative control

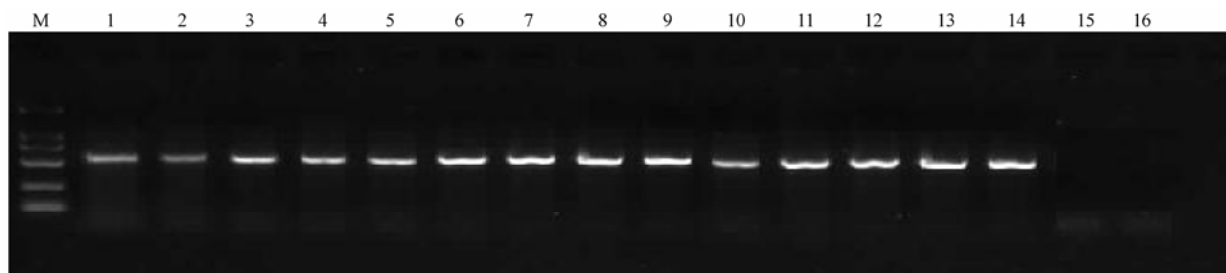


Figure 10 The PCR products of 13 samples of *B. multicinctus*. M: DL2000 Marker; 1: Positive control; 2-14: Samples No.1-13; 15: Negative control; 16: Blank

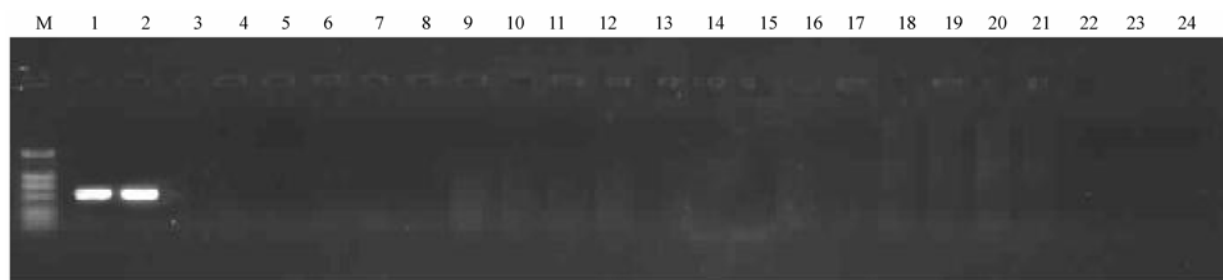


Figure 11 The PCR products of *B. multicinctus* and its adulterants. M: DL2000 Marker; 1: Positive control; 2: *B. multicinctus*; 3–22: Samples No.14–33; 23: Negative control; 24: Blank

系能稳定准确地鉴别金钱白花蛇。

讨论

本研究对金钱白花蛇的 PCR 鉴别方法进行了系统的考察和优化。经过优化的 DNA 提取可在 2 h 内完成, PCR 循环可在 1.5 h 内完成, 凝胶电泳在 20 min 内完成, 整个反应可在 4 h 内完成。试验的所有样品, 无假阳性、假阴性结果, 特异性高。整个鉴定过程样本用量小, 且在较宽泛的水浴时间、模板浓度、Taq 酶浓度范围内, 都能准确鉴别药材真伪, 大大简化了操作要求, 便于检验。经初步试验验证, PCR 反应试剂也可制成试剂盒进行鉴别, 操作者只需在 PCR 反应混合液中加入制备的 DNA 模板即可进行 PCR 扩增, 这样鉴定人员只需按照试剂盒说明书操作即可, 既节约了大量试剂的配制时间, 也更增强了该方法的可操作性。基于类似方法的蕲蛇、乌梢蛇饮片 PCR 鉴别方法已被 2010 版《中国药典》收载, 相信随着分子生药学的不断发展, 利用分子手段鉴别中药材, 将拥有更为广阔的发展潜力及应用价值。

该方法在对粉末状药材的鉴别上, 弥补了传统鉴别方式的缺陷, 可以快速准确地鉴别金钱白花蛇及其伪品, 但银环蛇的幼蛇和成体蛇通过该方法无法鉴别, 故对于利用成体银环蛇冒充金钱白花蛇的鉴别及混有银环蛇的粉末鉴别还需继续寻找合适的方法。

References

- [1] State Pharmacopoeia Committee. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典) [S]. Part I. Beijing: Chemical Industry Press, 2010: 204.
- [2] Wang YQ, Zhou KY, Xu LS, et al. Sequencing of Cyt *b* gene fragments and PCR identification of "JinQianBaiHuaShe" (*Bungarus Parvus*) and its adulterants [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 1998, 33: 941–947.
- [3] Feng CQ, Tang XJ, Huang LQ, et al. High specific PCR identification of *Bungarus multicinctus* and its adulterants [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2006, 31: 1050–1053.