

羚羊角塞特异性 PCR 鉴别方法研究

蒋超 金艳 袁媛 黄璐琦 赵玉洋

(中国中医科学院中药资源中心,北京,100700)

摘要 目的:为解决中药羚羊角塞与羚羊角相比因失去“通天眼”等传统鉴别特征而鉴别困难的问题,建立准确鉴别鉴定羚羊角塞的方法。方法:通过比对羚羊角塞基原动物赛加羚羊与其7种常见混伪品的细胞色素C氧化酶亚基I(Cytochrome oxidase I, COI)序列,根据差异位点设计出仅扩增赛加羚羊DNA的特异性鉴别引物。结果:进行PCR时,当退火温度为64℃,循环数为33个时,仅羚羊角塞正品扩增获得约300 bp大小的条带,混伪品无条带。结论:该方法可作为准确有效检测待检样品是否来源于赛加羚羊的方法,用于羚羊角类样品的DNA鉴别。

关键词 特异性PCR;分子鉴定;羚羊角塞;中药鉴定

Molecular Authentication of Saigae Tataricae Cornu Tampon by Specific PCR

Jiang Chao, Jin Yan, Yuan Yuan, Huang Luqi, Zhao Yuyang

(National Resource Center for Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

Abstract Objective: To solve the problem of authentication difficulty of saigae tataricae cornu tampon due to loss of traditional identify features such as “Tongtianyan”, and to establish an accurate authentication method for saigae tataricae cornu tampon.

Methods: Specific PCR primers for *S. tatarica* were designed based on cytochrome oxidase I (COI) sequences and the annealing temperature of PCR reaction conditions was optimized, which was performed to authenticate saigae tataricae cornu tampon and its 7 adulterants. **Results:** Only saigae tataricae cornu tampon could obtain a ~300 bp specific band in electrophoresis while the adulterants did not when the temperature was 64℃ and 33 cycle number. **Conclusion:** Specific PCR could accurately and effectively authenticate the biological origin of sample is *S. tatarica* or not.

Key Words Specific PCR; Molecular authentication; Saigae tataricae cornu tampon; TCM authentication

中图分类号:R284.1 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2018.02.003

中药羚羊角为牛科动物赛加羚羊(*Saiga tatarica* Linnaeus)的角,角根所具骨质结构称羚羊角塞。羚羊角及羚羊角塞均为我国传统名贵中药材,具有平肝息风、清肝明目、散血解毒的功效,临床效果显著。

近年来,由于羚羊角类药材(包括羚羊角、羚羊角塞、羚羊角镑片等)资源储量下降,导致常出现伪品混入及跨国走私等现象。羚羊角塞基原物种赛加羚羊主要分布于我国及一些中亚国家,但分布于我国新疆地区的赛加羚羊已因过度捕猎而灭绝,而分布于国外的种群也因盗猎等原因在短短几年内数量下降了90%,致使药用资源严重不足^[1-2]。山羊(*Capra hircus*)、绵羊(*Ovis aries*)、普氏原羚(*Procapra przewalskii*)、藏原羚(*Procapra picticaudata*)、藏羚羊(*Pantholops hodgsonii*)、蒙原羚(*Procapra gutturosa*, 黄羊)、鹅喉羚(*Gazella subgutturosa*, 长尾黄羊)等动物的角常作为赛加羚羊角类的民间代用品^[3],但其疗效尤其是退热效果与正品羚羊角具有明显差

异^[4],不可混用。然而,羚羊角类药材主要为蛋白质和骨质成分,缺乏用于作为标记区分的小分子次生代谢物,使用显微鉴别、薄层色谱、蛋白电泳等方法鉴定均有一定困难,大多数只能区分羚羊角和山羊角等少数几种角类,而羚羊角塞因仅剩骨质部分,已丢失羚羊角类传统鉴别特征“合把”和“通天眼”,性状鉴别更为困难。需要建立更加快速、准确的方法来鉴定羚羊角塞与其混伪品。

特异性PCR鉴别是一种根据物种品间差异序列设计特异性引物从而专一性鉴别是否为所要求生物基原的DNA分子检测方法。该技术因其客观、准确,可为中药材的鉴定提供准确的结果。2010年版《中华人民共和国药典》记载了使用特异性PCR技术鉴别动物类药材蕲蛇、乌梢蛇饮片的方法,成为世界上首个中药、天然药分子鉴定国家标准,其准确性得到了充分验证^[5-6]。目前已有多种动、植物药材成功应用特异性PCR技术进行基原鉴定,其对保障药材市场药

基金项目:中医药行业科研专项(201407003)——常用大宗中药材质量现场快速检测技术研究;中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金资助(ZZ10-008)

作者简介:蒋超(1988.06—),男,博士,助理研究员,研究方向:中药分子鉴定,E-mail:jiangchao0411@126.com

通信作者:袁媛(1978.07—),女,博士,研究员,研究方向:中药鉴定与分子生药学,E-mail:y_yuan0732@163.com

品安全、准确具有重要的作用^[7-11]。虽然目前也有使用特异性 PCR 方法鉴别羚羊角类药材的报道,但多只针对山羊角、黄羊角等 2~3 个物种,并未囊括鹅喉羚、水牛角等最为常见的伪品^[12-13]。本研究通过比对羚羊角塞基原动物赛加羚羊及其 7 种常见混伪品线粒体细胞色素 C 氧化酶亚基 I (Cytochrome Coxidase I, COI) 基因片段序列,设计了一对仅扩增赛加羚羊 DNA 的特异性鉴别引物,通过使用试剂盒快速提取 DNA,经优化特异性 PCR 反应程序进行快速扩增,能准确鉴别羚羊角塞及其混伪品,为实现羚羊角类药材的特异性 DNA 分子鉴别提供技术保障。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 PCR 仪:ABI 9700 (Life 公司)、Veriti™ (Life 公司)、TC-96 (杭州博日公司)以及 S1000 型 (Bio-Rad 公司);5810 R 型高速冷冻离心机 (Eppendorf 公司);VORTEX-2 GENIE 漩涡震荡仪 (Scientific industries 公司);PowerPac™ 型电泳仪 (Bio-Rad 公司);HE99X-15-1.5 型电泳槽 (Hoefer 公司);SYNGENE 凝胶成像系统 (GENE 公司)。

1.2 试剂 不同特性 Taq DNA 聚合酶:r Taq (Takara 公司生产)、Trans Taq (TransGen 公司生产)、Vazyme Taq plus (Vazyme 公司生产),中度保真的 Ex Taq (Takara 公司生产)、HS Taq (Takara 公司生产),高度保真的 SpeedSTAR HS Taq 聚合酶 (Takara 公司生产)进行试验;琼脂糖 (Promega 公司生产);溴化乙啶 (Fluka 公司生产);DL2000 DNA Marker (Takara 公司生产);10000 × SYBR (Invitrogen 公司生产);其他试剂均为国产分析纯。

1.3 分析样品 采集来自于不同产地的羚羊角塞正品及常见混伪品共 52 份材料进行特异性 PCR 鉴别研究。样品采自安徽亳州、广西玉林、河北安国等药材市场,凭证标本保存于中国中医科学院中药资源中心。见表 1。

2 方法与结果

2.1 引物设计

2.1.1 序列比对 从 NCBI 数据库 (National Center for Biotechnology Information) 中下载羚羊角塞的基原物种赛加羚羊 (KF73209.1、KC679014.1、KC679010.1) 及其可能的混伪品基原物种绵羊 (KT750038.1)、山羊 (JN245994.1)、普氏原羚 (KC679051.1)、藏原羚 (KC679009.1)、藏羚羊 (HQ269460.1)、蒙原羚 (KC679036.1)、鹅喉羚 (KC679026.1) 的 COI 序列经 Clustal W 程序进行多重序列比对,选择羚羊角塞基原动物与其混伪品序

列差异大的区域进行引物设计。

2.1.2 引物设计 使用 Premier Primer 5.0 (<http://www.premierbiosoft.com/primerdesign/>) 设计特异性 PCR 鉴别引物,调整参数使引物为 3' 末端位于赛加羚羊与其混伪品序列差异区域,PCR 产物长度为 100~400 bp, Tm 值为 55~65 °C。引物命名为 LYJ. F 和 LYJ. R, 由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。

2.2 基因组总 DNA 的提取 取 2 g 样品,用 70% 乙醇擦拭表明,使用 Retsch MM 400 球磨仪粉碎至能过 80 目筛,取 50 mg 粉末,使用 Wizard® SV Genomic DNA Purification System (Promega 公司) 试剂盒按说明书进行 DNA 提取。

表 1 试验材料详表

序号	材料名称	拉丁名	来源	数量
1	羚羊角	<i>Saiga tatarica</i>	四川荷花池市场	3
2	羚羊角	<i>Saiga tatarica</i>	安徽亳州市场	7
3	羚羊角	<i>Saiga tatarica</i>	河北安国市场	1
4	羚羊角塞	<i>Saiga tatarica</i>	安徽亳州市场	20
5	普氏原羚	<i>Procapra przewalskii</i>	个人收藏	1
6	山羊角	<i>Capra hircus</i>	安徽亳州市场	5
7	鹅喉羚	<i>Gazella subgutturosa</i>	安徽亳州市场	4
8	鹅喉羚	<i>Gazella subgutturosa</i>	安徽合肥	1
9	藏原羚	<i>Procapra picticaudata</i>	安徽亳州市场	2
10	藏原羚	<i>Procapra picticaudata</i>	青海化隆	1
11	藏羚羊	<i>Pantholops hodgsoni</i>	安徽亳州市场	3
12	藏羚羊	<i>Pantholops hodgsoni</i>	个人收藏	1
13	蒙原羚	<i>Procapra gutturosa</i>	个人收藏	2
14	水牛角	<i>Bubalus bubalus</i>	安徽亳州市场	1

2.3 PCR 扩增条件的确定 通过调整 PCR 体系和反应程序确定蛤蚧特异性鉴别的最优条件。25 μL 初始 PCR 反应体系在 200 μL 离心管中进行 PCR 反应。反应总体积为 25 μL,包括 10 × PCR 缓冲液 2.5 μL、dNTP (2.5 mmol/L each) 1.5 μL、Taq DNA 聚合酶 (5 U/μL) 0.4 μL 和模板 1 μL,加入羚羊角塞正反反向鉴别引物 (10 μmol/L) 各 0.2 μL,用无菌双蒸水补足反应体积。PCR 反应在 Veriti™ 型 PCR 扩增仪上进行。初始反应程序。见表 2。取 PCR 反应产物,加入 5 μL 6 × Loading buffer (Takara 公司) 混匀后于 GelRed 染色的 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测,SYNGENE 凝胶成像系统观察、成像。

使用羚羊角塞鉴别引物对羚羊角正品及其常见伪品总 DNA 模板进行扩增,并分别考察:1) 退火温度;2) PCR 循环数;3) 模板 DNA 浓度;4) 变性和退火时间;5) Taq 种类;6) 不同 PCR 仪对 PCR 反应稳定性的影响。

表 2 引物及 PCR 反应条件

引物·名	序列(5'-3')	反应条件
LYJ. F	ACTTCTAGCATCTTCCATAGTTGAG	95 °C 预变性 5 min, 循环反应 35 次(95 °C 30 s, 60 °C 30 s)
LYJ. R	GGGAAGTAAAAGGACTAGGAGG	72 °C 延伸 5 min, 4 °C 保温

表 3 羚羊角特异性 PCR 条件考察结果

参数	参数值	适宜范围	最优条件
退火温度(°C)	58, 60, 62, 64, 66	60 ~ 66	64
PCR 循环数	27, 30, 33, 36	25 ~ 35	30
模板浓度(ng/μL)	0.2, 1, 5, 25	1 ~ 25	5
变性/退火时间(sec)	10, 20, 30	10 ~ 30	30
Taq 酶	r Taq, Trans Taq, Vazyme Taq plus, Ex Taq, HS Taq, SpeedStar HS Taq 聚合酶	除 Vazyme 均可使用	r Taq
PCR 仪	ABI 9700, Veriti™, TC-96, S1000	均可使用	Veriti™

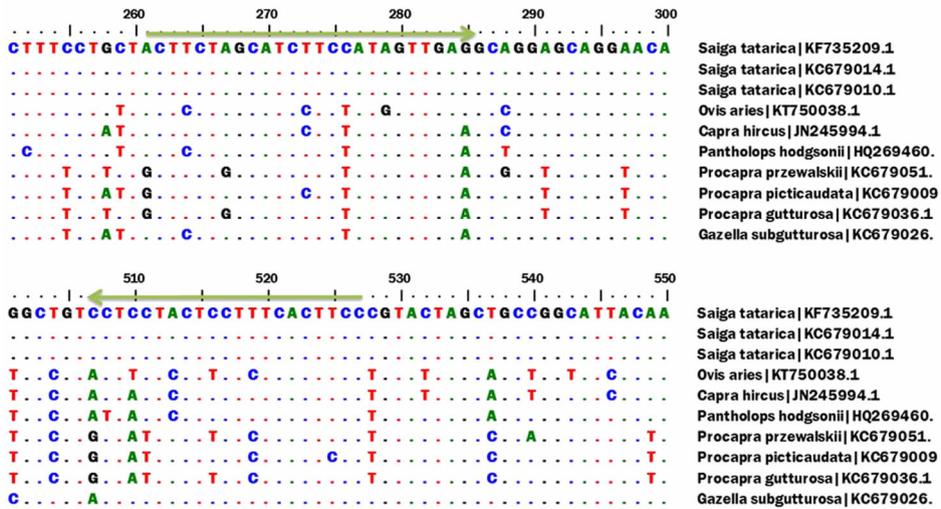


图 1 羚羊角塞特异性鉴别引物设计结果

2.4 羚羊角塞特异性鉴别引物的设计 使用 ClustalW 软件对赛加羚羊、山羊、绵羊、普氏原羚、藏原羚、藏羚羊、蒙原羚、鹅喉羚的 COI 序列进行多重序列比对,以赛加羚羊与混伪品具有差异的 SNP 位点为基础设计引物,赛加羚羊预期扩增长度为 266 bp,如图 1。

2.5 羚羊角塞特异性 PCR 鉴别条件考察 由于影响特异性鉴别准确性的关键因素包括退火温度、循环数和模板 DNA 浓度,而决定 PCR 反应速度的核心因素为循环数和退火/延伸时长,本研究以正品扩增强度和伪品条带有无为指标,依次对退火温度、循环数、DNA 浓度、变性/退火时间进行了系统考察,同时考察筛选的条件对不同 Taq DNA 聚合酶及不同 PCR 扩增仪的耐受性,结果表明,退火温度位于 60 ~ 66 °C,循环数 27 ~ 33, DNA 模板浓度 1 ~ 25 ng/μL 羚羊角及其常见混伪品。见表 3。在此条件下对不同保真度的 Taq 酶和不同型号 PCR 仪均具有耐受性。见表 3。而退火温度过低(<60 °C)、循

环数过大(>33)则会产生假阳性结果,模板浓度过低(<1 ng/μL)则会产生假阴性结果。最终确定羚羊角特异性 PCR 鉴别反应条件为 95 °C 预变性 5 min,循环反应 33 次(95 °C 30 s, 64 °C 30 s) 72 °C 延伸 5 min。

2.6 适用性考察 使用羚羊角塞特异性鉴别引物,采用筛选出的扩增体系和 PCR 反应条件,对不同药材市场的 31 批羚羊角类样品(其中羚羊角塞 20 批,羚羊角 11 批)及混伪品 21 批进行扩增,产物经琼脂糖凝胶电泳检测,仅羚羊角和羚羊角塞正品在 200 ~ 300 bp 间产生明亮单一条带,伪品无条带。见图 2、图 3。不同来源的正品羚羊角塞均产生一致结果,表明该体系能稳定准确地鉴别羚羊角塞。

3 讨论

遗传间断是进行物种划分的基础, DNA 分子鉴定的前提条件是正品与混伪品间存在序列差异,本研究对正品羚羊角塞的基原物种赛加羚羊及外观形态相似的 7 种混伪品物种 COI 序列进行了分析,发

现正伪品序列存在显著差异,系统发育树分析亦呈单系^[14-15],故可从根据 COI 序列差异位点设计特异性引物进行鉴别。

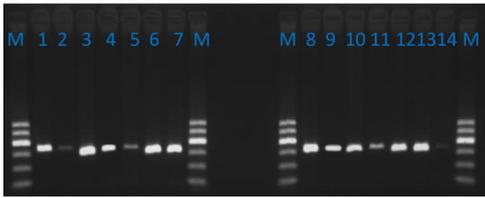


图2 使用 PCR 鉴别不同批次羚羊角和羚羊角塞

注:M;DL 500 Marker(条带大小自下而上依次为 100、150、200、300、400、500 bp);1~7:羚羊角;8~14:羚羊角塞



图3 使用 PCR 鉴别羚羊角塞常见伪品结果

注:M;DL 500 Marker(条带大小自下而上依次为 100、150、200、300、400、500 bp);1:普氏原羚;2~6:山羊角;7~11:鹅喉羚;12~14:藏原羚;15~18:藏羚羊;19~20:蒙原羚;21:水牛角

进行 PCR 分子鉴别的第一步是 DNA 提取,不同的方法其 DNA 提取效果可能会有区别,同时因羚羊角塞为骨制品, DNA 提取较为困难。为保证鉴别结果的准确性,本研究试验了不同的 DNA 提取方法(Promega DNA 提取试剂盒,柱式骨骼 DNA 提取试剂盒, SDS 法和 CTAB 法),发现各方法均能获得良好的提取效果,光吸收比值 $A_{260}/A_{280} > 1.5$, 浓度均 $> 20 \text{ ng}/\mu\text{L}$,且均可满足 PCR 扩增的基本要求。本研究选择最为简便的 Promega DNA 提取试剂盒进行 DNA 提取。方法学考察是获得稳定、准确 DNA 分子鉴别方法的必要步骤^[16]。我们对影响 PCR 扩增的核心因素,如退火温度、PCR 循环次数、DNA 浓度、DNA 聚合酶用量及不同品牌的 PCR 仪和 DNA 聚合酶进行了考察,发现所建立的特异性 PCR 鉴别方法具有很强的稳定性。见表 3。为考察羚羊角塞特异性 PCR 鉴别方法的特异性和适用性,本研究收集了不同药材市场的 31 批羚羊角塞类正品和市场常见的 21 批羚羊角塞混伪品进行验证,结果仅正品能扩增获得约 300 bp 大小的条带,混伪品无条带,表明所建立的特异性 PCR 鉴别方法能专属

性鉴别待检样品是否为正品基原,对羚羊角塞药材的使用和流通的安全性及规范性起到保障作用。

参考文献

- [1] Milner-Gulland EJ, Kholodova MV, Bekenov A, et al. Dramatic declines in saiga antelope populations [J]. *Oryx*, 2001, 35 (4): 340-345.
- [2] Milner-Gulland EJ, Bukreeva OM, Coulson T, et al. Conservation: Reproductive collapse in saiga antelope harems [J]. *Nature*, 2003, 422 (6928): 135.
- [3] 徐必达, 张华林. 羚羊角及其代用品的研究进展 [J]. *中药材*, 2003, 26 (12): 910-914.
- [4] Yan D, Luo JY, Han YM, et al. Forensic DNA barcoding and bio-response studies of animal horn products used in traditional medicine [J]. *PLOS ONE*, 2013, 8 (2): e55854.
- [5] 黄璐琦, 袁媛, 蒋超, 等. 动物药材分子鉴别现状与策略 [J]. *中国现代中药*, 2017, 19 (1): 1-10.
- [6] 黄璐琦, 袁媛, 袁庆军, 等. 中药分子鉴定发展中的若干问题探讨 [J]. *中国中药杂志*, 2014, 39 (19): 3663-3667.
- [7] 李敏, 黄龙妹, 赵欣, 等. 浙贝母特异性 PCR 鉴定方法研究 [J]. *中草药*, 2014, 45 (12): 1754-1757.
- [8] 李桂林, 宋雅迪, 吕振晖, 等. 基于 ITS 序列位点特异性 PCR 的酸枣仁及其混伪品的鉴别 [J]. *中国现代中药*, 2016, 18 (12): 1566-1570.
- [9] 蒋超, 罗宇琴, 袁媛, 等. 多重位点特异性 PCR 鉴别人参, 三七, 西洋参掺杂 [J]. *中国中药杂志*, 2017, 42 (7): 1319-1323.
- [10] 丁铃, 赵丹, 周涛, 等. 杜仲药材特异性 PCR 的鉴定方法研究 [J]. *中药材*, 2015, 38 (4): 730-734.
- [11] 蒋超, 赵群, 金艳, 等. 快速 PCR 技术鉴别中药材蛤蚧的方法研究 [J]. *中国现代中药*, 2017, 19 (1): 21-25.
- [12] 张晓璐, 白素英, 徐艳春. 赛加羚羊的分子生物学鉴别 [J]. *东北林业大学学报*, 2006, 34 (3): 106-108.
- [13] Cao M, Wang J, Yao L, et al. Authentication of animal signatures in traditional Chinese medicine of Lingyang Qingfei Wan using routine molecular diagnostic assays [J]. *Mol Biol Rep*, 2014, 41 (4): 2485-2491.
- [14] Tong Y, Jiang C, Yuan Y, et al. Molecular identification of antelope horn by melting curve analysis [J]. *Mitochondrial DNA A*, 2016, 27 (6): 3945-3951.
- [15] Chen J, Jiang Z, Li C, et al. Identification of ungulates used in a traditional Chinese medicine with DNA barcoding technology [J]. *Ecol Evol*, 2015, 5 (9): 1818-1825.
- [16] 陈康, 蒋超, 金艳, 等. 人参属中药材高分辨率熔解曲线鉴定及其方法学考察 [J]. *药物分析杂志*, 2017, 37 (1): 64-73.

(2017-12-05 收稿 责任编辑: 张文婷)

(上接第 251 页)

- [14] Su P, Cheng Q, Wang X, et al. Characterization of eight terpenoids from tissue cultures of the Chinese herbal plant, *Tripterygium wilfordii*, by high-performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. *Biomedical Chromatography*, 2014, 28 (9): 1183-1192.
- [15] 吴春敏. 雷公藤化学成分与多组分含量测定研究 [D]. 上海: 第

二军医大学药学院药物分析学教研室, 2010.

- [16] 马鑫斌, 巴文强, 王珂, 等. 雷公藤药材中雷公藤甲素及总二萜内酯的含量测定 [J]. *中国中医药*, 2014, 12 (6): 153-155.
- [17] 黄文华, 郭宝林, 斯金平, 等. 雷公藤属 3 种植物不同群体和个体中雷公藤甲素的研究 [J]. *中草药*, 2005, 36 (7): 1065.

(2017-12-05 收稿 责任编辑: 张文婷)