

## 基于 12S 基因对中成药中药用乌梢蛇的分子鉴定研究

刘晶晶<sup>1</sup>, 张众谋<sup>2</sup>, 戴忠<sup>1</sup>, 杨晶凡<sup>3</sup>, 徐蓓蕾<sup>4</sup>, 康帅<sup>1\*</sup>, 马双成<sup>1\*</sup> (1. 中国食品药品检定研究院, 北京 100050; 2. 中国药科大学, 南京 211100; 3. 河南中医药大学, 郑州 450000; 4. 哈尔滨商业大学, 哈尔滨 150000)

**摘要:**目的 建立一种适用于中成药中乌梢蛇药材掺伪问题的分子鉴别方法。方法 收集组方有乌梢蛇的中成药 11 种、乌梢蛇及其混伪品 15 种。对所有样品进行总基因组 DNA 提取, 基于 12S 基因片段对乌梢蛇及其混伪品对比分析, 根据差异位点设计乌梢蛇通用引物序列、特异引物序列以及荧光定量所用引物和探针, 分别采用不同聚合酶链式反应(PCR)方法扩增乌梢蛇药材及中成药中乌梢蛇成分, 优化反应体系并对方法进行耐受性和适应性的考察。结果 建立了乌梢蛇的特异性 PCR 技术, 乌梢蛇正品均在 200 bp 附近处有一清晰条带, 其他混伪品无条带。建立荧光定量 PCR 鉴别方法, 适用于 DNA 含量低的中成药检测。结论 通过特异性引物 PCR 扩增可以有效鉴别乌梢蛇药材, 通过荧光定量 PCR 检测法可以有效鉴别乌梢蛇药材及中成药中乌梢蛇的真伪问题。方法具有特异、快速、灵敏的特点, 为乌梢蛇及中成药中乌梢蛇药材的真伪鉴别提供参考。

**关键词:** 乌梢蛇; 中成药; 分子鉴定; 荧光检测

doi:10.11669/cpj.2024.01.003 中图分类号:R282 文献标志码:A 文章编号:1001-2494(2024)01-0018-11

### Molecular Identification of Chinese Patent Medicine Containing *Zaocys dhumnades* Based on 12S Gene

LIU Jingjing<sup>1</sup>, ZHANG Zhongmou<sup>2</sup>, DAI Zhong<sup>1</sup>, YANG Jingfan<sup>3</sup>, XU Beilei<sup>4</sup>, KANG Shuai<sup>1\*</sup>, MA Shuangcheng<sup>1\*</sup> (1. National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China; 2. China Pharmaceutical University, Nanjing 211100, China; 3. Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450000, China; 4. Harbin Business University, Harbin 150000, China)

**ABSTRACT; OBJECTIVE** To establish a molecular identification method for the adulteration of *Zaocys dhumnades* in Chinese patent medicine. **METHODS** Eleven kinds of Chinese patent medicines containing *Zaocys dhumnades* and 15 kinds of *Zaocys dhumnades* and their adulterants were collected. The total genomic DNA was extracted from all samples, and the comparison and analysis of *Zaocys dhumnades* and its adulterants were conducted based on 12S gene fragments. The universal primer sequence, the specific primer sequence and the primers and probes used for fluorescence quantification of *Zaocys dhumnades* were designed according to the difference points. Different PCR methods were used to amplify the DNA of *Zaocys dhumnades* contained in the medicinal materials of *Zaocys dhumnades* and Chinese patent medicines respectively. The reaction system was optimized and the tolerance and adaptability of the methods were investigated. **RESULTS** The specific PCR technique of *Zaocys dhumnades* was established. All the authentic *Zaocys dhumnades* had a clear band around 200 bp, and other adulterants had no band. Fluorescent quantitative PCR method was established for the identification of Chinese patent medicines with low DNA content. **CONCLUSION** The medicinal materials of *Zaocys dhumnades* can be effectively identified by PCR amplification with specific primers. Fluorescent quantitative PCR detection can effectively identify the authenticity of *Zaocys dhumnades* in Chinese traditional medicine. The method is specific, rapid and sensitive, which provides a reference for the identification of *Zaocys dhumnades* in Chinese patent medicine.

**KEY WORDS:** *Zaocys dhumnades*; Chinese patent medicine; molecular identification; fluorescence detection

乌梢蛇为游蛇科动物乌梢蛇[*Zaocys dhumnades* (Cantor)]的干燥体<sup>[1]</sup>。乌梢蛇最早记载于《雷公炮炙论》,剖开腹部或先剥皮留头尾,除去内脏,盘成圆盘状,用柴火熏至发黑晒干即得<sup>[2]</sup>。其性味甘

平,归肝经。为常用的祛风活络类药材,临床常用于风湿顽痹,麻木拘挛,中风口眼歪斜,半身不遂,抽搐痲挛等症的治疗。

随着野生动物保护的进一步加强,乌梢蛇的

**作者简介:** 刘晶晶,女,博士,助理研究员 研究方向:中药质量控制研究;张众谋,男,硕士 研究方向:中药质量控制研究。刘晶晶与张众谋是共同第一作者 \* **通讯作者:** 马双成,男,博士,研究员,博士生导师 研究方向:中药民族药质量控制和评价研究 Tel:(010)67095282;康帅,男,博士,副研究员 研究方向:中药鉴定与本草文献研究 Tel:(010)67095452

价格逐渐上涨,市场上出现了多种乌梢蛇的混淆品。特别是炮制后,皮上的花纹特征、颜色几近消失,难以辨认,而且其大小、形态特征与乌梢蛇也有所差异,造成其性状鉴别困难<sup>[3]</sup>。麝香风湿胶囊、乌蛇止痒丸等中成药中都含有乌梢蛇成分,2020年版《中国药典》对其检查为显微鉴别,在生物学上物种的遗传表现型,不仅受到遗传因素的影响,而且与生物体的生长发育阶段、环境条件等有着密切的关系,具有很大的变异性和可塑性,且受鉴定者主观判断影响较大,在复方药味复杂、药材显微形态多被破坏的情况下,显微鉴定多受限制<sup>[4]</sup>。这给临床用药的安全及药物的质量和疗效带来潜在危险。

色谱技术以及生物技术在中成药方面应用使得乌梢蛇药材鉴定技术得到了有效的发展,近年来DNA分子鉴别技术快速发展,位点特异性PCR、DNA测序等技术多用于动物类药材的鉴别,多种动物药材已建立分子鉴别方法。2020年版《中国药典》记载了

乌梢蛇药材12S序列的特异性鉴别,但中成药中组成药物DNA多发生严重降解,这些鉴别技术不适用于含有乌梢蛇的中成药。中成药的组成复杂,制剂形式多样、原药材入药形式多样,导致其质量控制难度大,掺伪、混伪现象也更为严重,如何鉴定成药中原料药材来源一直是中药鉴定领域中的难点问题<sup>[5-7]</sup>。目前对于乌梢蛇中成药分子鉴定的相关研究还未见报道,因此有必要建立乌梢蛇中成药的分子鉴别体系。

## 1 实验材料、仪器与试剂

### 1.1 实验材料

乌梢蛇标准品来源于中国食品药品检定研究院,11批次中成药于药店购买,蛇类药材共15批,于中国食品药品检定研究院标本馆和药材市场购买。样品均经中国食品药品检定研究院康帅副研究员鉴定。中成药样品信息见表1,蛇类药材样品信息见表2。

表1 乌梢蛇中成药样品信息表

Tab. 1 Information of Chinese patent medicine samples containing *Zaocys dhumnades*

No	Sample name	Batch number	Dosage form	Prescription medicine quantity
1	Shexiang Fengshi Capsule	200605	capsule	7
2	Huashe Jieyang Capsule	200601	capsule	16
3	Huashe Jieyang Tablet	20200903	tablet	16
4	Eucommia Zhuanggu Capsule	200101	capsule	23
5	Cold Dispelling and Collateral Activating Pill	19013359	Big honey pill	12
6	Bai Dian Feng Pill	201001	Concentrated water pill	15
7	Fengshi Antai Tablets	020200704	tablet	25
8	Green General Pill	201101	water pill	1
9	Bu Jin Patch	200902	tablet	18
10	Black Snake Antipruritic Pill	201002	Concentrated water pill	11
11	Fengshi Gospel Pill	200901	Big honey pill	19

表2 蛇类药材样品信息表

Tab. 2 Sample information of snake medicinal materials

No.	Latin name	Genebank No.
1-5	<i>Zaocys dhumnades</i>	AF236676
6	<i>Ptyas mucosus</i>	GQ225675
7	<i>Deinagkistrodon acutus</i>	AF236686
8	<i>Bungarus parvus</i>	AF236684
9	<i>Vipera russelli siamensis</i>	Self detection sequence
10	<i>Elaphe taeniura</i>	AF233940
11	<i>Rhabdophis tigrinus</i>	AF236679
12	<i>Dinodon</i>	AF233939
13	<i>Gloydius brevicaudus</i>	JX661212
14	<i>Elaphe carinata</i>	AF236674
15	<i>Elapheruffidorsfa</i>	AF236675

### 1.2 实验仪器与试剂

1.2.1 实验仪器 组织研磨机(德国莱驰公司);微量分光光度计,NanoDrop One(赛默飞世尔科技中国有限公司);PCR仪(ProFlex 3×32 赛默飞世尔科技中国有限公司);PCR仪(T 100 Thermal Cycler 美国BIO-RAD);水平电泳槽,BIO-RAD(北京市六一仪器厂);紫外凝胶成像分析仪,AmpGene(北京鼎永科技有限公司);DKB-2006型低温恒温槽(上海精宏实验设备有限公司);5810R型台式高速冷冻离心机(艾本德国际贸易有限公司);P7021TP-6型号微波炉(佛山市顺德区格兰仕微波炉电器有限公司);SQP型电子天平(赛多利斯科学仪器有限公司);VM-02U型涡旋

混匀器, (海门区其林贝尔仪器制造有限公司)。

**1.2.2 实验试剂** 血液/细胞/组织基因组 DNA 提取试剂盒(北京天根生化科技有限公司); 2 × Taq Plus Master Mix (南京诺唯赞生物科技有限公司); Premix Taq[宝生物工程(大连)有限公司]; GelRed (北京百泰克生物技术有限公司); 100 ~ 1 500 bp DNA Marker、琼脂糖[生工生物工程(上海)股份有限公司]。基因检测通用引物序列引物 F3: GGCTGTA-AAAAGCCATAAGCCACACTAA; R1: CGGTTATTAGACAGGCTCCTC, 特异引物的序列为 F2: AACTAAC-CACCACCTAATAAG; T2: CAGGCTCCTCTAGGTTGT-TATGGGTACCG, 以及荧光定量所用引物 F: CGGGCT-GTAAAAGCCAT; R: GGCATAGTAAGGTATCTAATC; FAM5'-CCACACTAACCACCACCTAATAAG-3' TAMRA-N。

表3 通用引物及特异性引物信息

Tab.3 Universal primer and specific primer information

Primer name	Primer sequence(5'→3')	PCR Reaction conditions
F3	GGCTGTA AAAAGCCATAAGCCACACTAA	94 °C 5 min; 94 °C 30 s
R1	CGGTTATTAGACAGGCTCCTC	50 °C 30 s, 35 c; 72 °C 5 min
F2	AACTAAC CACCACCTAATAAG	95 °C 5 min; 94 °C 30 s
T2	CAGGCTCCTCTAGGTTGT TATGGGTACCG	67 °C 45 s, 30 c; 72 °C 5 min
Forward primer	CGGGCTGTAAAAGCCAT	94 °C 3 min
Reverse primer	GGCATAGTAAGGTATCTAATC	94 °C 30 s, 60 °C 30 s, 40 c
Probe	FAM5'-CCACACTAACCACCACCTAATAAG-3'TAMRA-N	

## 2.2 总 DNA 提取

**2.2.1 蛇类药材总 DNA 提取** 用镊子夹取适量蛇类药材中肌肉组织, 用组织研磨机打成粉末。称取 50 mg 粉末, 置 2 mL 离心管中, 加入 500 μL PE 缓冲液和 20 μL Proteinase K (20 mg · mL<sup>-1</sup>) 并震荡至彻底悬浮, 56 °C 水浴过夜。加入 500 μL 的苯酚(Tris 饱和)-三氯甲烷-异戊醇(25:24:1)充分混匀, 常温, 在 12 000 r · min<sup>-1</sup> 离心 5 min; 重复一次。将上清液转移至新的 2 mL 离心管中, 加入 0.7 倍体积异丙醇(-20 °C)混匀, 在常温、12 000 r · min<sup>-1</sup> 离心 5 min, 弃上清液。加入 1 mL 体积分数 70% 乙醇溶液洗涤 DNA 沉淀, 室温放置 5 min, 弃上清液, 重复一次, 吹干。在 DNA 沉淀中加入 50 μL CE Buffer (pH=9.0) 溶解并收集 DNA。DNA 样本在 -20 °C 条件下保存, 备用。

**2.2.2 中成药总 DNA 提取** 散寒活络丸和风湿福音丸为大蜜丸, 需前处理。称取 1 g 样品, 0.14 mol · L<sup>-1</sup> 氯化钠溶液研磨, 加入 PVP, 完全研磨后将研钵中的溶液装进 50 mL 离心管。在 8 000 r · min<sup>-1</sup> 离心 5 min 后弃上清。用体积分数

[生工生物工程(上海)股份有限公司合成]。

## 2 方法

### 2.1 引物设计

经查询 2020 年版《中国药典》乌梢蛇鉴别方法, 从美国国家生物技术信息中心(NCBI)数据库中下载乌梢蛇及其他伪品蛇的 12S 序列, 将所有序列利用 Clustal W 进行多序列比对分析, 寻找乌梢蛇序列与其他伪品蛇序列之间的差异位点, 用 MEGA 软件比对出保守序列, 基于这些 SNP 位点利用引物设计软件 Oligo7 和 NCBI 的 Primer - Blast, 设计出能够用于乌梢蛇真伪鉴别多个特异性位点的通用、特异性引物, 实时荧光 PCR 检测引物和探针, 相关 PCR 反应条件见表 3。

70% 乙醇溶液浸泡沉淀, -20 °C 放置 12 h。除大蜜丸外, 其他中成药用组织研磨机打磨成粉。称取粉末 50 mg, 采用血液/细胞/组织基因组 DNA 抽提试剂盒, 按说明书进行 DNA 提取。DNA 样本在 -20 °C 条件下保存, 备用。

### 2.3 乌梢蛇药材特异性 PCR 建立

**2.3.1 PCR 条件优化** 对蛇类药材 PCR 反应条件优化。PCR 反应体系 25 μL, 包括 2 × Taq Plus Master Mix 12.5 μL, 上下游引物各 1 μL (10 μmol), DNA 模板 1 μL, ddH<sub>2</sub>O 9.5 μL, 引物及信息见表 3。利用乌梢蛇特异性引物 F2、T2 进行 PCR 反应并且通过考察以下因素来优化 PCR 反应, 具体考察参数见表 4。

表4 聚合酶链式反应(PCR)特异性优化因素与变量

Tab.4 PCR specific optimization factors and variables

Investigation contents	Review parameter gradient
Annealing temperature/°C	57, 59, 61, 63, 65, 67, 69
Number of cycles	25, 30, 35
Amount of DNA template/ng · μL <sup>-1</sup>	1, 10, 30, 60, 120, 300, 500
Annealing time/s	25, 30, 35

**2.3.2 方法耐受性考察** 分别使用 Life Proflex 3 × 32 PCR 扩增仪、T 100 Thermal Cycle PCR 扩增仪和 BGI 2 × Super PCR Mix、2 × Taq Plus Master Mix 对优化后最佳的乌梢蛇特异性 PCR 方法进行耐受性考察。

**2.3.3 方法适用性考察** 使用最终优化的乌梢蛇特异性 PCR 鉴别方法对表 2 收集的 15 批样品进行乌梢蛇特异性 PCR 鉴别方法的适用性检测。

#### 2.4 荧光定量 PCR 反应条件的确立

**2.4.1 荧光定量 PCR 因素考察** 以表 2 中蛇类药材为 DNA 模板,进行荧光定量 PCR 并且通过考察以下因素来优化 PCR 反应,考察参数见表 5。

表 5 荧光定量 PCR 优化因素与变量

Tab. 5 Optimization factors and variables of fluorescence quantitative PCR

Investigation contents	Review parameter gradient
Annealing temperature/°C	55, 60, 61, 62, 63, 64
Annealing time/s	5, 15, 30
Amount of DNA template/ng · μL <sup>-1</sup>	1 × 10 <sup>-6</sup> , 1 × 10 <sup>-5</sup> , 1 × 10 <sup>-4</sup> , 1 × 10 <sup>-3</sup> , 1 × 10 <sup>-2</sup> , 1 × 10 <sup>-1</sup> , 1, 10, 100

**2.4.2 药材方法适用性考察** 使用最终优化的乌梢蛇荧光定量 PCR 鉴别方法对表 2 收集的 15 批样品进行乌梢蛇荧光定量 PCR 鉴别方法的适用性检测。

**2.4.3 乌梢蛇中成药荧光定量 PCR 检测** 采用确立的荧光定量 PCR 方法扩增表 1 中含乌梢蛇组成的中成药总 DNA, PCR 反应体系 20 μL: PCR Mix 10 μL, 上、下游引物及探针(浓度 10 μmol · L<sup>-1</sup>) 各 0.4 μL, DNA 模板量 1 μL, DNF 2 μL, ddH<sub>2</sub>O 5.8 μL。

### 3 结果与分析

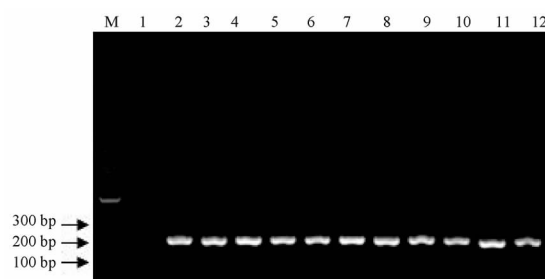
#### 3.1 通用引物 PCR 扩增样品 DNA

用表 3 通用引物 F3、R1 及扩增程序对所有乌梢蛇及其为伪品样品进行 PCR 扩增,均在约 200 bp 处扩增出条带,见图 1,所制备的样品 DNA 质量达到 PCR 反应标准。

#### 3.2 乌梢蛇特异性 PCR 结果

用表 3 通用引物 F3、R1 及扩增程序对含乌梢蛇中成药样品总 DNA 进行扩增,用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物,在凝胶成像系统中分析,确认电泳条带,结果样品在约 200 bp 处均可见条带,空白对照无条带,说明所提取的基因适用于后续实验。样品 2、3、7、12 分别为麝香风湿胶囊、花蛇解痒胶

囊、青大将丸、风湿福音丸,处方药材数量分别为 7、16、1、19 味。除青大将丸外,三种中成药处方太多,乌梢蛇含量占比低,所以电泳条带偏暗,青大将丸处方只有一种,但电泳条带偏暗。对其切胶送测序,通过 NCBI 的 blast 比对序列,测序结果显示青大将丸检测为灰鼠蛇,其余中成药 DNA 均为乌梢蛇,见图 2。

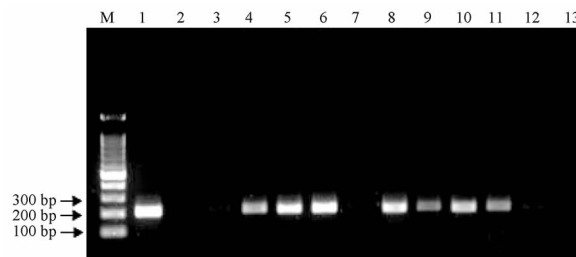


M - Maker(从上到下依次为 1 500、1 000、900、800、700、600、500、400、300、200、100 bp); 1 - 空白; 2 - 红点锦蛇; 3 - 王锦蛇; 4 - 短尾蝮蛇; 5 - 赤链蛇; 6 - 虎斑颈槽蛇; 7 - 黑莓锦蛇; 8 - 仓木蝮蛇; 9 - 金钱白花蛇; 10 - 蕲蛇; 11 - 滑鼠蛇; 12 - 乌梢蛇标品。

M - Maker( The molecular weight from top to bottom is 1 500、1 000、900、800、700、600、500、400、300、200、100 bp)。1 - Blank; 2 - *Elaphe rufidorsis*; 3 - *Elaphe carinata*; 4 - *Gloydius brevicaudus*; 5 - *Dinodon*; 6 - *Rhabdophis tigrinus*; 7 - *Elaphe taeniura*; 8 - *Vipera russelli siamensis*; 9 - *Bungarus parvus*; 10 - *Deinagkistrodon acutus*; 11 - *Ptyas mucosus*; 12 - *Zaocys dhumnades* Standard.

图 1 12S 通用引物 PCR 扩增凝胶电泳图

Fig. 1 12S Universal primer PCR amplification gel electrophoresis



M - Maker(从上到下依次为 1 500、1 000、900、800、700、600、500、400、300、200、100 bp); 1 - 乌梢蛇标品; 2 - 麝香风湿胶囊; 3 - 花蛇解痒胶囊; 4 - 花蛇解痒片; 5 - 杜仲壮骨胶囊; 6 - 散寒活络丸; 7 - 白癩风丸; 8 - 风湿安泰片; 9 - 青大将丸; 10 - 补金片; 11 - 乌蛇止痒丸; 12 - 风湿福音丸; 13 - 空白。

M - Maker( The molecular weight from top to bottom is 1 500、1 000、900、800、700、600、500、400、300、200、100 bp); 1 - *Zaocys dhumnades* Standard; 2 - Shexiang Fengshi Capsule; 3 - Huashe Jieyang Tablet; 4 - Huashe Jieyang Tablet; 5 - Eucommia Zhuanggu Capsule; 6 - Cold Dispelling and Collateral Activating Pill; 7 - Bai Dian Feng Pill; 8 - Fengshi Antai Tablets; 9 - Green General Pill; 10 - Bu Jin Patch; 11 - Black Snake Antipruritic Pill; 12 - Fengshi Gospel Pill; 13 - blank.

图 2 含乌梢蛇成分中成药总 DNA 通用引物 PCR 产物电泳检测图

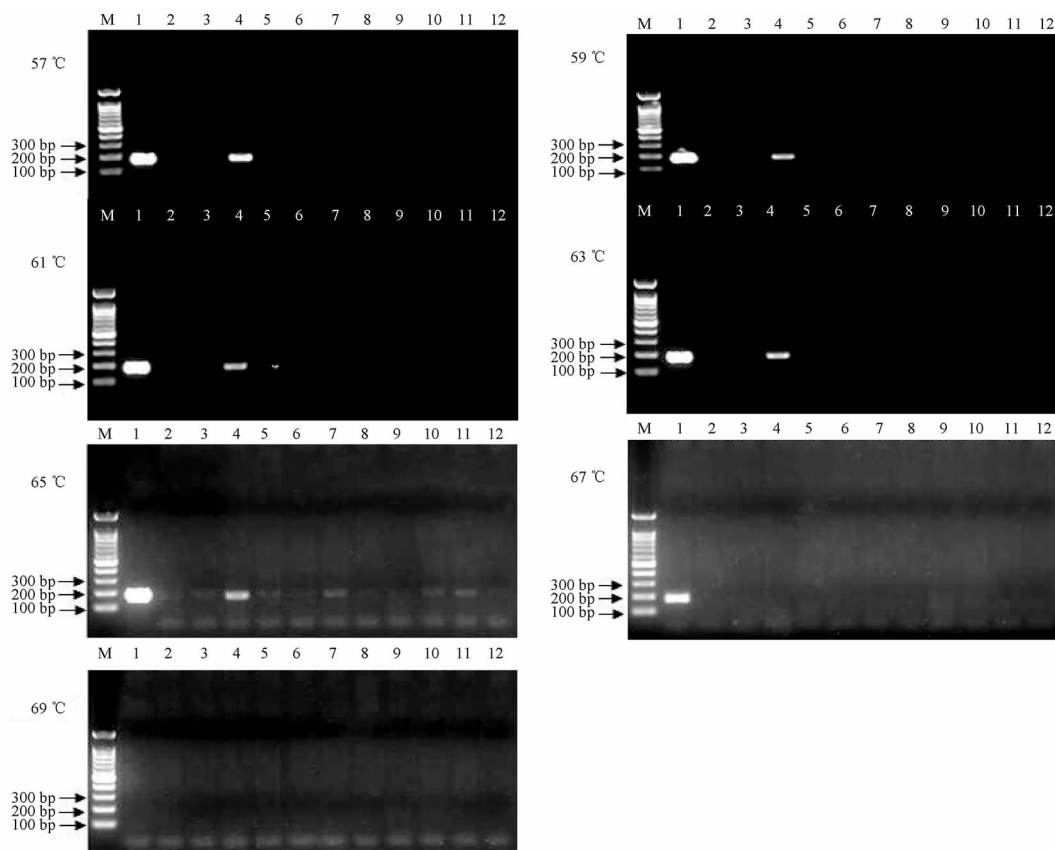
Fig. 2 Electrophoretic detection of total DNA of Chinese patent medicine containing *Zaocys dhumnades* by universal primer PCR products

**3.2.1 乌梢蛇特异性 PCR 扩增条件优化结果** 当退火温度为 57 ~ 65 °C 时,除乌梢蛇有条带外,其他样品也存在条带,出现非特异扩增。当退火温度为 67 °C 时乌梢蛇能在 200 bp 左右扩增出单一条带,其他伪品蛇及空白对照均无条带。当退火温度上升为 69 °C 时均无扩增条带。因此选用 67 °C 为最佳退火温度,见图 3。

在退火温度设置为 67 °C 时,循环次数 25、30、35 均可扩增出条带,循环次数为 25 时,乌梢蛇扩增

条带亮度相对于其他两个结果较弱,30 个循环和 35 个循环结果相似,考虑在保证实验稳定性的前提下提高检测的效率,因此选用 30 个循环为最佳循环次数,见图 4。

按 67 °C,30 循环,退火时间为 25、30、35 s 均能扩增出条带,退火时间为 30 s 时,乌梢蛇扩增条带亮度相对于其他两个结果较亮,退火时间为 25 s 相对于退火时间 35 s 扩增条带较暗,因此选用扩增最好的退火时间 30 s,见图 5。



M - Maker(上到下依次为 1 500、1 000、900、800、700、600、500、400、300、200、100 bp); 1 - 乌梢蛇标品; 2 - 滑鼠蛇; 3 - 蕲蛇; 4 - 金钱白花蛇; 5 - 仓木蝮蛇; 6 - 黑莓锦蛇; 7 - 虎斑颈槽蛇; 8 - 赤链蛇; 9 - 短尾蝮蛇; 10 - 王锦蛇; 11 - 红点锦蛇; 12 - 空白。

M - Maker(The molecular weight from top to bottom is 1 500、1 000、900、800、700、600、500、400、300、200、100 bp); 1 - *Zaocys dhumnades* Standard; 2 - *Ptyas mucosus*; 3 - *Deinagkistrodon acutus*; 4 - *Bungarus parvus*; 5 - *Vipera russelli siamensis*; 6 - *Elaphe taeniura*; 7 - *Rhabdophis tigrinus*; 8 - *Dinodon*; 9 - *Gloydius brevicaudus*; 10 - *Elaphe carinata*; 11 - *Elaphe rufidorsis*; 12 - blank.

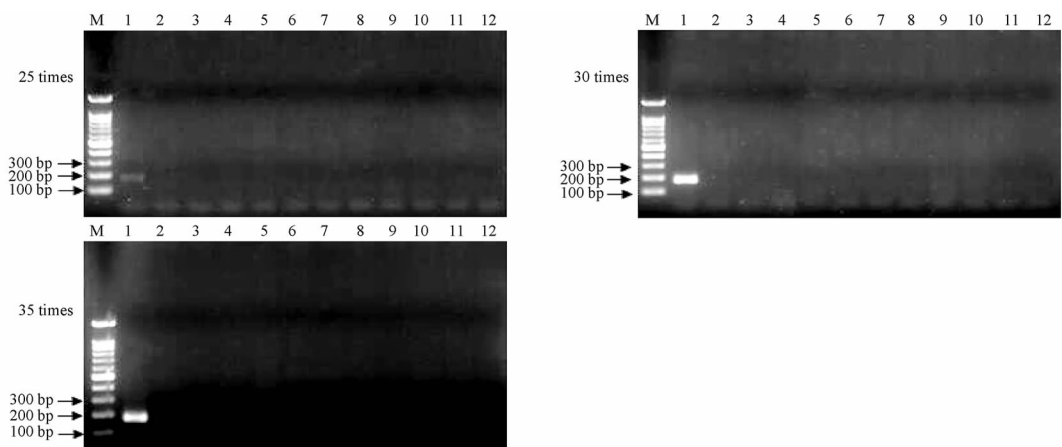
**图 3** 不同退火温度的 PCR 扩增凝胶电泳图

**Fig. 3** Gel electrophoresis of PCR amplification for annealing temperature investigation

按上述实验方法,乌梢蛇标品 DNA 样品 DNA 模板量为:1、10、30、60、120、300、500 ng · μL 均可以扩增出条带,空白对照未扩增出条带,见图 6。

**3.2.2 方法耐受性考察** 选用乌梢蛇、滑鼠蛇、蕲蛇、金钱白花蛇、仓木蝮蛇、黑眉锦蛇、虎斑颈槽蛇、赤链蛇、短尾蝮蛇、王锦蛇、红点锦蛇的 DNA 各一批

次,用 2 种不同保真度的 Taq DNA 聚合酶扩增,乌梢蛇在 200 bp 左右出现稳定目的的条带,其他样品及空白对照均未产生条带,见图 7。分别用 Life Proflex 3 × 32 以及 100 Thermal Cycler 两种 PCR 扩增仪进行 PCR 扩增,结果显示 2 种仪器得到结果相似,乌梢蛇扩增出目的条带而其他样品及空白无条带,见图 8。

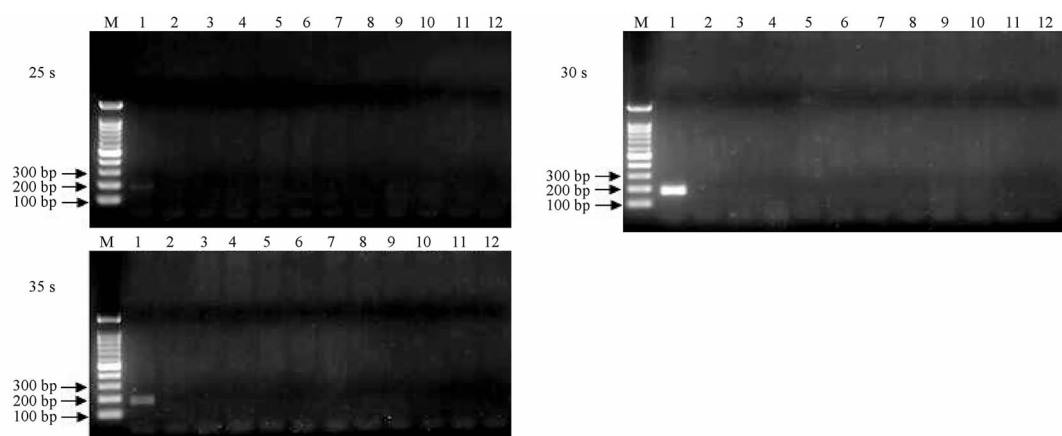


同图3。

Same as Figure 3.

图4 退火温度67℃下不同循环次数 PCR 扩增凝胶电泳图

Fig. 4 PCR amplification gel electrophoresis diagram for cycle number inspection

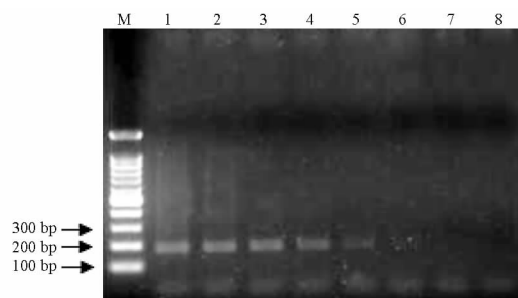


同图3。

Same as Figure 3.

图5 67℃,循环次数30条件下,不同退火时间的 PCR 扩增凝胶电泳图

Fig. 5 Gel electrophoresis of PCR amplification for annealing time inspection



M - Maker (从上到下依次为 1 500、1 000、900、800、700、600、500、400、300、200、100 bp)；1 ~ 7 - 乌梢蛇 DNA 模板量 (500、300、120、60、30、10、1 ng · μL<sup>-1</sup>)；8 - 空白对照。

M - Maker (molecular weight from top to bottom is 1 500, 1 000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 bp)；1 - 7 - represents the DNA concentration of *Zaocys dhumnades* (500, 300, 120, 60, 30, 10, 1 ng · μL<sup>-1</sup>)；8 - blank.

图6 DNA 模板量考察的 PCR 扩增凝胶电泳图

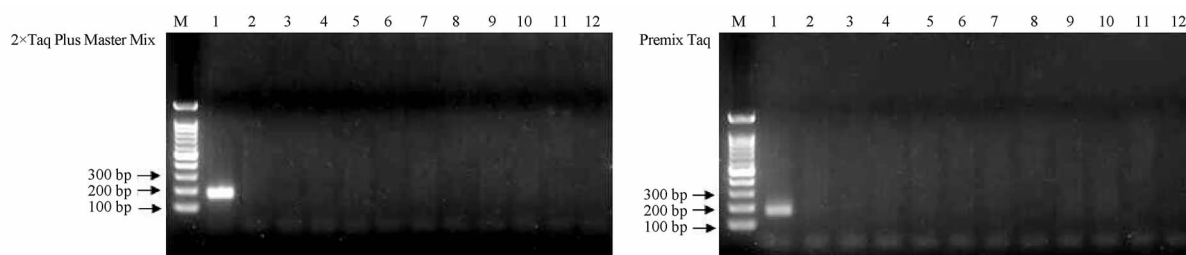
Fig. 6 Gel electrophoresis of PCR amplification for DNA template amount investigation

### 3.3 乌梢蛇药材特异性 PCR 鉴别方法建立

按 PCR 反应程序:95℃ 预变性 5 min;94℃ 变性 30 s;退火温度 67℃ 45 s,30 个循环;72℃ 延伸 5 min,对 15 批样品进行扩增,乌梢蛇可在约 187 bp 处扩增出单一条带,其他伪品及空白、无条带产生,见图 9。

### 3.4 荧光定量 PCR 扩增条件优化结果

由扩增曲线可以看出随温度升高特异性逐渐增强。当退火温度为 55℃ 时,有非特异扩增;当退火温度为 60℃ 时,伪品蛇和空白无法检出,特异性好,而且曲线平滑,基线平直,拐点清晰;当退火温度为 61℃ 时,无非特异扩增,但此时的扩增曲线的基线出现波动,没有 60℃ 平直。当退火温度为 62℃、63℃、64℃ 时,扩增曲线更加曲折。因此最终确定退火温度为 60℃,见图 10。



同图3。

Same as Figure 3.

图7 不同酶考察的PCR扩增凝胶电泳图

Fig. 7 PCR amplification gel electrophoresis diagram of different enzymes

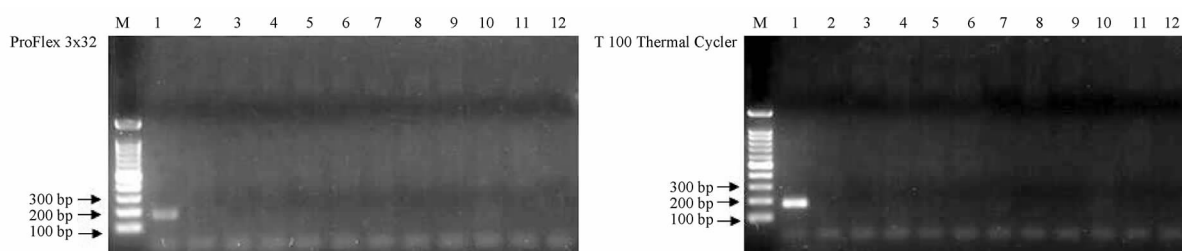
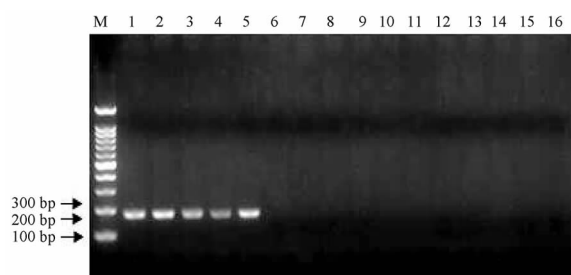


图8 不同仪器的PCR扩增凝胶电泳图

Fig. 8 PCR amplification gel electrophoresis of different instruments



M - Maker (从上到下依次为 1 500、1 000、900、800、700、600、500、400、300、200、100 bp); 1 - 乌梢蛇标品; 2 - 5 - 乌梢蛇; 6 - 滑鼠蛇; 7 - 蕲蛇; 8 - 金钱白花蛇; 9 - 仓木蝮蛇; 10 - 黑莓锦蛇; 11 - 虎斑颈槽蛇; 12 - 赤链蛇; 13 - 短尾蝮蛇; 14 - 王锦蛇; 15 - 红点锦蛇; 16 - 空白。

M - Maker (The molecular weight from top to bottom is 1500, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 bp); 1 - *Zaocys dhumnades* Standard; 2 - 5 - *Zaocys dhumnades*; 6 - *Ptyas mucosus*; 7 - *Deinagkistrodon acutus*; 8 - *Bungarus parvus*; 9 - *Vipera russelli siamensis*; 10 - *Elaphe taeniura*; 11 - *Rhabdophis tigrinus*; 12 - *Dinodon*; 13 - *Gloydus brevicaudus*; 14 - *Elaphe carinata*; 15 - *Elaphe ruftordsi*; 16 - blank.

图9 特异性引物PCR扩增凝胶电泳图

Fig. 9 PCR amplification gel electrophoresis of specific primer

退火温度为 60 °C 时,退火时间 5、15、35 s 显示乌梢蛇均能扩增,退火时间为 30 s 时,乌梢蛇扩增图线相对于其他两个较好,同时退火时间过短会影响检出限。因此选择退火时间为 30 s,见图 11。

在上述条件下,将乌梢蛇标品 DNA 从 100 ng · μL<sup>-1</sup> 梯度稀释到 1 × 10<sup>-6</sup> ng · μL<sup>-1</sup>, 分别

为 100、10、1、1 × 10<sup>-1</sup>、1 × 10<sup>-2</sup>、1 × 10<sup>-3</sup>、1 × 10<sup>-4</sup>、1 × 10<sup>-5</sup>、1 × 10<sup>-6</sup> ng · μL<sup>-1</sup>, 荧光定量 PCR 检出限为 1 × 10<sup>-3</sup> ng · μL<sup>-1</sup>, 见图 12。

### 3.5 乌梢蛇荧光定量 PCR 鉴别方法建立

按最终建立的乌梢蛇鉴定方法,PCR 的反应程序为:95 °C 预变性 3 min;94 °C 变性 30 s;退火温度 60 °C 30 s,40 个循环。对 15 批样品进行扩增,乌梢蛇标品及其正品均能出现扩增曲线,伪品蛇均未出现扩增,见图 13。

### 3.6 含乌梢蛇中成药荧光定量 PCR 检测

对含乌梢蛇的中成药 DNA 进行荧光定量 PCR 扩增,除青大将丸外,其余中成药都能进行扩增,说明除青大将丸以外,十种中成药中加入了乌梢蛇成分。并且根据 3.1 项下 PCR 扩增结果测序显示,青大将丸 DNA 检测结果为灰鼠蛇,不应在本法下扩增出。因此本实验方法适用于鉴别中成药中的乌梢蛇药材,见图 14。

## 4 讨论

在本实验研究中发现,DNA 提取质量对分子鉴定实验至关重要。尤其是中成药中包含药材味数多,且含有的药材量不同,甚至有些含量非常少,使 DNA 提取更加困难。本实验针对剂型为水蜜丸的中成药,如散寒活络丸和风湿福音丸,在 DNA 提取

时进行了使用盐、乙醇等对 DNA 进行溶出等前处理,并对所有样品进行 SDS 法和血液/细胞/组织基因组 DNA 抽提试剂盒提取中成药 DNA 效果进行对比,试剂盒耗时相对较短,且所提取的 DNA 质量良

好。综合考虑,中成药选取相对好用的 DNA 抽提试剂盒法进行实验。实验发现用试剂盒提取的乌梢蛇、仓木蝮蛇 DNA 浓度偏低,不能达到所需统一标准,所以蛇类药材样品均采用 SDS 提取法提取。

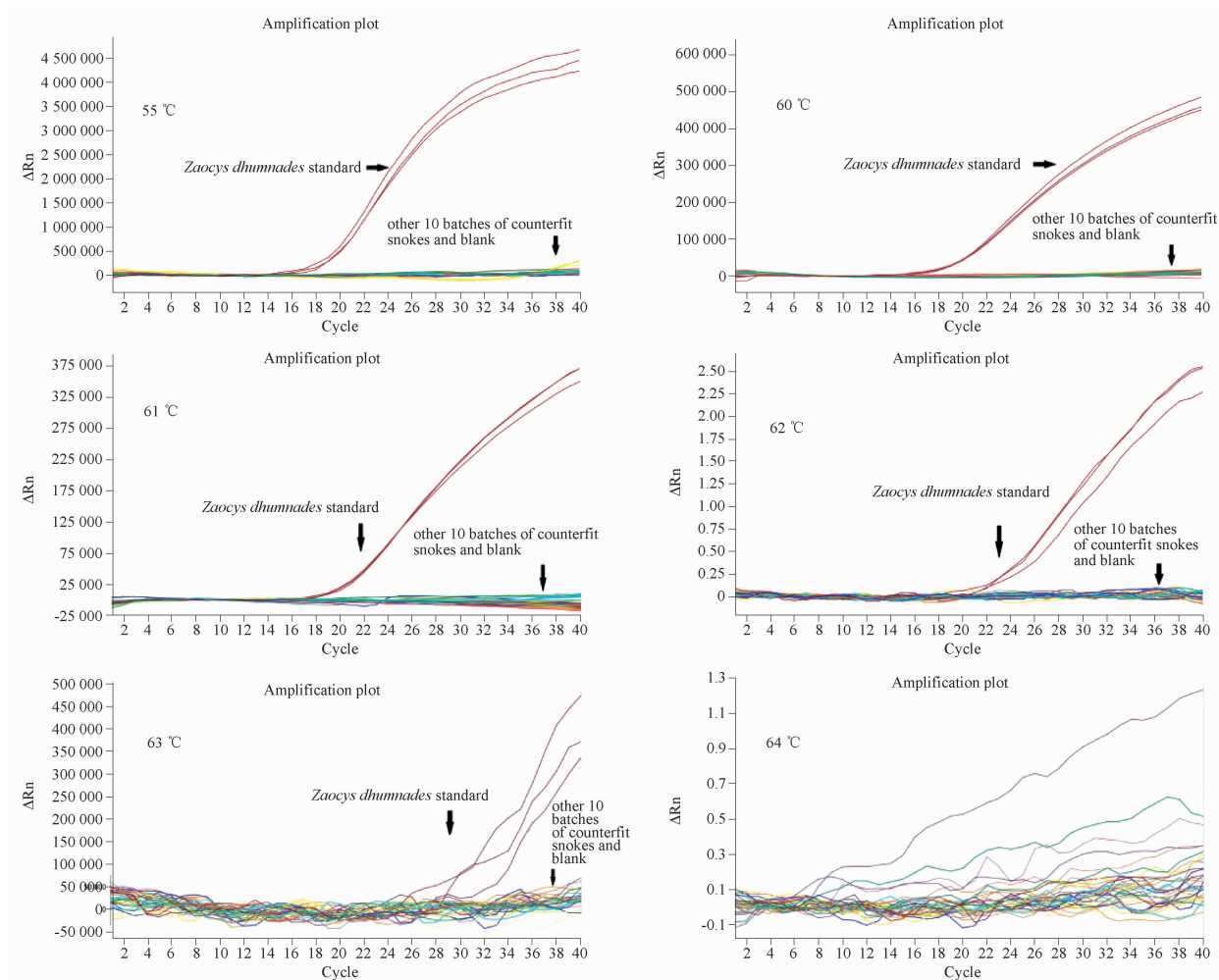


图 10 不同退火温度下乌梢蛇特异性扩增图谱

Fig. 10 Specific amplification map of *Zaocys dhumnades*

乌梢蛇药材经过饮片炮制和中成药生产加工后, DNA 多发生严重降解,这一基因片段特点使得《中国药典》和文献中鉴定方法无法满足中成药的质量检测。需要设计适用于较短片段的特异性引物进行 PCR 扩增,以达到鉴别中成药中乌梢蛇药材的目的。普通 PCR 鉴别法灵敏度低,对于深加工及中成药类 DNA 含量低的样品,难以得到良好结果。本试验前期采用普通 PCR 方法建立了乌梢蛇药材分子鉴定方法。但是该方法在中成药中鉴定结果并不理想。原因可能是普通 PCR 检测灵敏度较差,检测范围小。而且中成药中蛇类药材大多投料量较少,导致中成药的总 DNA 中乌梢蛇药材 DNA 含量很低,低于普通

PCR 仪的检测下限,导致没有扩增出条带。

荧光定量 PCR 具有高灵敏度、高特异性和准确度高优点,可以弥补中成药中 DNA 含量少的缺陷。Chen 等<sup>[8]</sup>通过对经典 PCR 技术方法进行优化,将 PCR 技术与荧光检测技术结合应用到蛇类药材真伪鉴别。因此,实验后期选择荧光定量 PCR 作为鉴别方法。从灵敏度试验中可以看出该方法在模板量  $1 \times 10^{-3} \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  DNA 含量时仍具有良好的重复性,检测下限低,检测灵敏度高。整个实验过程全部在闭管条件下完成,减少了污染几率;实验结果实时显示,节省时间。本实验中成药的鉴定结果显示:除青大丸外,其余十种中成药均出现了扩增

曲线。这与前期使用通用引物对青大将丸电泳结果切胶测序结果一致,投料为灰鼠蛇,其余中成药

DNA 均为乌梢蛇,两次实验结果相互佐证,证明该方法适用于含乌梢蛇的中成药鉴别。

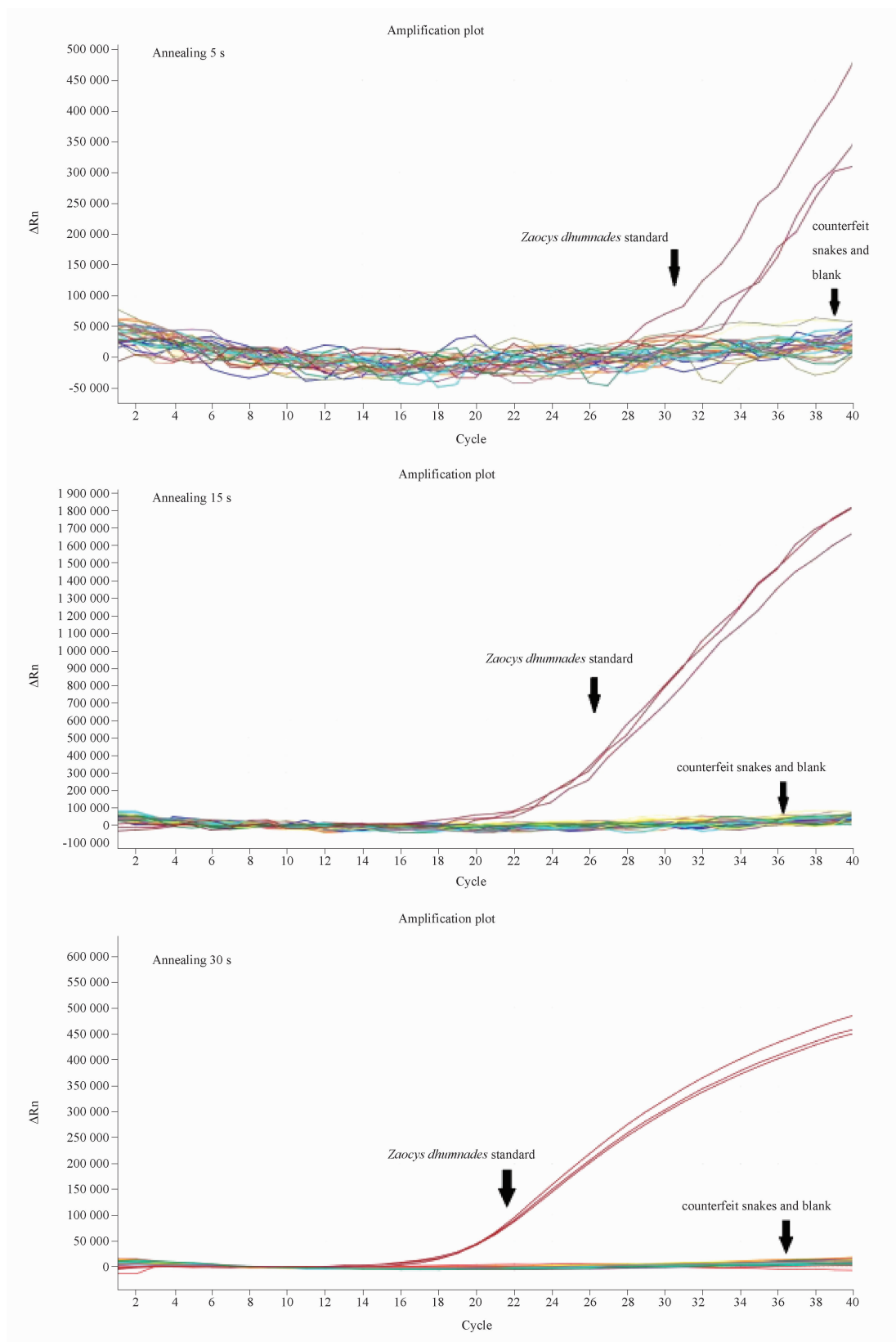


图 11 荧光定量 PCR 退火时间考察

Fig. 11 Investigation on annealing time of fluorescent quantitative PCR

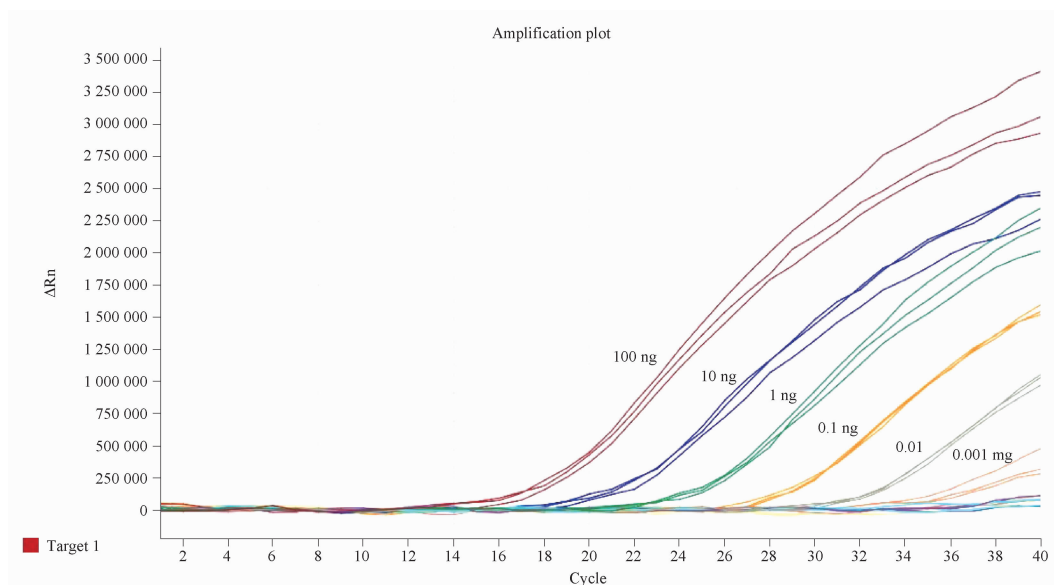


图 12 实时荧光 PCR 灵敏度试验结果

Fig. 12 Results of real-time fluorescent PCR sensitivity test

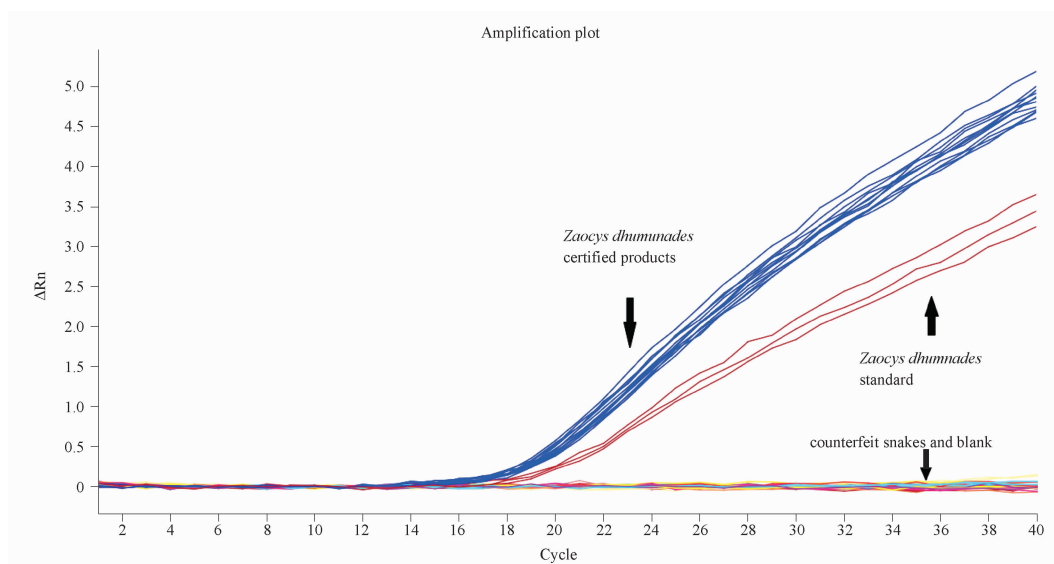


图 13 荧光定量 PCR 扩增曲线

Fig. 13 Amplification curve of fluorescent quantitative PCR

中药鉴定手段和方法随着化学、生物学、计算机学等学科的发展不断更新提升,呈现出从主观经验鉴别到客观数据判断的发展历程<sup>[9]</sup>,《中国药典》中的传统显微鉴别,Xiong<sup>[10]</sup>采用薄层色谱对乌梢蛇进行鉴别;Li等<sup>[11]</sup>通过HPLC进行鉴别。近年来,随着生物学技术的快速发展,各种分子标记技术应用于乌梢蛇鉴别中<sup>[12]</sup>。唐晓晶等<sup>[13]</sup>利用线粒体12S rRNA基因序列鉴别乌梢蛇药材。Wang等<sup>[14]</sup>利用Cytb基因片段序列测定乌梢蛇药材及其混淆品和原动物。Yang等<sup>[15]</sup>通过荧光定量PCR与普通PCR的对比,发现荧光定量PCR更

加灵敏,适用于中成药,彰显出分子鉴定方法相比显微性状、化学法等其他鉴定方法具有更多优势。尤其从普通PCR过渡到荧光定量PCR,操作更加简捷,反应时间更加短,污染程度更小,具有发展潜力和优势。本实验通过乌梢蛇和其他伪品蛇DNA条形码中12S序列对比分析,设计乌梢蛇通用、特异性鉴别引物及荧光定量PCR鉴别引物、探针,建立乌梢蛇位点特异性PCR鉴别方法及乌梢蛇药材与中成药的荧光定量鉴别方法,为乌梢蛇药材及其中成药的真伪鉴别提供分子鉴定的科学依据。

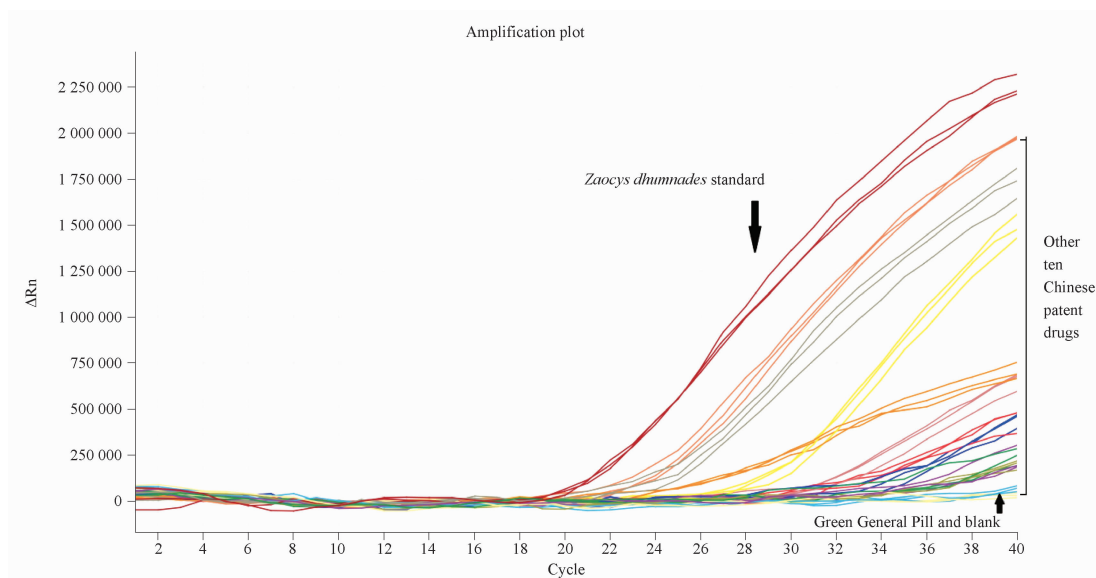


图 14 乌梢蛇中成药特异性扩增图谱

Fig. 14 Amplification map of Chinese patent medicine containing *Zaocys dhumnades*

## REFERENCES

- [ 1 ] CHENG J X, CHENG H Y, GUO D Y, *et al.* Suggestions on the revision of Latin names of some categories of medicinal materials in Chinese Pharmacopoeia 2020 ( Volume I ) [ J ]. *Chin J Mod Appl Pharm* ( 中国现代应用药学 ), 2021, 38 ( 5 ): 531-536.
- [ 2 ] ZHU C X, XIE M, LI C, *et al.* A textual research on the herbal medicine of *Zaocys dhumnades* [ J ]. *Mod Chin Med* ( 中国现代中药 ), 2018, 20 ( 12 ): 573-1578.
- [ 3 ] SONG X J. Identification of animal *Zaocys dhumnades* [ J ]. *Li Shizhen Tradit Chin Med* ( 时珍国医国药 ), 2012, 23 ( 7 ): 1824-1826.
- [ 4 ] JU K, ZHANG X Y, HU Y F, *et al.* Study on the micro character identification of ground beetle worm and its adulterant [ J ]. *Res Dev Nat Prod* ( 天然产物研究与开发 ), 2019, 31 ( 9 ): 1608-1616.
- [ 5 ] CHEN R, WU C J, DENG Y, *et al.* Application and research progress of DNA molecular identification technology in the identification of authenticity of Chinese patent medicines [ J ]. *Tradit Chin Med Clin Med* ( 中药与临床 ), 2016, 7 ( 2 ): 83-86
- [ 6 ] CUI ZH, LONG P, WANG Y L, *et al.* Application and prospect of DNA molecular marker technology in identification of Chinese patent medicine [ J ]. *Tradit Chin Med* ( 中药材 ), 2015 ( 1 ): 188-192.
- [ 7 ] GOU H, WANG Y W, ZHENG Q, *et al.* DNA extraction and molecular identification of Chinese patent medicine containing *angelica sinensis* [ J ]. *Chin J Exp Tradit Med Form* ( 中国实验方剂学杂志 ), 2018, 24 ( 1 ): 44-50.
- [ 8 ] CHEN K, JIANG C, YUAN Y, *et al.* Application of rapid PCR method in the identification of snake medicines [ J ]. *China J Chin Mater Med* ( 中国中药杂志 ), 2014, 39 ( 19 ): 3673-3678.
- [ 9 ] CHEN S Q, YANG H, LIAN C L, *et al.* Specific PCR primer for identification of *Fritillaria ussuriensis* and its application: CN111826460A [ P ]. 2020.
- [ 10 ] XIONG X M, CAO J. Identification of *Zaocys dhumnades* in pure snake powder capsule by TLC [ J ]. *Serpentine* ( 蛇志 ), 1998, 10 ( 4 ): 5-6.
- [ 11 ] LI F, ZHANG Y, ZHANG Z Q, *et al.* Study on HPLC fingerprint of *Zaocys dhumnades* [ J ]. *Liaoning J Tradit Chin Med* ( 辽宁中医杂志 ), 2015, 42 ( 10 ): 337-339.
- [ 12 ] LI Z T, SUN J Y, ZHOU T T, *et al.* Development of *Zaocys dhumnades* ( Cantor ) DNA test kit and its application in quality inspection of commercial products [ J ]. *Chin Pharm J* ( 中国药理学杂志 ), 2017, 52 ( 9 ): 777-781.
- [ 13 ] TANG X J, FENG C Q, HUANG L Q, *et al.* Identification of *Zaocys dhumnades* and its adulterants by highly specific PCR [ J ]. *Chin J Pharm* ( 中国医药工业杂志 ), 2007 ( 5 ): 333-336.
- [ 14 ] WANG Y Q ZHOU KY, XU L S, *et al.* DNA sequence analysis and identification of *Zaocys dhumnades* and its adulterants [ J ]. *Chin J Pharm* ( 中国医药工业杂志 ) 1999, 34 ( 1 ): 68-72.
- [ 15 ] YANG B, ZHU D L, MA N, *et al.* Establishment of real-time fluorescent quantitative PCR method for *Zaocys dhumnades* and comparison with common PCR identification methods [ J ]. *Pharm Res* ( 药学研究 ) 2020, 39 ( 11 ): 636-640.

( 收稿日期:2022-12-23 )