浙龟甲的 PCR 鉴别研究

茅纯，郑娟，施思，王倩(杭州市食品药品检验研究院，杭州 310022)

摘要：目的 建立聚合酶链式反应(PCR)技术鉴别浙龟甲[来源为龟黄喉水龟 *Clemmys mutica* (Cantor)的背甲及腹甲]真伪的方法。**方法** 提取浙龟甲及其混淆品的基因组 DNA，从 NCBI 网站上检索黄喉水龟及其混淆品的线粒体基因，进行分析比对，根据黄喉水龟细胞色素 b(cytochrome b gene，Cytb)基因上的特异位点应用 Oligo 软件设计引物，对浙龟甲及其混淆品样本进行 PCR 扩增。**结果** 所设计的引物能特异性扩增黄喉水龟，扩增片段长度为 357 bp，能有效区分浙龟甲及其混淆品种。**结论** 建立的 PCR 技术鉴别浙龟甲方法，具有特异性高、方法简便快捷、实用性较强的特点，在快速准确鉴别浙龟甲方面具有良好的应用前景。

关键词：浙龟甲；黄喉水龟；线粒体 DNA；细胞色素 b；PCR
中图分类号：R282.73 **文献标志码：**B **文章编号：**1007-7693(2019)11-1363-04
DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2019.11.010
引用本文：茅纯, 郑娟, 施思, 等. 浙龟甲的 PCR 鉴别研究[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(11): 1363-1366.

Authentication of *Clemmys Mutica* (Cantor) by PCR

MAO Chun, ZHENG Juan, SHI Si, WANG Qian(*Hangzhou Institute for Food and Drug Control, Hangzhou 310022, China*)

ABSTRACT: OBJECTIVE To develop a new polymerase chain reaction(PCR) technology for identifying the authenticity of Zheguijia[the dorsal and abdominal carapaces of *Clemmys mutica* (Cantor)]. **METHODS** Extract genomic DNA from Zheguijia and its adulterants was extracted. A series of sequences from mtDNA of Zheguijia and its adulterants were downloaded from the GenBank for analysis and comparison. And the Oligo software was used to design a set of primers, according to the specific sites on Cytb genes of Zheguijia. PCR technology was performed out to amplify the specific fragment of Zheguijia and its adulterants. **RESULTS** The designed specific primers were only used to amplify the genuine products of Zheguijia and the amplified fragments were 357 bp, which could effectively distinguished Zheguijia and its adulterants. **CONCLUSION** The PCR assay proposed in this study can be used for the quality control of Zheguijia, which is specificity, sensitivity and applicability.
KEYWORDS: Zheguijia; *Clemmys mutica* (Cantor); mtDNA; cytochrome b gene; PCR

浙龟甲是《浙江省中药炮制规范》2015 年版中收载的 35 个分列品种之一，来源为黄缘闭壳龟 *Cuora flavomarginata* (Gray)、黄喉水龟 *Clemmys mutica* (Cantor)的背甲及腹甲；具有滋阴潜阳，益肾强骨，养血补心，固经止崩等功效[1]，临床用量很大。笔者通过走访调研发现，黄缘闭壳龟的养殖成活率较低，无法进行大规模养殖；市面上的黄缘闭壳龟基本作为宠物售卖，价格昂贵，药材无法形成商品，故本研究不将其作为研究对象。而黄喉水龟目前在浙江、江西、湖北等地均已形成规模化养殖，是药材市场上浙龟甲的主要基源。但市场上混淆品泛滥，不法商贩用价格更低廉的巴西龟(*Trachemys scripta*)、缅甸陆龟[*Indotestudo elongate* (Blyth)]、乌龟[*Chinemys reevesii* (Gray)]、马来闭壳龟[*Cuora amboinensis* (Daudin)]、中华花龟 [*Ocadia sinensis* (Gray)] 、鳄 龟 [*Chelydra serpentina* (Linnaeus)]等的龟甲作为浙龟甲售卖，以牟取暴利。现有浙龟甲的法定标准主要是经验鉴别，局限性较大，尤其对炮制品更是难以区分。

线粒体 DNA 作为核外遗传物质，具有结构稳定、编码效率高、进化快速、母系遗传严格的特点，且存在异质性、多态性、无组织特异性、不同区域进化速度存在差异，多应用于动物遗传进化分类等研究[2]。线粒体细胞色素 b(cytochrome b gene，Cytb)是 mtDNA 上结构和功能被了解得最为清楚的基因之一，由于其进化速度适中，适合用于研究种内到种间乃至更高分类阶段的系统发育关系，被广泛应用于动物源性中药材种内鉴别[3-4]。

作者简介：茅纯，男，工程师 Tel: 18868421000 E-mail: 18868421000@163.com

本实验根据黄喉水龟 Cytb 基因上的特异位点设计引物，建立有效区分浙龟甲及其混淆品的 PCR 鉴别方法。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Tissuelyser Ⅱ球磨仪、QIAxpert 微量核酸分析仪、QIAxcel 毛细管电泳仪均来自 Qiagen；1-13 台式离心机(Sigma)；Veriti PCR 仪(ABi)；Wide-mini subcell GT 电泳仪(Bio-rad)；GelDoc XR+凝胶成像仪(Bio-rad)。

1.2 试剂

核酸提取试剂盒(Qiagen，批号：157011332)；即用型 PCR 扩增试剂盒(上海生工生物工程有限公司，批号：D613KAC190)；琼脂糖(BIOWEST，批号：111860)；50×TAE 缓冲液(批号：D630KA5994)、引物、DNA Marker(批号：D509KA5546)、6×DNA 上样缓冲液(批号：13031957C)均来自上海生工生物工程有限公司；GelRed 核酸染料(Biotium，批号：13G0306)。

1.3 样品

龟甲(乌龟)对照药材(中国药品生物制品检定研究院，批号：121494-201403)、黄缘闭壳龟(腹甲)、马来闭壳龟(背甲)、缅甸陆龟(背甲)由杭州市食品药品检验研究院标本室提供，巴西龟、中华花龟、黄喉水龟、鳄龟、乌龟、鳖甲等样本采购自绍兴养殖场和杭州花鸟市场。本实验选取样本均经杭州市食品药品检验研究院中药天然药物中心刘宇文副主任中药师鉴定。

2 方法

2.1 核酸 DNA 提取

取供试品，用酒精棉球擦拭消毒，干燥，用球磨仪粉碎成细粉状。用核酸提取试剂盒提取样本的 DNA，用 QIAxpert 微量核酸分析仪测定 DNA 的纯度及浓度，将纯度符合要求且浓度达到 20 μg·mL^{-1} 的 DNA 溶液作为模板 DNA，–20 ℃保存备用。

2.2 引物的设计与扩增

2.2.1 引物设计 从 NCBI 网站(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/)上检索上述品种龟的线粒体基因，进行多序列比对分析，发现黄喉水龟的 Cytb 基因中有特异性位点，针对该特异性位点采用 Oligo 软件(版本：7.37)进行引物设计。共设计 3 对引物，由上海生工生物工程公司合成。最终通过实验筛选出 1 对有效的特异性引物，正向引物序列：5’-CGACGTTACTCTGGCACATACTTGATT-3’；反向引物序列：5’-GCGTTTGCGTTTAATCCG-3’。

2.2.2 反应体系 总反应体系为 25 μL，PCR Master 12.5 μL，引物(浓度为 10 μmol·L^{-1})各 0.5 μL，模板 2 μL，无菌水 9.5 μL。PCR 扩增程序参数：95 ℃ 5 min；95 ℃ 1 min，61 ℃ 1.5 min，72 ℃ 1 min，35 个循环；72 ℃ 5 min。

2.2.3 电泳及成像 电泳条件：琼脂糖凝胶浓度：1.5%；DNA Marker-B(100，200，300，400，500，600 bp)；电压：120 V；时间 50 min。电泳结束后取出凝胶，置凝胶成像仪中拍照分析。

3 结果

3.1 退火温度优化

正向引物长度：27 bp；GC 含量：44.4%；退火温度：61.8 ℃；反向引物长度：18 bp；GC 含量：50.0%，退火温度：54.5 ℃；扩增产物长度：357 bp；GC 含量：46.5%。在 50~65 ℃内选取数个温度点，考察扩增效果。分别将退火温度设定为 50，52，54，56，57，58，59，60，61，62，63 ℃，结果发现浙龟甲在 50~61 ℃内扩增效率比较理想，且彼此间差异不大，见图 1。

考虑到引物扩增的特异性，分别用不同温度对各个样本进行扩增，结果发现≤60 ℃时，黄缘闭壳龟有微量的非特异性扩增产物，其他龟类无非特异性扩增；61 ℃时除黄喉水龟外，其他龟类均无扩增产物，结果见图 2。因此确定退火温度为 61 ℃。

3.2 特异性试验

选取 10 个不同品种的样本 DNA：乌龟、花龟、巴西龟、鳄龟、黄喉水龟、缅甸陆龟、马来闭壳龟、黄缘闭壳龟、鳖甲、龟甲对照药材，按“2.1”和“2.2”项下方法操作(退火温度为 61 ℃)，并用毛细管电泳仪进行检测，结果黄喉水龟在该条件下扩增出大小为 357 bp 的产物，而其他龟类无扩增产物，说明该方法能有效区分黄喉水龟及其混淆品，结果见图 3。

3.3 适用性试验

从养殖场及市场采购黄喉水龟样本共 9 份见表 1，按“2.1”和“2.2”项下方法操作(退火温度为 61 ℃)，结果均在 357 bp 处出现条带，说明该引物及方法可对黄喉水龟进行有效扩增，结果见见图 4。

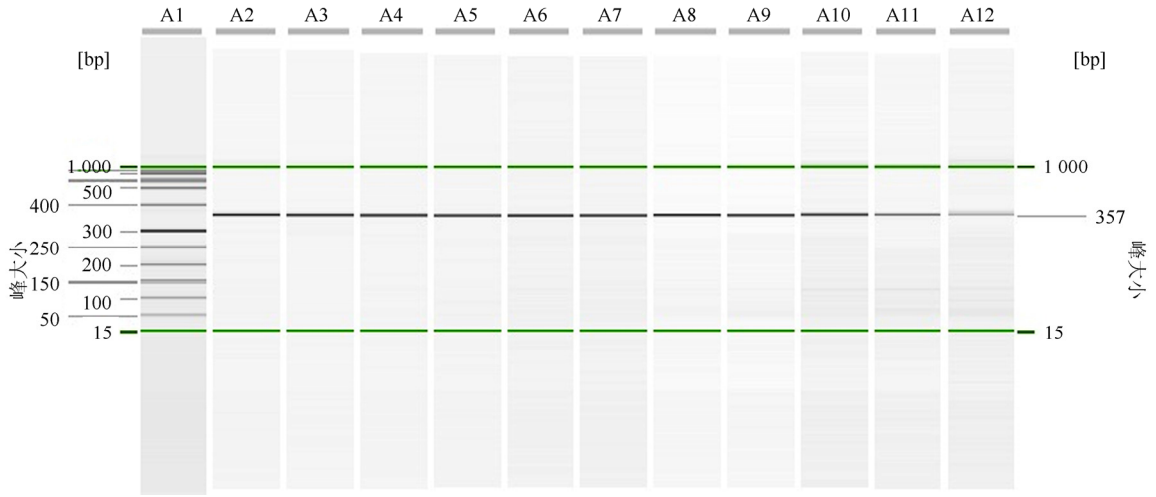

图 1 退火温度优化的毛细管电泳结果

A1−marker；A2−50 ℃；A3−52 ℃；A4−54 ℃；A5−56 ℃；A6−57 ℃；A7−58 ℃；A8:59 ℃；A9−60 ℃；A10−61 ℃；A11−62 ℃；A12−63 ℃；A2~A12 均为黄喉水龟。

Fig. 1 Results of capillary electrophoresis with optimized annealing temperature

A1−marker; A2−50 ℃; A3−52 ℃; A4−54 ℃; A5−56 ℃; A6−57 ℃; A7−58 ℃; A8:59 ℃; A9−60 ℃; A10−61 ℃; A11−62 ℃; A12−63 ℃; all of A2-A12 are *Clemmys mutica* (Cantor).

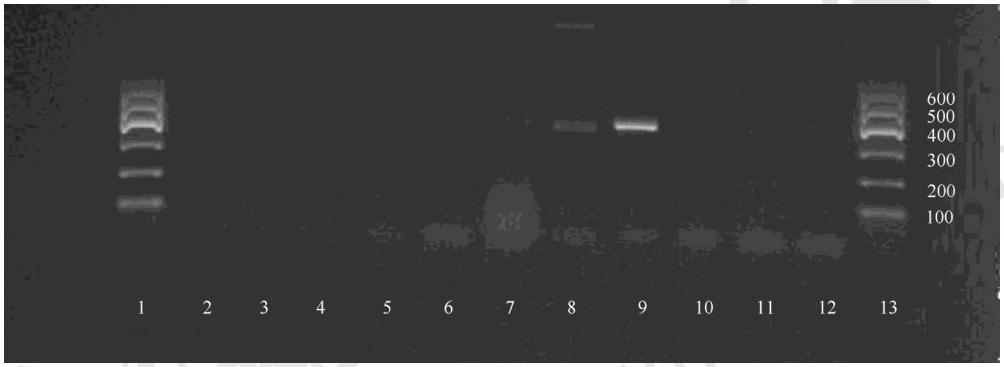

图 2 退火温度为 61 ℃时的凝胶电泳结果

1、13−marker；2−龟甲对照药材；3−龟甲；4−缅甸陆龟；5−马来闭壳龟；6−中华花龟；**7−**巴西龟；8**−**黄缘闭壳龟；9−黄喉水龟；10−鳄龟；11−鳖甲；12−空白。

Fig. 2 Gel electrophoresis results at annealing temperature of 61 ℃

1, 13−marker; 2−*Chinemys reevesii* (Gray) control; 3−*Chinemys reevesii* (Gray); 4−*Indotestudo elongate* (Blyth); 5−*Cuora amboinensis* (Daudin); 6−*Ocadia sinensis* (Gray); **7−***Trachemys scripta*; 8**−***Cuora flavomarginata* (Gray); 9−*Clemmys mutica* (Cantor); 10−*Chelydra serpentina* (Linnaeus); 11−*Trionycis Carapax*; 12−blank.

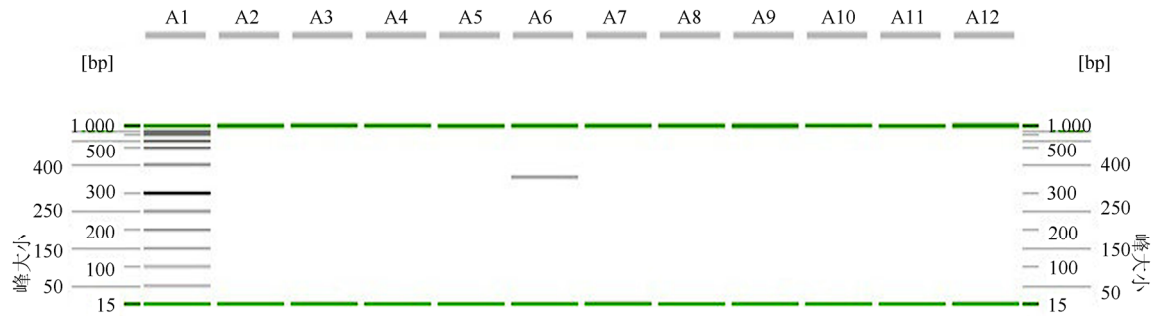

图 3 特异性试验毛细管电泳图(61 ℃扩增)

A1−marker；A2−乌龟；A3−花龟；A4−巴西龟；A5−鳄龟；A6−黄喉水龟；A7−缅甸陆龟；A8: 马来闭壳龟；A9−黄缘闭壳龟；A10−鳖甲；A11−龟甲(乌龟)对照药材；A12−空白。

Fig. 3 Specific experimental capillary electrophoresis diagram (61 ℃ amplification)

A1−marker; A2−*Chinemys reevesii* (Gray); A3−*Ocadia sinensis* (Gray); A4−*Trachemys scripta*; A5−*Chelydra serpentina* (Linnaeus); A6−*Clemmys mutica* (Cantor); A7−*Indotestudo elongate* (Blyth); A8−*Cuora amboinensis* (Daudin); A9−*Cuora flavomarginata* (Gray); A10−*Trionycis Carapax*; A11−*Chinemys reevesii* (Gray) control; A12−blank.

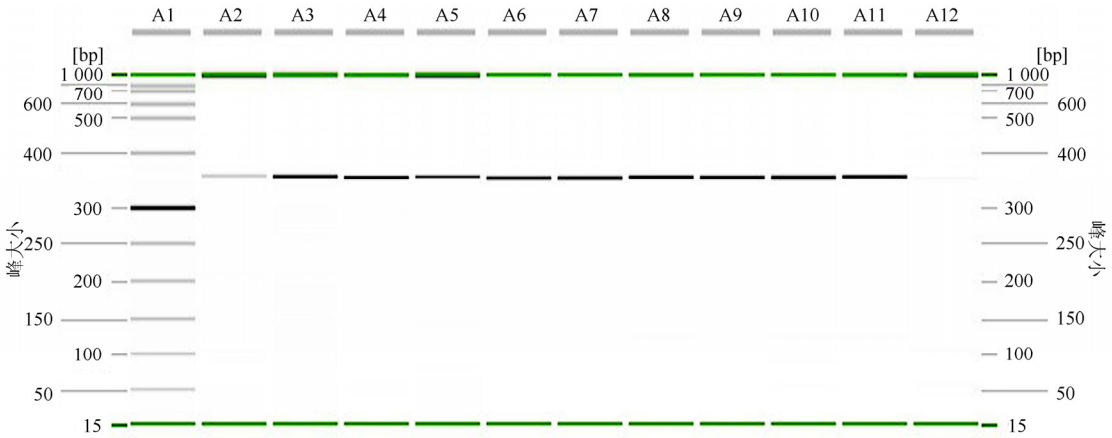

图 4 黄喉水龟适用性试验的毛细管电泳图

A1−Marker；A2−hhsg-1；A3−hhsg-2；A4−hhsg-3；A5−hhsg-4；A6−hhsg-5；A7−hhsg-6；A8−hhsg-7；A9−hhsg-8；A10−hhsg-9；A11−hhsg-10；A12−空白。

Fig. 4 Capillary electrophoresis diagram of applicability experiment of *Clemmys mutica* (Cantor)

A1−Marker; A2−hhsg-1; A3−hhsg-2; A4−hhsg-3; A5−hhsg-4; A6−hhsg-5; A7−hhsg-6; A8−hhsg-7; A9−hhsg-8; A10−hhsg-9; A11−hhsg-10; A12−blank.

表 1 实验室样本信息表

Tab. 1 Laboratory sample information sheet

序号	编号	品种	药用部位	来源	规格
1	hhsg-1	黄喉水龟	腹甲	自购	药材
2	hhsg-2	黄喉水龟	腹甲	自购	药材
3	hhsg-3	黄喉水龟	腹甲	自购	药材
4	hhsg-4	黄喉水龟	腹甲	自购	饮片(生品)
5	hhsg-5	黄喉水龟	背甲	自购	饮片(生品)
6	hhsg-6	黄喉水龟	腹甲	自购	药材
7	hhsg-7	黄喉水龟	背甲	自购	饮片(生品)
8	hhsg-8	黄喉水龟	背甲	自养宰杀	药材
9	hhsg-9	黄喉水龟	腹甲	自养宰杀	药材
10	hhsg-10	黄喉水龟	腹甲	自养宰杀	药材

4 讨论

龟甲类药材饮片真伪品的性状极其相似，仅凭性状难以鉴别，显微结构和化学成分也非常相似，因此传统的鉴别方法难以快速有效地鉴别出来。当前，分子生物学在中药材鉴定中的应用日益广泛，尤其是近年来发展迅速的 PCR 技术及 DNA 指纹图谱技术[5-9]。龟甲类药材中核酸含量较低，在取样过程中应尽量选取有骨髓或组织的部位，提高核酸的提取效率。另外，龟甲类药材表面通常会受细菌、真菌污染，样本在粉碎前建议用酒精消毒，防止细菌、真菌 DNA 的干扰。

笔者前期选取了炮制品和生品龟甲各 10 份，同时进行核酸提取，结果炮制品均未提取到核酸，生品均提取到核酸。可能饮片在炮制过程中组织内所含的微量 DNA 受到高温、醋制等破坏，无法提取出完整足量的 DNA，因此该鉴别方法目前仅适用于生品龟甲的鉴别。

本实验建立的 PCR 扩增条件可以有效鉴定黄喉水龟，也可有效区分混淆品，该方法简便、准确，可以作为浙龟甲药材鉴定的补充方法。

REFERENCES

[1] 浙江省食品药品监督管理局. 浙江省中药炮制规范 2015 年版[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2016.

[2] LI G H. Advances in the study of animal drug identification [J]. Drug Eval Res(药物评价研究), 2010, 33(3): 241.

[3] LI N, YUE B B, ZHANG J H, et al. Molecular identification of processed medicinal insects Chinese *Polyphaga* based on Cytb gene [J]. China Pharm(中国药房), 2015, 26(31): 4354-4356.

[4] WANG M, LI X H, ZHOU Y Q, et al. Identification and characteristics of *Carapax et plustrum* Testudinis based on PCR technology and modified extraction of genomic DNA [J]. J Beihua Univ Nat Sci(北华大学学报: 自然科学版), 2016, 17(6): 777-780.

[5] LUO Y M, ZHANG W M, DING X Y, et al. SNP marker and allele-specific diagnostic PCR for authenticating herbs of *Perilla* [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 2006, 41(9): 840-845.

[6] ZHENG C J, ZHAO S J, ZHAO Z H, et al. Molecular identification of *Fallopia multiflora* by PCR-RFLP based on rDNA ITS sequence [J]. J South China Univ Technol(Nat Sci Ed)(华南理工大学学报), 2009, 37(6): 74-78, 83.

[7] YUAN T Y, YAN Y, FANG L H, et al. Establishment of DNA polymorphism graphs for standard Chinese medical herbs by RAPD [J]. Chin J New Drugs(中国新药杂志), 2013, 22(19): 2250-2255.

[8] GUO H, WANG Q B, JIA L W, et al. Study progress in DNA barcode of traditional Chinese medicine [J]. China Pharm(中国药师), 2016, 19(3): 566-570.

[9] CUI Z H, YUAN Y, HU J. Authentication of Mutong, Chuan-mutong and Guan-mutong by rapid PCR [J]. Mod Chin Med(中国现代中药), 2016, 18(12): 1560-1565, 1577.

收稿日期：2018-07-01

(本文责编：曹粤锋)