

文章编号:1001-6880(2016)5-0668-05

# 龟甲 DNA 检测试剂盒的研制与评价

曲 莉<sup>1</sup>, 王 森<sup>2</sup>, 邓 莹<sup>3</sup>, 张丽华<sup>3</sup>, 牛佳牧<sup>4\*</sup>, 李明成<sup>2\*</sup><sup>1</sup> 北华大学公共卫生学院; <sup>2</sup> 北华大学医学检验学院; <sup>3</sup> 北华大学药学院; <sup>4</sup> 北华大学科研处, 吉林 132013

**摘要:** 研制一种集 DNA 提取与 PCR 鉴定为一体的龟甲检测试剂盒, 考察试剂盒的特异性、敏感性、重复性及稳定性。通过优化 DNA 提取和 PCR 检测方法, 将所需试剂组合成试剂盒, 用其提取龟甲正品及伪品 mtDNA, 进行 PCR 鉴定。试剂盒提取龟甲正品及伪品 mtDNA 的 OD260/OD280 为  $1.80 \pm 0.05$ , 正品龟甲在 335bp 和 410 bp 出现两条清晰条带, 伪品龟甲则无条带出现, 试剂盒特异性为 100%, 检测限为 0.025 g, 经反复冻融 20 次后依然有效, 3 次重复性检测均重现相同结果。龟甲 DNA 检测试剂盒特异性强、灵敏度高、稳定性好, 适用于龟甲药材的快速检测。

**关键词:** 龟甲; DNA 检测试剂盒; 复合 PCR**中图分类号:** R927.11**文献标识码:** A**DOI:** 10.16333/j.1001-6880.2016.5.005

## Development and Evaluation of Tortoise shell DNA Detection Kit

QU Li<sup>1</sup>, WANG Miao<sup>2</sup>, DENG Ying<sup>3</sup>, ZHANG Li-hua<sup>3</sup>, NIU Jia-mu<sup>4\*</sup>, LI Ming-cheng<sup>2\*</sup><sup>1</sup> College of Public Health, Beihua University; <sup>2</sup> Medical College, Beihua University; <sup>3</sup> School of Pharmacy, Beihua University; <sup>4</sup> Scientific Research Department, Beihua University, Jilin 132013, China

**Abstract:** To develop a detection kit for *Tortoise shell* DNA and to investigate the kit's index including specificity, sensitivity, repeatability and stability. The DNA detection kit was assembled by optimized salting out reagent and multiplex PCR reagent. The mtDNA of *Tortoise shell* was extracted by the kit, the multiplex PCR technique was carried out to authenticate samples of *Tortoise shell*. The value of mtDNA extracted by the kit was  $1.80 \pm 0.05$ . The result of multiplex PCR indicated that two distinct bands at 335 bp and 410 bp were shown on the agarose gel electrophoresis in genuine *Tortoise shell*, but there was no band in fake samples. The specificity of the kit was 100%. The detection limit of the kit was 0.025 g of each sample. The kit was effective after being frozen-thawed for 20 times, repeatability test indicated the same result through three times. The *Tortoise shell* DNA detection kit has properties with high specificity, good sensitivity and stability. Hence it is suitable for the rapid and accurate detection of *Tortoise shell*.

**Key words:** *Tortoise shell*; DNA detection Kit; multiplex PCR

龟甲为龟科动物乌龟 [*Chinemys reevesii* (Gray)] 的干燥腹甲及背甲。目前, 世界上已知龟类动物 240 多种, 我国现有 31 种龟, 隶属于 5 个科 18 个属。龟甲药性味咸、甘, 微寒, 归肝、肾、心经, 有滋阴潜阳, 益肾强骨, 养血补心, 固经止崩。用于阴虚潮热, 骨蒸盗汗, 头晕目眩, 虚风内动, 筋骨痿软, 崩漏经多等症<sup>[1]</sup>。龟甲中含动物胶、角蛋白、脂肪、骨胶原及钙、磷、锌、铜、锶等多种常量及微量元素, 为常用珍贵药材。近些年, 龟甲的市场需求量不断增大,

但药典收录的乌龟繁殖率较低、生长速度缓慢, 导致龟甲市场极度混乱, 直接影响到龟甲临床用药的安全和疗效。

线粒体 DNA (mitochondrial DNA, mtDNA) 作为核外遗传物质, 是研究动物起源、进化及对群体进行遗传分析的理想对象, 是最常用的分子标记。2010 年版《中国药典》收载了蕲蛇和乌梢蛇的 PCR 鉴别方法, 为中药分子生物学鉴定提供了一个崭新的思路。本团队从 2006 年开始研究龟甲 PCR 鉴别方法, 成功提取了龟甲 mtDNA, 先后应用普通 PCR 及复合 PCR 技术将中国药典收录的龟甲成功鉴定, 在此基础上研制了龟甲 DNA 检测试剂盒, 并对试剂盒进行了评价。本研究利用分子生物学方法鉴别龟甲, 为准确、快速检测龟甲药材提供新的方法。

收稿日期:2015-11-16 接受日期:2016-04-06

基金项目:吉林省教育厅“十二五”科学技术研究项目(2015-154);吉林省卫生厅项目(2014Z085);吉林省发展改革吉林省战略性新兴产业和高新技术产业发展项目(2013G030)

\* 通讯作者 Tel:86-432-64608560; E-mail: limingcheng1964@163.com

# 1 材料与仪器

## 1.1 材料

正品龟甲(标号为 ZPGJ-1、ZPGJ-2,由中国药品生物制品检定所提供,批号:121494-201102),作为试剂盒的阳性对照品;10个样品龟甲由吉林省食品药品检验所鉴定并提供,为6个正品和4个伪品。

## 1.2 试剂

10 mmol/L Tris-HCl (pH = 8.0), 10 mmol/L Na<sub>2</sub>EDTA (pH = 8.0), 10% 十二烷基硫酸钠 SDS(北京鼎国生物技术公司);50 mmol/L NaCl;异丙醇;蛋白酶 K(20 μg/mL), 2 × Taq PCR Master Mix(上海天根生物技术公司)。

## 1.3 仪器

H-2050R 低温高速离心机(长沙湘仪离心机仪器有限公司),PCR System 9700 基因扩增仪(美国 ABI 公司),DYY-8B 型稳压稳流电泳仪(北京市六一仪器厂),UV WHITE-2020D 紫外凝胶成像分析仪(美国 Biorad 公司)。

# 2 实验方法

## 2.1 试剂盒的组装

试剂盒为20次检测用量,由DNA提取和PCR扩增两种体系构成。

### 2.1.1 配制DNA提取试剂

用“P”代表“瓶”,DNA提取试剂由P1-P6组成

表1 龟甲 DNA 检测试剂盒组成

Table 1 The made up of Tortoise shell DNA Detection Kit

Name	Volume	Function	Save method
P <sub>1</sub>	12 mL	Destroy cell well,lease DNA	-20 ℃
P <sub>2</sub>	1 mL	Surface active agent	-20 ℃
P <sub>3</sub>	1 mL	Degradate protein	-20 ℃
P <sub>4</sub>	12 mL	Precipitate DNA	-20 ℃
P <sub>5</sub>	12 mL	Precipitate DNA	-20 ℃
P <sub>6</sub>	5 mL	Dissolve DNA	-20 ℃

### 2.1.2 配制PCR反应体系

配制反应体系(25.0 μL/PCR):2 × Taq PCR Master Mix 12.5 μL;细胞色素 b(cytochrome b, cyt b)上下游引物各1 μL;细胞色素 C 氧化酶亚基 I(cytochrome oxidase subunit I, CoI)上下游引物各1 μL;加灭菌双蒸水至23.0 μL;加入2.0 μL待检样品及阴、阳性对照品。

### 2.1.3 PCR 扩增条件

扩增程序为94℃预变性5 min,然后进行30个循环,条件为94℃变性30 s,61℃退火30 s,72℃延伸30 s,最后72℃延伸10 min。

## 2.2 试剂盒检测样品龟甲

### 2.2.1 龟甲样品 mtDNA 提取

(1)取1 g龟甲样品研碎至1 mm<sup>3</sup>左右,称取样品0.1 g加入P1 500 μL,P2 30 μL,P3 15 μL,混匀后置于56℃水浴振荡16~18 h;(2)取出加入P4 500 μL,轻轻振荡10 min,4℃ 11000 rpm 离心10 min,取上清液加入等体积P5,-20℃放置1 h;(3)取出4℃ 11000 rpm 离心10 min,弃上清液,向沉淀中加入70%乙醇500 μL充分冲洗,4℃ 离心11000

rpm × 10 min,留沉淀室温干燥;(4)加入P6 80 μL溶解DNA,作为供试品模板进行PCR反应。

### 2.2.2 mtDNA 的浓度、纯度检测

取DNA提取液3 μL,用超微量紫外分光光度计测量260 nm 和 280 nm 处的吸光度 A<sub>260</sub> 和 A<sub>280</sub>,以 A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> 的比值确定DNA的纯度并计算浓度。

### 2.2.3 PCR 检测

(1)将DNA提取液、阳性对照液、阴性对照液各2 μL分别加入到PCR反应管中;(2)PCR扩增:将离心管置PCR仪,设置PCR反应参数,PCR结束后,应在1 h内进行检测;(3)电泳检测:取PCR扩增后的反应管中液体15~20 μL,点在经GelRed染色的2%琼脂糖凝胶点样孔中,10 V/cm电泳,结束后将凝胶置于紫外凝胶成像分析仪上观察,拍照。

## 2.3 试剂盒检测参数的评价

### 2.3.1 特异性

取吉林省食品药品检验所鉴定的3个龟甲正品及3个龟甲伪品,随机标号,采用试剂盒分别进行检验。

### 2.3.2 敏感性

随机抽取龟甲正品按1倍梯度递减至0.003 g

提取 mtDNA, 取 DNA 提取液 2  $\mu\text{L}$  作为模板进行 PCR 检测。

### 2.3.3 重复性

随机抽取 2 个龟甲正品, 1 个龟甲伪品, 在同一实验室相同条件下, 由同一实验员采用试剂盒法分别进行 3 次重复检验。

### 2.3.4 稳定性

随机选取一盒试剂盒由-20  $^{\circ}\text{C}$  取出, 置于室温下溶解, 再置于-20  $^{\circ}\text{C}$  冷冻, 如此反复分别经过 1

次、5 次、10 次和 20 次后, 对试剂盒内的 DNA 提取试剂, 阴、阳性对照品进行检测。

## 3 实验结果

### 3.1 试剂盒提取样品龟甲 mtDNA 纯度及浓度的检测

试剂盒提取的样品 mtDNA 的纯度为  $1.80 \pm 0.05$ , 浓度为  $1.90 \mu\text{g}/\text{L}$ , 表明该方法提取的 DNA 样品基本无蛋白质及 RNA 污染(表 2)。

表 2 正品龟甲及样品龟甲的纯度及浓度

Table 2 Purities and concentration of 12 *Tortoise shell* samples

No.	Size (g)	Genuine or Counter fact	$A_{260}$	$A_{280}$	Purity	C ( $\mu\text{g}/\text{L}$ )
ZPGJ-1	5	Genuine	0.378	0.209	1.81	1.89
ZPGJ-2	5	Genuine	0.376	0.211	1.78	1.88
JLGJ-1	5	Genuine	0.382	0.215	1.78	1.91
JLGJ-2	5	Genuine	0.379	0.213	1.78	1.90
JLGJ-3	5	Genuine	0.380	0.209	1.82	1.90
JLGJ-4	5	Genuine	0.378	0.211	1.79	1.89
JLGJ-5	5	Genuine	0.382	0.213	1.79	1.91
JLGJ-6	5	Genuine	0.380	0.210	1.81	1.90
JLGJ-7	5	Counter fact	0.377	0.212	1.78	1.89
JLGJ-8	5	Counter fact	0.381	0.208	1.83	1.91
JLGJ-9	5	Counter fact	0.379	0.214	1.77	1.90
JLGJ-10	5	Counter fact	0.383	0.211	1.82	1.92

### 3.2 样品龟甲 mtDNA PCR 产物琼脂糖凝胶电泳

经特异双引物 PCR 扩增后, 3 个正品龟甲 mtDNA cyt b 及 CoI 与引物特异性结合, 扩增产物在 335 bp 和 410 bp 出现两条清晰条带, 且与阳性对照品位置一致, 阴性对照品与 3 个伪品龟甲无扩增条带(图 1)。

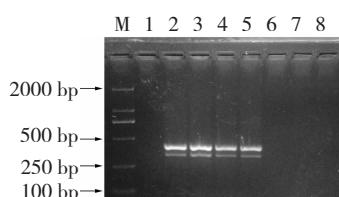


图 1 试剂盒检测龟甲样品 PCR 琼脂糖凝胶电泳图谱

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of different samples using the *Tortoise shell* kit

注:M:DL2000 DNA Marker;1:阴性对照液;2:阳性对照液;3:JLGJ-1;4:JLGJ-2;5:JLGJ-3;6:JLGJ-7;7:JLGJ-8;8:JLGJ-9

Note:M:DL2000 DNA Marker;1:negative control;2:positive control;3:JLGJ-1;4:JLGJ-2;5:JLGJ-3;6:JLGJ-7;7:JLGJ-8;8:JLGJ-9

### 3.3 试剂盒检测的评价参数

#### 3.3.1 特异性

试剂盒对经吉林省食品药品检验所鉴定的龟甲样品进行检测, 所有正品龟甲在 335 bp 和 410 bp 出现两条清晰条带, 且与阳性对照品位置一致, 而所有

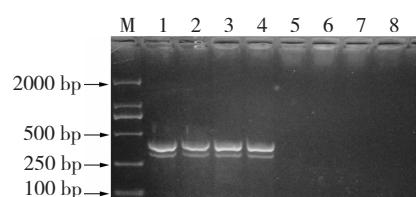


图 2 试剂盒敏感性测试 PCR 琼脂糖凝胶电泳图谱

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis for the sensibility assay of the *Tortoise shell* kit

注:M:D2000 DNA Marker;1:阳性对照液;2-7:龟甲样品重量为 0.1-0.003 g;8:阴性对照液

Note:M:DL2000 DNA Marker;1:positive control;2-7:weight of the *Tortoise shell* samples was 0.1-0.003 g;8:negative control

伪品龟甲及阴性对照品不出现条带,试剂盒鉴定的结果与吉林省食品药品检验所用药典法鉴定的结果完全一致,试剂盒特异性为 100% (图 1)。

### 3.3.2 敏感性

龟甲样品按 1 倍梯度递减至 0.025 g,取 2 μL 提取液用试剂盒进行 PCR 扩增仍可出现 335 bp 和 410 bp 两条清晰目标条带(图 2)。

### 3.3.3 重复性

对 2 个正品龟甲和 1 个伪品龟甲进行 3 次重复性检测,正品龟甲均在 335 bp 和 410 bp 出现两条清晰条带,且与阳性对照品位置一致,而伪品龟甲及阴性对照品无条带,说明试剂盒具有良好的重复性

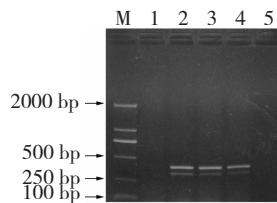


图 3 试剂盒重复性试验 PCR 琼脂糖凝胶电泳图谱

Fig. 3 Agarose gel electrophoresis for the repeatability assay of the Tortoise shell kit

注:M:DL2000 DNA Marker;1:阴性对照液;2:阳性对照液;3:JLGJ-5;4:JLGJ-6;5:JLGJ-10

Note: M: DL2000 DNA Marker; 1: negative control; 2: positive control; 3: JLGJ-5; 4: JLGJ-6; 5: JLGJ-1

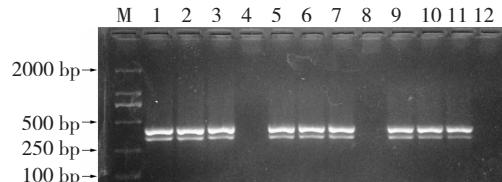


图 4 试剂盒稳定性实验 PCR 琼脂糖凝胶电泳图谱

Fig. 4 Agarose gel electrophoresis for the stability assay of the Tortoise shell kit

注:M:DL2000 DNA Marker;1,5,9:试剂盒反复冻融 5 次、10 次、20 次后试剂盒内阳性对照液检测;4,8,12:试剂盒反复冻融 5 次、10 次、20 次后试剂盒内阴性对照液检测;2,6,10 分别表示 JLGJ-4 分别经反复冻融 5 次、10 次、20 次的试剂盒检测;3,7,11 分别表示 JLGJ-5 分别经反复冻融 5 次、10 次、20 次的试剂盒检测

Note: M: DL2000 DNA Marker; 1, 5, 9: the result of testing positive control after frozen-thawed of the kit for 5, 10, 20 times respectively; 4, 8, 12: the result of testing negative control after frozen-thawed of the kit for 5, 10, 20 times respectively; 2, 6, 10: the result of testing JLGJ-4 by kit after frozen-thawed of the kit for 5, 10, 20 times respectively; 3, 7, 11: the result of testing JLGJ-5 by kit after frozen-thawed of the kit for 5, 10, 20 times respectively

(图 3)。

### 3.3.4 稳定性

试剂盒经反复冻融 1 次、5 次、10 次、20 次后仍能提取龟甲 mtDNA 并扩增出 335 bp 和 410 bp 两条目标条带,表明试剂盒具有良好的稳定性(图 4)。

## 4 讨论

传统的中药材龟甲质量评价方法主要是外观、显微及理化鉴定等。传统外观鉴别的主要依据是背甲和腹甲的形状、颜色、气味和质地等方面的特征性状<sup>[2]</sup>,该方法简便、快捷,但缺乏明确界限;显微鉴别方法是放大观察龟甲的纹理及色斑特征,适用于外观破损的商品龟甲,但龟甲的显微鉴别方法标准尚未成熟;理化鉴定通过物理或化学方法对龟甲及其制剂中所含有的主要化学成分或特征成分进行定性和定量分析,以达到鉴定其真伪的目的<sup>[3]</sup>,但一些近缘物种的化学成分十分相似,为龟甲的理化鉴别带来了困难。

2010 年版《中国药典》对龟甲的鉴定方法是薄层色谱法(TLC)。TLC 法鉴别可以在一块层析板上容纳多个样品并且出现多个信息,它具有分离和鉴定的双重作用。顾迎寒<sup>[4]</sup>采用 TLC 对安布闭壳龟甲,红耳泥龟甲、缅甸陆龟甲、中华花龟甲与正品龟甲进行鉴别,色谱图显示,五种龟甲所含游离氨基酸类成分非常类似,难以显著区分。由此可见,TLC 法虽能有效分析、鉴别出龟甲中的相关成分,但不能推断龟甲的种属来源。

龟甲种属的差异归根溯源是基因型的差异,即 DNA 序列的差异。因此,通过比较不同种属龟甲基因序列的差异来鉴定龟甲,成为一种可靠的新方法。目前,DNA 分子诊断技术应用于中药鉴定已取得极大的发展。2010 年版《中国药典》将 PCR 技术作为蕲蛇、乌梢蛇及川贝母的标准鉴别方法,基于以上的技术支持,本科研团队自主研发了龟甲 DNA 检测试剂盒,包括 DNA 提取和 PCR 扩增两个体系,可以一步完成对不同种属龟甲的鉴定。在龟甲 DNA 提取方面,经过反复试验对比,发现不同厂家、不同批次的试剂会对实验结果造成影响,因此,DNA 提取试剂盒统一试剂,避免了不同来源、不同批次等因素对实验可能造成的未知影响;另外,试剂盒提取龟甲 mtDNA 操作步骤简单,除去水浴时间仅用 2 h 就可完成 DNA 提取过程,缩短了鉴定周期;最后,试剂盒提取的 DNA,其 OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 值可达 1.80 ± 0.05,表

明此法提取的 DNA 纯度较高,有利于后续实验的进行。试剂盒中的 PCR 扩增体系采用复合 PCR 技术,针对 mtDNA 的 Cytb 和 COI 基因的特异区段设计双引物,具有更高的特异性,成功将药典收录的龟甲与其他种属龟甲鉴别;采用双引物进行 PCR 扩增,退火温度的选择决定实验的成败,经反复实验摸索将温度条件定为 61 ℃,在该退火温度下,正品龟甲 PCR 产物在 335 bp 和 410 bp 出现两条清晰条带,而伪品则无条带,结果直观易判断,不存在主观局限性。

至今我们团队已应用聚合酶链式反应快速准确检验中药材 10 种。其中,李明成等<sup>[5,6]</sup>研究貂心 mtDNA 的特征,并建立了貂心脱氧核糖核酸指纹特征鉴定方法;谷玉娟等<sup>[7]</sup>分别应用了特异性引物鉴别和随机扩增多态 DNA (RAPD) 鉴别鹿茸;王帅等<sup>[8]</sup>建立了林下参与栽培参直接扩增片段长度多态性指纹鉴定图谱。我们团队研制的龟甲 DNA 检测试剂盒具有以下优点:第一,试剂盒采用一步法实现从提取到扩增的鉴定过程,缩短了时间,可以实现短时间内大量样本的鉴定;第二,试剂盒检测参数实验结果表明,本试剂盒具有很好的特异性、敏感性、重复性和稳定性;第三,严格按照试剂盒说明书操作,真正实现实验过程标准化、自动化,操作简单,结果直观易判断,可以有效缓解专业鉴定人才缺乏的现状。基于以上特点,该试剂盒可广泛应用于药品生产厂商和药品检验部门。

## 参考文献

- 1 Chinese Pharmacopoeia Commission (国家药典委员会). *Pharmacopoeia of the People's Republic of China* (中华人民共和国药典). Beijing: China Medical Science Press, 2010, Vol I, 168.
  - 2 Li Y(李悦), Wang SF(王淑芬). True and false identification of Tortoise shell. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2000, 31: 866-867.
  - 3 Lei JT(雷钧涛). Study on shape and Composition of Tortoise shell. *J Jilin Med Coll* (吉林医药学院学报), 2005, 26: 43-44.
  - 4 Gu YH(顾迎寒). Pharmacognostic Study on Tortoise shell. Chengdu: Chengdu University of Traditional Chinese Medicine (成都中医药大学), MSc. 2007.
  - 5 Zhang LH(张丽华), Li MC(李明成), Wang BM(王冰梅), et al. Identification and characterization of mitochondrial DNA in *Martes zibellina* L. heart. *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 2008, 43: 1694-1696.
  - 6 Li MC, Xia W, Wang M, et al. Application of molecular genetics method for differentiating *Martes zibellina* L. heart from its adulterants in traditional Chinese medicine based on mitochondrial cytochrome b gene. *Mitochondrial DNA*, 2014, 25: 78-82.
  - 7 Gu YJ(谷玉娟), Zhang LH(张丽华), Fu GL(傅桂莲). Mitochondrial DNA fingerprint identification of Velvet antler. *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 2013, 48: 170-173.
  - 8 Wang S(王帅), Wang H(王慧), Zhang LH(张丽华), et al. Identification of *Panax ginseng* C. A. Meyer Cv. *Silvatica* and cultivated *Panax ginseng* by DALP fingerprint. *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 2013, 48: 677-680.
- (上接第 660 页)
- 9 Zhao YQ(赵余庆), Yuan CL(袁昌鲁), Fu YQ(傅玉琴), et al. Chemical studies of minor triterpene compounds isolated from the stems and leaves of *Panax ginseng* C. A. Meyer. *Acta Pharm Sin* (药学学报), 1990, 25: 297-301.
  - 10 Asakawa J, Kasai R, Yamasaki K, et al. <sup>13</sup>C NMR Study of ginseng sapogenins and their related dammarane type triterpenes. *Tetrahedron*, 1997, 53: 1935-1939.
  - 11 Teng R, Li H, Chen J, et al. Complete assignment of <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR data for nine protopanaxatriol glycosides. *Magn Reson Chem*, 2002, 40: 483-488.
  - 12 Jin JM(金建明), Li YH(李有海), Zhang HL(张海伦), et al. Chemical constituents of enzymatic hydrolysate of total ginsenoside extract of *Panax quinquefolium*. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2014, 26: 1552-1556.
  - 13 Liu GY, Li XW, Wang NB, et al. Three new dammarane-type triterpene saponins from the leaves of *Panax ginseng* CA Meyer. *J Asian Nat Prod Res*, 2010, 12: 865-873.
  - 14 Tran TL, Kim YR, Yang JL, et al. Dammarane triterpenes from the leaves of *Panax ginseng* enhance cellular immunity. *Bioorg Med Chem*, 2014, 22: 499-504.