

生物检定

阿胶原料驴源性成分的 DNA 分子鉴别方法*

罗晖明¹, 肖炳燚¹, 聂平¹, 刘丽^{1,2}, 李文莉^{1**}, 丁野¹, 舒毕琼¹, 孙辉¹

(1. 湖南省药品检验研究院, 长沙 410001; 2. 中南大学药学院, 长沙 410013)

摘要 目的: 建立阿胶原料驴源性成分的鉴别方法。**方法:** 通过聚合酶链式反应(PCR), 扩增基因组上的线粒体细胞色素 b(*Cytb*) 基因, 继而用限制性内切酶 *BamH* I 对该聚合酶链式反应产物进行酶切, 将酶切产物进行琼脂糖凝胶电泳及紫外成像。**结果:** 驴源性成分 *Cytb* 的 PCR 产物能够被 *BamH* I 酶切成 76 bp 和 314 bp 2 个片段, 而马源性成分均不能够被酶切。**结论:** 结合聚合酶链式反应与限制性内切酶片段长度多态性法(PCR-RFLP), 可以鉴别阿胶原料驴源性成分。

关键词: 动物源性中药; 阿胶; 驴源性成分; DNA 鉴别; 细胞色素 b(*Cytb*); 聚合酶链式反应(PCR); 限制性内切酶片段长度多态性(RFLP); *BamH* I

中图分类号: R 917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2017)02-0202-10

doi: 10.16155/j.0254-1793.2017.02.03

Application of DNA molecular identification method to distinguish donkey-derived components in Ejiao*

LUO Hui-ming¹, XIAO Bing-yi¹, NIE Ping¹, LIU Li^{1,2}, LI Wen-li^{1**},
DING Ye¹, SHU Bi-qiong¹, SUN Hui¹

(1. Hunan Institute for Drug Control, Changsha 410001, China; 2. School of Pharmaceutical Sciences, Central South University, Changsha 410013, China)

Abstract Objective: To identify donkey-derived components in Ejiao at the DNA level. **Methods:** The mitochondrial DNA cytochrome b (*Cytb*) gene was amplified with polymerase chain reaction (PCR). The PCR products were incubated with the restrictive endonuclease *BamH* I, followed by agarose gel electrophoresis and image acquiring under UV light. **Results:** The PCR products amplified from the *Cytb* gene of donkey-derived components in Ejiao could be cleaved into two fragments of about 76 bp and 314 bp after incubation with *BamH* I, while the PCR products from horse-derived components could not. **Conclusion:** A successful identification

* 国家科技重大专项课题, 中药质量安全检测和风险控制技术平台(编号: 2014ZX09304307-002); 湘产常用中药 DNA 条形码研究(湖南省科技厅重点项目; 编号: 2014SK2001); 湖南苗药 DNA 条形码鉴别研究(湖南省食品药品监督管理局食品药品安全科技重点项目; 编号: 湘食药科 R201502)

** 通信作者 Tel:(0731)82275866; E-mail: 1838675867@qq.com

第一作者 Tel: 13875961870; E-mail: 446047751@qq.com

of donkey-derived components in Ejiao could be achieved by the application of polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP).

Keywords: traditional Chinese medicine (TCM) of animal origin; Ejiao; donkey-derived components; DNA identification; cytochrome b (*Cytb*); polymerase chain reaction (PCR); restriction fragment length polymorphism (RFLP); *BamH I*

阿胶为马科动物驴 *Equus asinm* L. 的干燥皮或鲜皮经煎煮、浓缩制成的固体胶^[1]。其药用历史悠久,始载于《神农本草经》,被列为“补血圣药”,是药食同源的重要物种,尤其在治未病方面功效显著。现代研究表明阿胶具有显著的抗贫血作用^[2-3],调节身体机能,增强免疫力^[4-5],在肿瘤辅助治疗^[6]、哮喘病^[7]等疾病防治上,其治疗优势也正逐步凸显。仅中国药典 2015 年版收录的含阿胶的成药即多达 34 个。随着人们对健康的日益重视,阿胶及其相关产品越来越成为大众与媒体关注的焦点。作为“中药三宝”之一,阿胶在我国保健食品市场占据重要地位^[8],近年来阿胶也开始进入国外市场^[9]。据不完全统计,目前全国各类阿胶企业达 30 余家,驴皮产值达近 50 亿元,但是,目前却出现了“有市无货”的尴尬局面^[10]。由于驴养殖业发展比较滞后,驴的存栏数呈逐年下滑之势,以致近年制胶原料驴皮短缺,原料价格上涨,掺杂掺假时有发生。主要掺假成分包括猪皮、牛皮胶、马皮胶甚至皮革下脚料等。传统的阿胶鉴别采用外观性状和分析氨基酸理化性质等方法,需要极为丰富的个人经验和深厚的专业知识,由于氨基酸为动物共性成分,难以保证鉴别方法专属性,此外杂皮胶的制备工艺与正品相似,故其外观极为相似,而更增加了鉴别的难度。近来有采用近红外光谱技术^[11]对阿胶真品和伪品进行快速区分的报道,但由于正品和伪品之间缺乏特征性指标,易对未知样品造成误判。

驴 *Equus. asinus* L. 和 马 *Equus.caballus orientalis* Noack 为同科同属动物,骡子为马和驴的杂交种。驴皮与马皮、骡皮在毛色、性状等方面十分相近,肉眼很难区分,故市场上以马皮等作为驴皮伪品制造阿胶较为常见。传统中医认为马皮行血,而阿胶本意补血,若掺进马皮,反而起到反作用。故把好原料关对于阿胶及其制品的质量控制相当关键。不同物种的基因组不同,依据物种的特异序列,可以用引物经过聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR)

扩增特异的产物,进一步辅以限制性内切酶片段长度多态性 (RFLP) 来鉴别物种源性^[12]。本研究采用 PCR-RFLP 技术,建立了一种简单、快速且准确可靠的鉴定阿胶原料驴源性成分的方法,用于区分阿胶与其他动物皮胶类药材,尤其是区分驴近亲源性动物的掺杂,对于阿胶及其制品的质量控制具有重要的意义。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

LabCycler 梯度 PCR 仪 (SensQuest GmbH)、Veriti 梯度 PCR 仪 (ABI)、T100 梯度 PCR 仪 (BIO RAD)、DYY-2C 电泳仪 (北京六一仪器厂)、G: BOX XT4 全自动凝胶成像系统 (Syngene)、Nanodrop 2000 微量紫外分光光度计 (Thermo Scientific)、AB 135 分析天平 (Mettler)、FE20KpH 计 (Mettler)、UV-TOC/UF 纯水仪 (Genpure)。

1.2 试剂

血液 / 细胞 / 组织基因组 DNA 提取试剂盒 [批号 N2912, 天根生化科技 (北京) 有限公司], dNTP Mixture (批号 N3028, 天根生化科技 (北京) 有限公司), 普通 Taq 酶 [批号 N2520, 天根生化科技 (北京) 有限公司]、高度保真的 HS 酶 (普通缓冲液) (批号 R010A, 大连 Takara 公司)、高度保真的 HS 酶 (GC 缓冲液) (批号 A1081C, 大连 Takara 公司)、High Fidelity PCR Master (批号 12140314001, 德国 Roche 公司)、Phanta Super-Fidelity DNA Polymerase (批号 P501-d1, 南京诺唯赞生物科技有限公司), BamH I (批号 00236830, 美国 Thermo Scientific 公司), GelRed (批号 14G0626, 美国 Biotium 公司), 琼脂糖 (批号 111860, 西班牙 BIOWEST 公司)。引物 (鼎国基因科技有限公司): 上游 5' -TTTGCCTTCCACTTTATTCTA-3', 下游 5' -GTGTAGGGTAGGGATGAGTG-3', Tris 碱 (批号 D1021, 美国 Amresco 公司); 冰醋酸 (批号 20120627, 国药集团化学试剂有限公司)、EDTA-Na₂·2H₂O (批号 20130924, 国药集团化学试剂有限公司)。

1.3 样品

本实验所用样品来源于农家收集和企业产地收购,收集后放置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存备用。样品共 40 份,分别为驴皮 16 份,马皮 6 份,驴骡皮 3 份,马骡皮 8 份,牛等其他物种 7 份;均保存于湖南省食品药品检验研究院,均经湖南省药品检验研究院中药室主任丁野和专家杨友良老师鉴定,样品信息详见表 1。

表 1 样品信息

Tab. 1 Sample information

序号 (No.)	品种名称 (species name)	产地 (place of origin)	样品编号 (sample number)
1	驴 (donkey)	河北 (Hebei)	LP01
2	驴 (donkey)	河北 (Hebei)	LP02
3	驴 (donkey)	山东 (Shandong)	LP03
4	驴 (donkey)	河北 (Hebei)	LP04
5	驴 (donkey)	河北 (Hebei)	LP05
6	驴 (donkey)	河北 (Hebei)	LP06
7	驴 (donkey)	山东 (Shandong)	LP07
8	驴 (donkey)	山东 (Shandong)	LP08
9	驴 (donkey)	河北 (Hebei)	LP09
10	驴 (donkey)	山东 (Shandong)	LP10
11	驴 (donkey)	内蒙 (Neimeng)	LP11
12	驴 (donkey)	东北 (Dongbei)	LP12
13	驴 (donkey)	东北 (Dongbei)	LP13
14	驴 (donkey)	内蒙 (Neimeng)	LP14
15	驴 (donkey)	内蒙 (Neimeng)	LP15
16	驴 (donkey)	内蒙 (Neimeng)	LP16
17	马 (horse)	河北、山东交界 (a bounded place between Hebei and Shandong)	MP01
18	马 (horse)	内蒙 (Neimeng)	MP02
19	马 (horse)	新疆 (Xinjiang)	MP03
20	马 (horse)	宁夏 (Ningxia)	MP04
21	马 (horse)	内蒙 (Neimeng)	MP05
22	马 (horse)	内蒙 (Neimeng)	MP06
23	驴骡 (hinny)	山东 (Shandong)	LL01

表 1 (续)

序号 (No.)	品种名称 (species name)	产地 (place of origin)	样品编号 (sample number)
24	驴骡 (hinny)	河北 (Hebei)	LL02
25	驴骡 (hinny)	山东 (Shandong)	LL03
26	马骡 (mule)	河北 (Hebei)	ML01
27	马骡 (mule)	山东 (Shandong)	ML02
28	马骡 (mule)	山东 (Shandong)	ML03
29	马骡 (mule)	山东 (Shandong)	ML04
30	马骡 (mule)	山东 (Shandong)	ML05
31	马骡 (mule)	山东 (Shandong)	ML06
32	马骡 (mule)	河北 (Hebei)	ML07
33	马骡 (mule)	河北 (Hebei)	ML08
34	鹅 (goose)	湖南 (Hunan)	QT01
35	鸭 (duck)	湖南 (Hunan)	QT02
36	羊 (goat)	湖南 (Hunan)	QT03
37	鸡 (brood)	湖南 (Hunan)	QT04
38	猪 (pig)	湖南 (Hunan)	QT05
39	兔 (rabbit)	湖南 (Hunan)	QT06
40	牛 (cattle)	湖南 (Hunan)	QT07

2 实验方法

2.1 序列来源

从 GenBank 数据库下载的序列信息见表 2。

表 2 从 GenBank 下载相关物种 *Cytb* 序列信息

Tab. 2 Information of the *Cytb* sequences of related species downloaded from GenBank

中文名 (Chinese name)	学名 (scientific name)	Genbank 编号 (Genbank ID)
猪 (pig)	<i>Sus scrofa domestica</i>	AB015080.1
牛 (cattle)	<i>Bos taurus</i>	GU249568.1
羊 (goat)	<i>Ovis aries</i>	JX567831.1
马 (horse)	<i>Equus caballus</i>	JF511441.1
驴 (donkey)	<i>Equus asinus</i>	FJ428524.1
鸡 (brood)	<i>Gallus gallus</i>	L08376.1
鸭 (duck)	<i>Anas platyrhynchos breed Beijing duck</i>	EU755252
鹅 (goose)	<i>Anser cygnoides</i>	AY552165.1
兔 (rabbit)	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	AJ001588

2.2 引物设计与酶切位点的引入

以 DNAMAN V6 对表 2 序列进行多序列比对分析,在此基础上以软件 Oligo 6 设计仅能对驴、马获得目的扩增的特异引物,并经由 NEB Cutter 针对驴与其他物种 DNA 序列的差异选择合适的 DNA 限制性内切酶切位点。

2.3 样品处理

取本品除去表面毛发,以灭菌超纯水清洗,取约 0.1 g,再依次以 75% 乙醇 5 mL 及灭菌超纯水反复清洗至无醇味,吸干表面水分,剪细成直径约 0.5 mm 的小碎块,备用。

2.4 DNA 提取

用天根生化科技有限公司的血液/细胞/组织基因组 DNA 提取试剂盒提取总 DNA。另取等量灭菌 ddH₂O,同模板 DNA 提取法制成提取空白对照溶液。采用琼脂糖凝胶电泳和微量紫外-分光光度仪(Thermo Nanodrop 2000)检测 DNA 质量、浓度及纯度。

2.5 PCR 扩增

在 ABI Veriti PCR 仪上进行。

优化的 PCR 扩增反应体系:总体积 25 μL,其中引物(10 μmol·L⁻¹)0.5 μL, dNTPs(2.5 mmol·L⁻¹)2 μL, 10× PCR Buffer(Mg²⁺ plus)2.5 μL, Taq 酶(2.5 U·μL⁻¹)0.5 μL,模板 DNA 1 μL,其余以灭菌 ddH₂O 补充至 25 μL。另取无菌超纯水 1 μL 代替 DNA 模板,同法上述 PCR 反应操作,作为空白对照。

PCR 扩增程序:95 °C 预变性 5 min 后经过 35 个循环,每个循环包括 95 °C 30 s, 53 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 45 s,最后 72 °C 延伸 7 min。

2.6 PCR 质量控制及模板可靠性验证

为了防止污染和误差的产生,同时建立阳性对照和阴性对照,阳性对照采用预实验扩增良好的马、马骡、驴、驴骡,阴性对照分别设置了环境对照、提取空白对照、阴性提取对照(本实验室的自行提取的石菖蒲 DNA)、PCR 阴性对照,同“2.5”项下扩增。

采用通用引物 LCO1490/LCO2198^[13] 对 QT01-07 及马、马骡、驴、驴骡各 2 批进行 PCR 扩增,验证样本模板的可靠性。

2.7 BamH I 酶切反应

反应体系 30 μL,其中 PCR 产物 10 μL,加入 10× PCR 缓冲液 3 μL,限制性内切酶 BamH I 1 μL,去离子水补齐至 30 μL,将反应液置 37 °C 酶切反应

1 h,反应结束后置于 65 °C 水浴 20 min,使酶失活。

2.8 琼脂糖凝胶电泳及凝胶成像

使用 2.5% 琼脂糖凝胶检测 PCR 产物及酶切产物,75 V 电压下电泳 1.5 h,在紫外光灯下观察,并用凝胶电泳图像分析系统 SYNGENE 拍照并保存结果。

3 结果与分析

3.1 引物与酶切位点的获得

经比对驴与其他 8 种动物的 Cytb 序列,设计了驴、马特异性的引物(图 1),再经酶切位点分析,在 614 bp 处仅驴、猪和羊有 BamH I 酶切点(图 2),故最终仅有驴能被酶切。

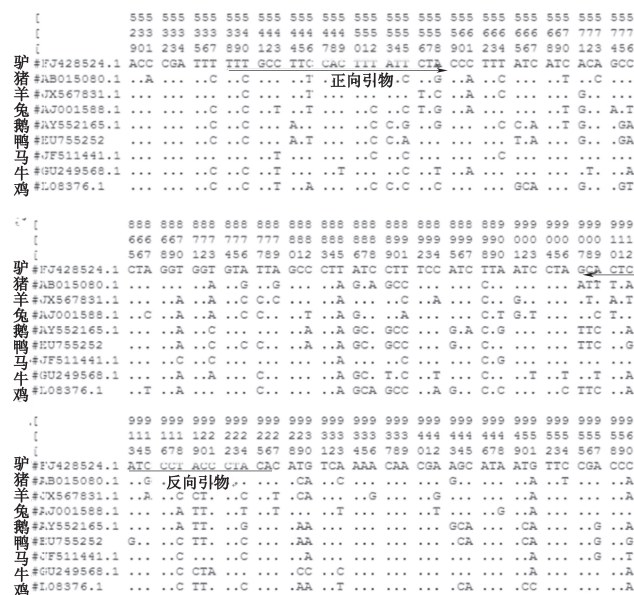


图 1 引物设计

Fig. 1 Primer design

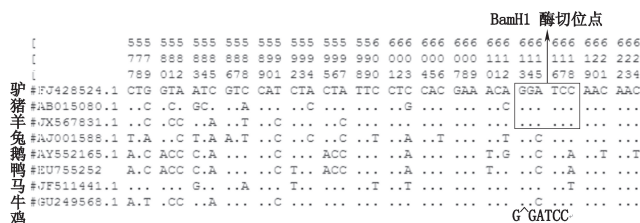
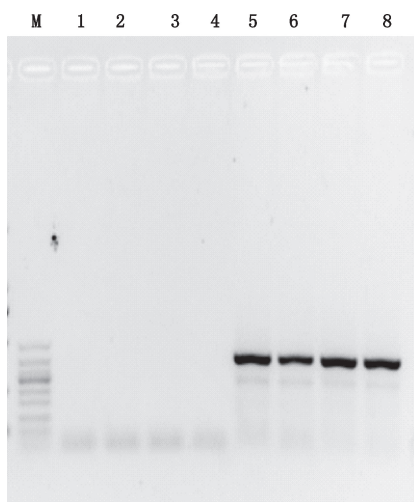


图 2 BamH I 酶切位点分析

Fig. 2 Analysis of BamH I recognition sites

3.2 PCR 质量控制及模板可靠性验证

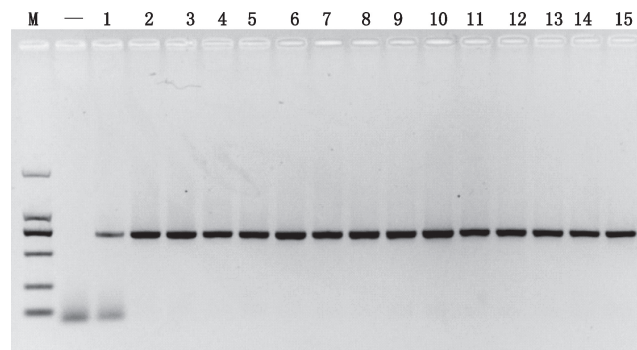
同“2.5”项下对各对照进行扩增,结果显示阳性对照均获得了约 390 bp 的目的条带,而各阴性对照均未获得目的条带(见图 3),表明已有效排除其他实验情况对结果产生的影响。



M. 凝胶电泳 DNA 分子标记 (DNA ladder 50 bp), 从上至下依次为 (from top to bottom): 500 bp、400 bp、350 bp、300 bp、250 bp、200 bp、150 bp、100 bp、50 bp
 1. 环境对照 (environment control) 2. 提取空白对照 (extraction blank)
 3. 石菖蒲 (*Acorus tatarinowii*) 4. 空白对照 (blank) 5. 马 (horse)
 6. 马骡 (mule) 7. 驴 (donkey) 8. 驴骡 (hinny)

图3 PCR 质量控制结果
 Fig. 3 Quality control of PCR

通用引物 LCO1490/LCO2198 对 QT01-07 及马、马骡、驴、驴骡各 2 批进行 PCR 扩增, 结果均获得约 710 bp 的目的产物 (见图 4), 表明样本模板可靠。



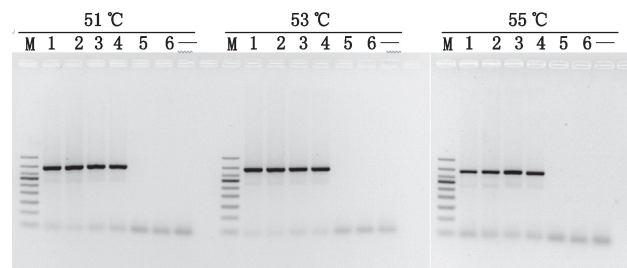
M. 凝胶电泳 DNA 分子标记 (DL 2000), 从上至下依次为 (from top to bottom): 2 000 bp、1 000 bp、750 bp、500 bp、250 bp、100 bp
 1. 鹅 (goose) 2. 鸭 (duck) 3. 羊 (goat) 4. 鸡 (brood) 5. 猪 (pig)
 6. 兔 (rabbit) 7. 牛 (cattle) 8、9. 马 (horse) 10、11. 马骡 (mule)
 12、13. 驴 (donkey) 14、15. 驴骡 (hinny) “-” 为空白 (blank)

图4 模板可靠性验证结果
 Fig. 4 Validation of the template reliability

3.3 PCR 反应体系的建立

3.3.1 退火温度考察 分别设置退火温度为 51、53 及 55 °C, 考察不同退火温度对扩增的影响, 筛选最佳退火温度。结果表明退火温度在 51~55 °C 时, 驴、驴

骡、马、马骡均可扩增出约为 390 bp 的特异性片段, 猪、牛均为阴性 (见图 5)。综合考虑到不同实验室 PCR 仪及操作可能具有差异性, 本研究选择退火温度为 53 °C。



M. 凝胶电泳 DNA 分子标记 (DNA ladder 50 bp), 从上至下依次为 (from top to bottom): 500 bp、400 bp、350 bp、300 bp、250 bp、200 bp、150 bp、100 bp、50 bp
 1. 马 (horse) 2. 马骡 (mule) 3. 驴 (donkey) 4. 驴骡 (hinny) 5. 猪 (pig) 6. 牛 (cattle) “-” 为空白 (blank)

图5 退火温度对鉴别结果的影响
 Fig. 5 Effect of annealing temperature on the PCR result

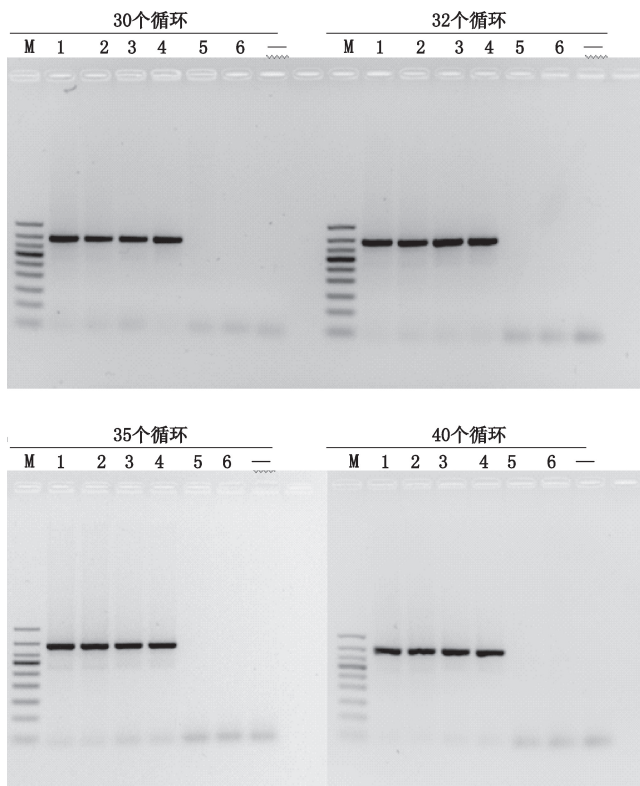
3.3.2 循环次数考察 分别选用 30、32、35 和 40 个循环进行考察, 筛选最适扩增循环次数, 结果表明 30 个循环时就能扩增出目的条带 (见图 6), 为保证结果的准确性, 避免扩增循环数过多导致可能的非特异性条带的扩增, 同时考虑到不同实验室操作可能具有差异性, 故循环次数选择为 35 个循环进行 PCR 反应。

3.3.3 DNA 模板量考察 对 25 μL PCR 体系中的模板 DNA 用量进行了考察, 调整 DNA 质量浓度约 20 ng · μL⁻¹, 分别设置 0.5 μL (相当于 10 ng)、1 μL (相当于 20 ng)、2.5 μL (相当于 50 ng) 以及 4 μL (相当于 80 ng) 量的 DNA 模板, 结果表明 0.5~4 μL (相当于 10~80 ng 总 DNA) 均能扩增, 并且, 在循环数足够 (30 个循环) 的情况下, 随着 DNA 浓度的增加, 扩增条带亮度呈逐渐增加的趋势, 但浓度变化不影响鉴别结果的判读 (见图 7)。

3.4 方法的耐受性实验

3.4.1 不同 PCR 仪考察 分别用 SensQuest GmbH、ABI Veriti 以及 BIO RAD T100 型基因扩增仪进行 PCR 扩增, 结果表明在不同品牌 PCR 仪上的扩增条带基本一致, 均不影响 PCR 鉴别结果的判定 (见图 8)。

3.4.2 不同 Taq 酶考察 为考察不同保真度的酶对鉴别结果的影响, 分别使用普通 Taq 酶 (TIANGEN 公司)、高度保真的 HS 酶普通缓冲液 (Takara 公司)、

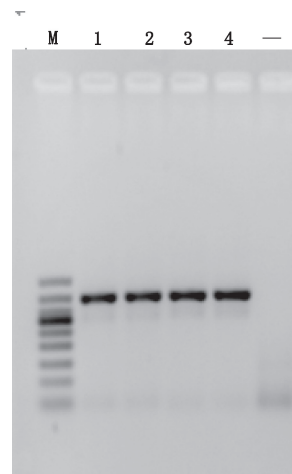


M. 凝胶电泳 DNA 分子标记 (DNA ladder 50 bp), 从上至下依次为 (from top to bottom): 500 bp、400 bp、350 bp、300 bp、250 bp、200 bp、150 bp、100 bp、50 bp

1. 马 (horse) 2. 马骡 (mule) 3. 驴 (donkey) 4. 驴骡 (hinny) 5. 猪 (pig) 6. 牛 (cattle) “-” 为空白 (blank)

图 6 不同循环数 PCR 扩增的结果

Fig. 6 The PCR products amplified with different cycle numbers



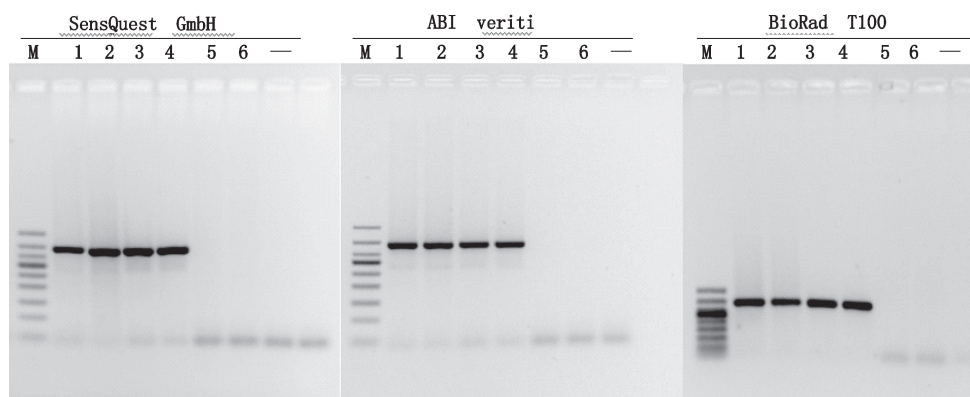
M. 凝胶电泳 DNA 分子标记 (DNA ladder 50 bp), 从上至下依次为 (from top to bottom): 500 bp、400 bp、350 bp、300 bp、250 bp、200 bp、150 bp、100 bp、50 bp

1. 10 ng 2. 20 ng; 3. 50 ng 4. 100 ng “-” 为空白 (blank)

图 7 不同模板量的 PCR 扩增结果

Fig. 7 The PCR products amplified using different template amounts.

高度保真的 HS 酶 GC 缓冲液 (Takara 公司)、High Fidelity PCR Master (Roche 公司) 和 Phanta Super-Fidelity DNA Polymerase (Vazyme 公司) 进行试验, 结果表明同一种酶由于缓冲液的不同而扩增条带的亮度有明显的差异, 除使用高度保真的 HS 酶 GC 缓冲液时不太理想外, 其他酶都能获得有效扩增 (见图 9),

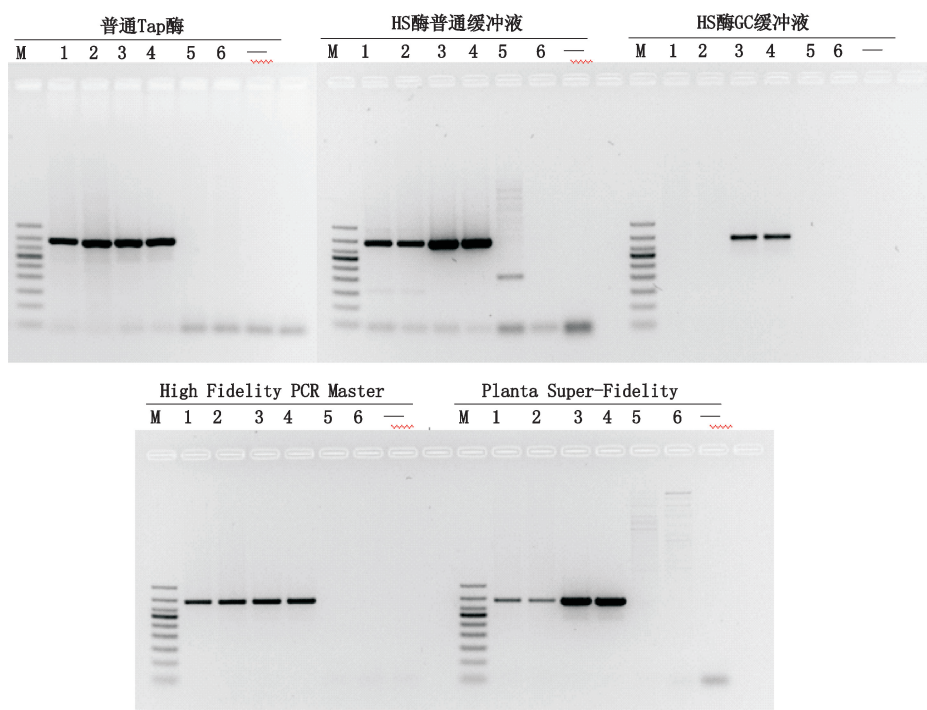


M. 凝胶电泳 DNA 分子标记 (DNA ladder 50 bp), 从上至下依次为 (from top to bottom): 500 bp、400 bp、350 bp、300 bp、250 bp、200 bp、150 bp、100 bp、50 bp

1. 马 (horse) 2. 马骡 (mule) 3. 驴 (donkey) 4. 驴骡 (hinny) 5. 猪 (pig) 6. 牛 (cattle) “-” 为空白 (blank)

图 8 不同 PCR 仪的 PCR 扩增

Fig. 8 The PCR products amplified on different PCR systems



M. 凝胶电泳 DNA 分子标记 (DNA ladder 50 bp), 从上至下依次为 (from top to bottom): 500 bp、400 bp、350 bp、300 bp、250 bp、200 bp、150 bp、100 bp、50 bp

1. 马 (horse) 2. 马骡 (mule) 3. 驴 (donkey) 4. 驴骡 (hinny) 5. 猪 (pig) 6. 牛 (cattle) “-” 为空白 (blank)

图 9 不同酶的 PCR 扩增

Fig. 9 The PCR products amplified using different enzymes

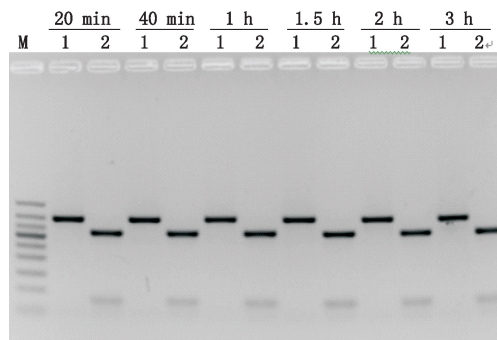
但以普通国产 Taq 酶的结果较稳定。为了确保结果的准确性,并兼顾经济适用性,故选择普通国产 Taq 酶进行实验。

3.5 酶切时间的考察

参考 *BamH I* 内切酶说明书,反应体系 30 μL ,其中 PCR 产物 10 μL ,加入 10 \times PCR 缓冲液 2 μL ,限制性内切酶 *BamH I* 1 μL ,去离子水补齐至 30 μL ,对 LP 01、MP 01 的 PCR 产物 37 $^{\circ}\text{C}$ 分别酶切 20、40、60、90、120、180 min 后,置 65 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 20 min,使酶失活。结果表明 6 个时间点的酶切产物较为一致 (见图 10),即可对可酶切的驴皮 PCR 产物均已酶切完全。为了确保结果的准确性,故选择酶切时间为 1 h 进行实验。

3.6 特异性鉴别结果

3.6.1 PCR 扩增结果 采用上述所确定的最佳反应体系和反应参数,总体积 25 μL ,其中包括引物 (10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 0.5 μL , dNTPs (2.5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 2 μL , 10 \times PCR Buffer (Mg²⁺ plus) 2.5 μL , Taq 酶 (TIANGEN 公司, 2.5 U $\cdot \mu\text{L}^{-1}$) 0.5 μL , 模板 DNA 20 ng,其余以灭菌 ddH₂O 补充至 25 μL 。PCR 反应参数: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min 后经过 35 个循环,每个循环包括



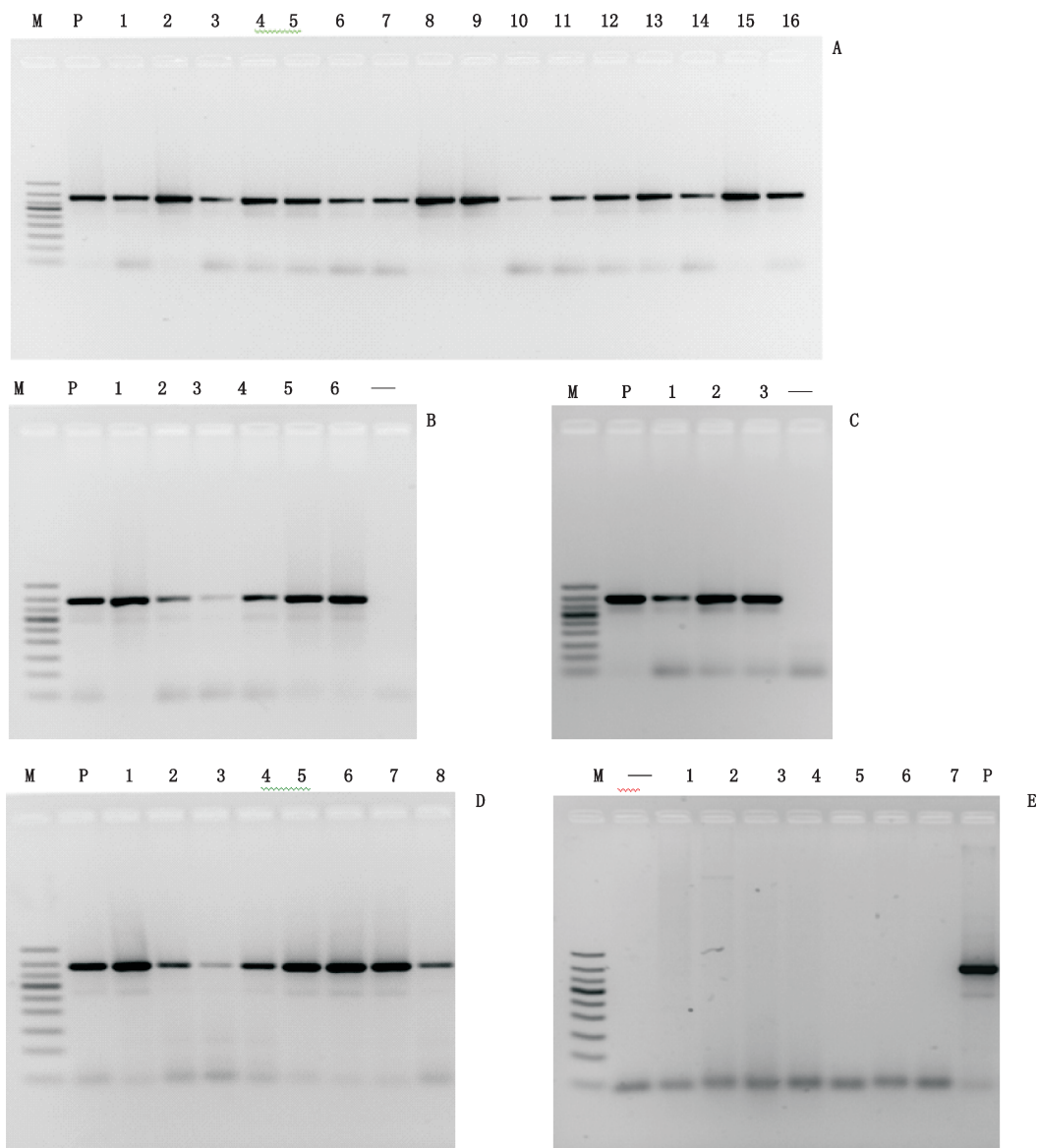
M. 凝胶电泳 DNA 分子标记 (DNA ladder 50 bp), 从上至下依次为 (from top to bottom): 500 bp、400 bp、350 bp、300 bp、250 bp、200 bp、150 bp、100 bp、50 bp

1. MP01 2. LP01

图 10 不同酶切时间的酶切结果

Fig. 10 Agarose gel electrophoresis of samples with different enzyme digestion time

95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 53 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 45 s, 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。使用收集的 40 批样品对所建立的 PCR 鉴别体系进行特异性考察和验证,结果表明,所有驴、驴骡、马、马骡均可扩增出约为 390 bp 的特异性片段 (见图 11-A、B、C、D),在所研究的猪、牛等 7 个物种均为阴性扩增 (见图 11-E)。



M. 凝胶电泳 DNA 分子标记 (DNA ladder 50 bp), 从上至下依次为 (from top to bottom): 500 bp、400 bp、350 bp、300 bp、250 bp、200 bp、150 bp、100 bp、50 bp; “-” 为空白 (blank)

A. P. MP01 1~16. LP 01~16 B. P. LP 01 1~6. MP 01~06 C. P. MP 011~3. LL 01~03 D. P. LP 01 1~8. ML 01~08 E. 1~7. QT 01~07 P. LP 01

图 11 特异性引物对所有样本的 PCR 扩增结果

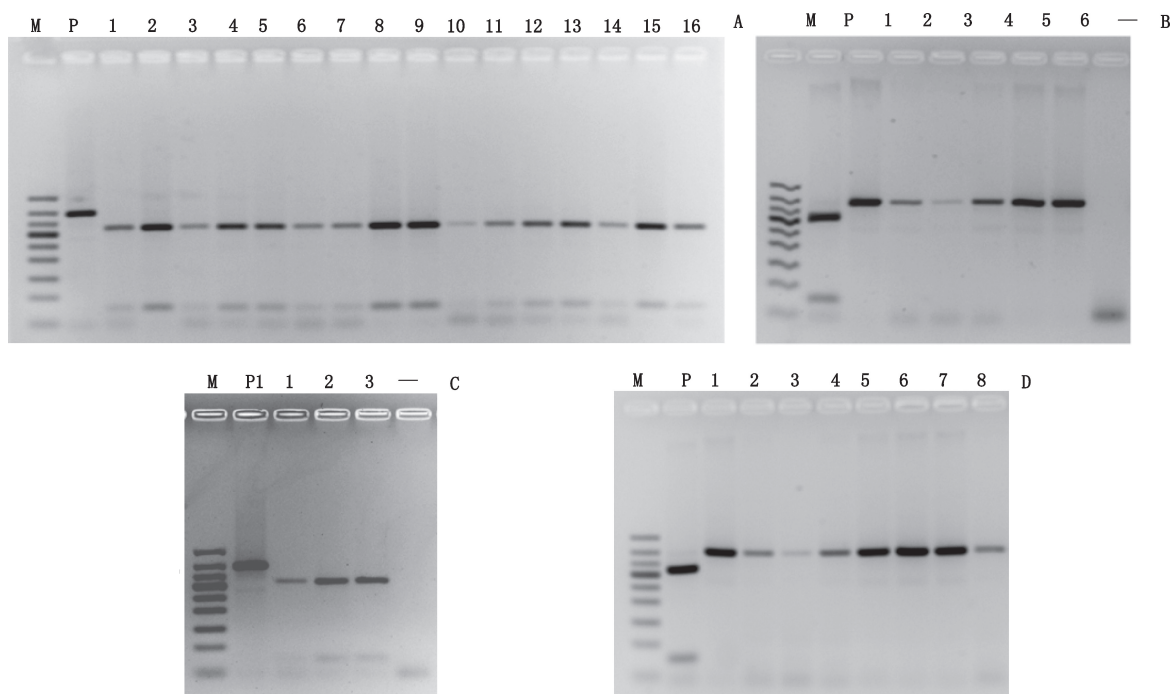
Fig. 11 Agarose gel electrophoresis of PCR amplification for all samples

3.6.2 *BamH I* 酶切结果分析 采用 30 μL 酶切反应体系, 其中 PCR 产物 10 μL , 加入 $10\times$ PCR 缓冲液 2 μL , 限制性内切酶 *BamH I* 1 μL , 去离子水补齐至 30 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 分别酶切 1 h 后, 置于 65 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 20 min。对“3.6.1”项下 33 份阳性 PCR 产物进行酶切。结果表明, 酶切之后, 所有驴、驴骡样品在凝胶图上均在 50~350 bp 出现 2 个片段 (约 76 bp 和 314 bp) (见图 12-A、C), 马、马骡样品的条带大小和数量在酶切

前后没有改变, 即不能被 *BamH I* 切割 (见图 12-B、D), 结果均与预期一致。

4 讨论

作为阿胶原料的驴皮商品来源复杂, 质量参差不齐, 以传统方法鉴别非常困难。把好原料关对于提高阿胶及其制品质量, 规范药品的市场竞争行为, 都具有积极深远的意义。本研究将现代分子生物技术应用传统中药材的鉴定, 通过运用 PCR-RFLP 法成



M. 凝胶电泳 DNA 分子标记 (DNA ladder 50 bp), 从上至下依次为 (from top to bottom): 500 bp、400 bp、350 bp、300 bp、250 bp、200 bp、150 bp、100 bp、50 bp “-” 为空白 (blank);

A. P. MP 01 1~16. LP 01~16 B. P. LP 01 1~6. MP 01~06 C. P. MP 011~3. LL 01~03 D. P. LP 01 1~8. ML 01~08

图 12 所有阳性 PCR 产物的 *Bam*HI 酶切结果

Fig. 12 Agarose gel electrophoresis of the results of *Bam*HI incubation with the positive PCR products

功地将阿胶原料驴源性成分加以鉴别。方法简便、准确、稳定,可快速检测大量样品。为控制阿胶产品原料质量提供可靠方法,有利于保证用药安全。

马和驴在正反交中,受精卵的核基因相同,由马的 32 条染色体和驴的 31 条染色体提供;受精卵的质基因不同,马骡主要由母马卵细胞的线粒体提供,驴骡主要由母驴卵细胞的线粒体提供^[14]。故本文以 *Cytb* 基因为目标基因的研究可鉴别源性成分,可成功排除掺杂马皮、马骡的风险。本研究中,驴骡与驴的鉴定结果一致。目前尚未能见对二者有效鉴别的报道。驴骡由于个头小,商品市场驴骡皮较为少见,作为阿胶原料应用的可能性较小。但为确保原料来源的唯一性,下一步课题组拟针对核基因进行研究,结合本文研究结果,能同时检测到马的核基因者为驴骡,反之则为驴,以进一步将驴骡与驴加以鉴别。

参考文献

[1] 中国药典 2015 年版. 一部[S]. 2015: 189
ChP 2015. Vol I [S]. 2015: 189
[2] 宋怡敏,毛跟年,黄晓双,等. 阿胶泡腾颗粒对小鼠造血功能及抗疲劳作用的影响[J]. 动物医学进展, 2011, 32(10): 83

SONG YM, MAO GN, HUANG XS, *et al.* Study on hemopoiesis and anti-fatigue effects of Ejiao effervescent granules in mice [J]. *Prog Vet Med*, 2011, 32(10): 83
[3] 吴宏忠,杨帆,崔书亚,等. 阿胶酶解成分对贫血小鼠造血系统的保护机制[J]. 华东理工大学学报(自然科学版), 2008, 34(1): 47
WU HZ, YANG F, CUI SY, *et al.* Fractions prepared from digested Colla Corii Asini and its hematopoietic mechanism on the anemic mice [J]. *J East China Univ Sci Technol (Nat Sci Ed)*, 2008, 34(1): 47
[4] 张珣,王静凤,李冰,等. 阿胶对小鼠免疫功能的影响[J]. 食品工业科技, 2011, 32(11): 400
ZHANG X, WANG JF, LI B, *et al.* Effect of Ejiao on immune function in mice [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2011, 32(11): 400
[5] 路承彪,童秋声,吴钧. 中药阿胶对正常小鼠细胞免疫学功能的影响[J]. 中药药理与临床, 1991, 7(4): 25
LU CB, TONG QS, WU J. The effect of Ejiao on cellular immunological function of normal mice [J]. *Pharmacol Clin Chin Mater Med*, 1991, 7(4): 25
[6] 刘培民,蔡宝昌,解锡军,等. 阿胶含药血清对白血病 K562 细胞 P53 基因表达的影响[J]. 中药药理与临床, 2005, 21(6): 33
LIU PM, CAI BC, XIE XJ, *et al.* Effect of medicine serum of Ejiao on P53 gene expression of the leukemia K562 cells [J]. *Pharmacol Clin Chin Mater Med*, 2005, 21(6): 33

- [7] 赵福东,董竞成,崔焱,等. 阿胶对哮喘大鼠气道炎症及外周血 I 型 / II 型 T 辅助细胞因子的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2006, 12 (6): 59
ZHAO FD, DONG JC, CUI Y, *et al.* The effect of Ejiao on airway inflammation and Th1/Th2 Cytokines in serum of asthmatic rats [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*, 2006, 12 (6): 59
- [8] 佟艳霞. 浅议中药阿胶的临床应用及药理作用 [J]. 中国卫生产业, 2013, 10 (3): 178
TONG YX. Clinical application and pharmacological effects of Colla Corii Asini [J]. *China Health Ind*, 2013, 10 (3): 178
- [9] 吴长虹,王若光. 阿胶的历史沿革,研究现状及相关思考 [J]. 湖南中医药大学学报, 2009, 28 (6): 77
WU CH, WANG RG. Review on history, chemical compositions and pharmacological actions of Ejiao [J]. *J TCM Univ Hunan*, 2009, 28 (6): 77
- [10] 许兆君,廖想想,杨章平,等. 我国家驴遗传资源现状分析 [J]. 中国草食动物科学, 2012, 32 (4): 70
XU ZJ, LIAO XX, YANG ZP, *et al.* Analysis on present genetic resources of Chinese ass [J]. *China Herbivore Sci*, 2012, 32 (4): 70
- [11] 瞿海斌,杨海雷,程翼宇. 近红外漫反射光谱法快速无损鉴别阿胶真伪 [J]. 光谱学与光谱分析, 2006, 26 (1): 60
QU HB, YANG HL, CHENG YY. Fast and nondestructive discrimination of donkeyhide glue by near-infrared spectroscopy [J]. *Spectrosc Spect Anal*, 2006, 26 (1): 60
- [12] 李丽娟,袁晓龙. 源性成分鉴别检测技术研究进展 [J]. 动物医学进展, 2015, 36 (5): 107
LI LJ, YUAN XL. Research progress of identification techniques for animal-derived materials [J]. *Prog Vet Med*, 2015, 36 (5): 107
- [13] FOLMER O, BLACK M, HOEH W, *et al.* DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates [J]. *Mol Mar Biol Biotechnol*, 1994, 3 (5): 294
- [14] 蒋军. 浅析骡子的遗传特征和繁育能力 [J]. 科学教育, 2008, 14 (1): 76
JIANG J. Analysis of genetic characteristics and breeding ability of mule [J]. *Sci Educ*, 2008, 14 (1): 76

(本文于 2016 年 2 月 23 日收到)