

应用微芯片电泳仪 MultiNA 鉴定中药材 蕲蛇

MultiNA-025

摘要: 本文应用 2015 版《中国药典》中的蕲蛇特异性引物对蕲蛇中药材裂解后的消化产物进行 PCR 扩增反应, 通过微芯片电泳 MultiNA 检测扩增产物, 结果显示其凝胶图谱中不仅在 300-400 bp 之间有单一条带, 电泳图谱中还能得到片段尺寸信息。本实验表明, 相比传统的琼脂糖凝胶电泳, MultiNA 同样适用于《中国药典》中规定的利用聚合酶链式反应法 (PCR) 对中药材蕲蛇的鉴定, 而且分辨率更高、检测更加灵敏、操作简便、快速、全自动化分析, 通量更高, 是中药材品种鉴定的有力分析方法。

关键词: MultiNA PCR 蕲蛇 中药材 品种鉴定

中药是中国传统的药材, 中国药文化源远流长、博大精深, 种类繁多, 来源广泛。外观相似的不同品种的中药材可能疗效相差甚远, 价格也有较大差异, 甚至某些不法商家为谋取不当利益, 故意进行掺混或掺假。传统的中药材鉴别方法如感官识别、性状鉴定、显微鉴定和理化鉴定等存在一定局限性, 为保证中药材临床用药安全、准确和有效, 2015 版

《中国药典》中规定利用聚合酶链式反应法对一些方剂中药品种的来源, 以及易混淆的不同品种中药材如川贝母、蕲蛇、乌梢蛇等进行鉴别。为此, 这里应用 PCR 的方法, 结合岛津微芯片电泳仪 MultiNA 实现了对蕲蛇药材的快速检测。相比药典中规定的琼脂糖凝胶电泳检测的方法, 此方法操作简单, 分辨率更高, 可快速实现中药材品种的鉴别。

■ 实验部分

1.1 仪器

微芯片电泳 MCE-202 MultiNA

1.2 试剂

Ampdirect® Plus (Shimadzu, S241-08800-99)

IMMOLASE™ DNA Polymerase (Bioline, BIO-21046)

SYBR® Gold Nucleic Acid Gel Stain (Invitrogen, S-11494)

DNA-500 Reagent Kit for MultiNA (Shimadzu, 292-27910-91)

25 bp DNA Ladder (Invitrogen, 10597-011)

样品: 蕲蛇 (中药材)

引物: 引物序列来自 2015 版《中国药典》, 由生工生物公司合成。具体引物信息见表 1。

表 1 蕲蛇 PCR 扩增引物序列

引物	序列	PCR 理论产物大小 (bp)
正向引物	5' -GGCAATTCACACAGCCAACATCAACT-3'	343
反向引物	5' -CCATAGTCAGGTGGTTAGTGATAC-3'	

1.3 分析条件

DNA-500 on-chip。

1.4 实验方法

取适量中药材蕲蛇样品进行液氮研磨，称取 100 mg 粉末加入 1 mL 细胞裂解液（0.5% SDS, 400 mM NaCl, 0.1 M EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH 8.0）和 5 μ L 蛋白酶 K（20 μ g/ μ L），混匀后 55°C 孵育 30 min，取消化产物进行 PCR 扩增反应，PCR 反应体系及反应条件分别见表 2 及表 3。为了验证测量的准确性，实验中设计了阴性对照，阴性对照不加入 DNA 模板。PCR 产物进入微芯片电泳仪 MultiNA 进行测定。根据理论产物片段大小，选用 DNA-500 的试剂盒进行检测。

表 2 PCR 反应体系

反应试剂	使用量 (μ L)
Ampdirect® Plus (2 \times)	10
PCR Forward Primer (10 μ M)	1
PCR Reverse Primer (10 μ M)	1
模板 (消化产物)	0.2
IMMOLASE™ DNA Polymerase (5U/ μ L)	0.1
dH ₂ O (灭菌蒸馏水)	7.7
总体积	20

表 3 PCR 反应条件

作用	温度 / $^{\circ}$ C	时间
预变性	94	10 min
扩增 (35 个循环)		
变性	94	30 s
退火	58	30 s
延伸	72	30 s
循环后延伸	72	7 min

结果讨论

图 1 是使用蕲蛇特异性引物进行 PCR 扩增后，应用 MultiNA 对扩增产物进行检测的凝胶图，从图上可以看到，只有蕲蛇样品在目的片段大小附近有明显条带，阴性对照没有条带。图 2 是蕲蛇样品检测的电泳图，图上显示出 349 bp 的信号峰，与理论大小 343 bp 接近，考虑到仪器在 DNA-500 on-chip 模式下具有 5% 的误差，结果合理，说明使用蕲蛇特异性引物成功鉴定蕲蛇样品。

2015 版《中国药典》中规定对蕲蛇样品进行 PCR 扩增后，需按照琼脂糖凝胶电泳法进行电泳检测，供试品凝胶电泳图谱中，在与对照药材凝胶电泳图谱相应的位置上，在 300-400 bp 之间应有单一 DNA 条带。相比传统的琼脂糖凝胶电泳法，利用 MultiNA 对 PCR 产物进行检测，不仅成功在 300-400 bp 之间显示出单一一条带，还能够通过电泳图得到片段的尺寸信息，灵敏度高，为通过片段尺寸大小鉴别不同种类的中药材提供可能。MultiNA 操作简便，全自动化分析，相比传统的电泳方法，适用于高通量的中药材样品检测。

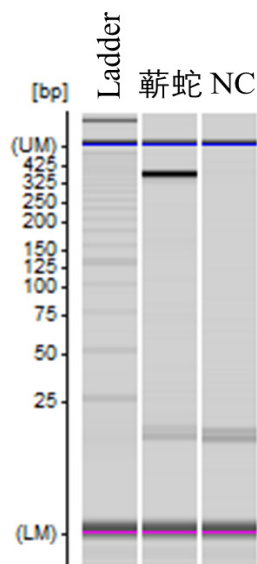


图 1 蕪蛇样品 MultiNA 检测凝胶图 (NC: 阴性对照)

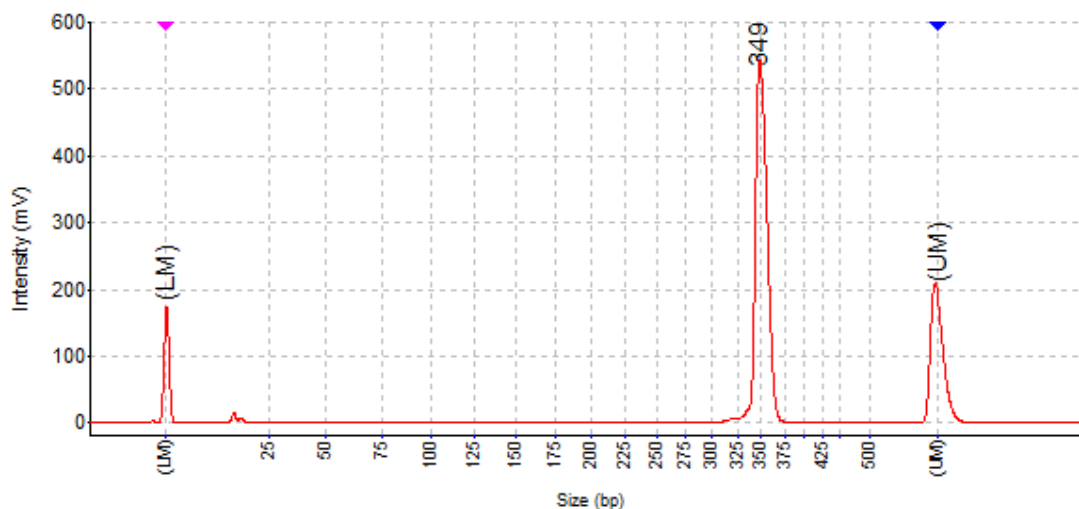


图 2 蕪蛇样品 MultiNA 检测电泳图

■ 结论

本文基于分子生物学技术，采用岛津公司微芯片电泳仪 MultiNA 成功对中药材蕪蛇进行鉴定，不仅在凝胶电泳图谱中 300-400 bp 之间有单一条带，还能通过电泳图得到片段尺寸信息，误差在 5% 以内。此方法相比传统的琼脂糖凝胶电泳，更加高效、灵敏，分辨率高，操作简便，全自动化分析，通量高，是中药材品种鉴定有力的分析方法。