

利用Nested PCR-DNA定序方法鑑定中藥製劑中石菖蒲藥材成分

呂康祖 徐曉玫 羅吉方 林哲輝

第三組

摘要

石菖蒲藥材基原在中華中藥典記載為*Acorus gramineus* Soland.之乾燥根莖，而《中華人民共和國藥典》2005版一部記載本品為*Acorus tatarinowii* Schott.的乾燥根莖，因此本研究是以*Acorus gramineus*及*Acorus tatarinowii*的ITS (internal transcribed spacer)序列設計引子，用以鑑定市售石菖蒲中藥製劑中所含石菖蒲成分。檢體以擴增ITS1-5.8S RNA- ITS2序列所設計的引子進行Nested PCR後，無法有DNA片段形成。另重新設計引子，改以僅擴增檢體ITS2片段，經Nested PCR之後，能夠獲得DNA片段產物，將產物定序並分析比對DNA序列，可以獲得鑑定結果。結果顯示，12件市售石菖蒲中藥製劑檢體中，10件檢體檢出石菖蒲成分為*Acorus gramineus*，1件檢出為*Acorus tatarinowii*，而有1件未能檢出石菖蒲成分。

關鍵詞：石菖蒲、Nested PCR、DNA定序、鑑定

前言

中華中藥典記載本品為天南星科Araceae植物石菖蒲*Acorus gramineus* Soland.之乾燥根莖，而《中華人民共和國藥典》2005版一部記載本品為天南星科多年生草本植物石菖蒲*Acorus tatarinowii* Schott.的乾燥根莖。主產於四川、浙江、江蘇等地。秋、冬二季採挖，除去葉、鬚根及泥砂，曬乾或鮮用。

石菖蒲藥用之記載，始見於《神農本草經》，列為上品，其藥效在《本經》上記載：「主風寒濕痺，咳逆上氣，開心孔，補五臟，明耳目，出音聲。久服經身，不忘，不迷惑、延年。」在《本草綱目》記載：「治中惡卒死，竄忤癲，下血崩中，安胎漏，散癰腫。」另外在《本草從新》上有：「辛苦而溫，芳香而散，開心孔，利九竅，明耳目，發聲音，去濕除風，逐痰消積，開胃寬中，療噤口毒痢。」的敘述。現代研究上，石菖蒲萃取物可以用在農業上，有抗

植物致病真菌的效果^(1,2)，在醫學研究上，石菖蒲有抑制黑色素形成⁽³⁾、抗癲癇⁽⁴⁾及抑制抗藥病菌抗藥性⁽⁵⁾的效果。

因石菖蒲的藥材基原有*Acorus gramineus*及*Acorus tatarinowii*兩種，本研究將以兩種植物的ITS相同序列部分設計2對引子，供Nested PCR使用，擴增植物核糖體基因的ITS (internal transcribed spacer)序列作為鑑別標記，比對GenBank上之序列資料，作為鑑定結果。研究結果將建立中藥製劑中石菖蒲的鑑定方法，作為中藥材、中藥製劑管理的依據。

材料與方法

一、材料

(一)檢體

1. 藥材：共2件，為石菖蒲參考藥材。
2. 製劑：共12件，單方製劑檢體2件，10件複方製劑。

(二)試藥

1. 一般化學藥品：購自Sigma (Sigma, St. Louis, MO, U.S.A.)、Merck (Merck, Darmstadt, Germany)、Amresco (Ohio, U.S.A.)。
2. PCR純化套組：GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit購自GE Healthcare (Buckinghamshire, UK)。
3. DNA聚合反應試劑：PCR Master Mix 5X (Taq polymerase 1.25U, dNTP 200 μ M, reaction buffer)購自GeneMark (Bio Basic, Canada)。
4. 引子：購自百力(臺灣)，確認參考藥材序列時以普遍性引子(universal primer) 18F1 (5'-GTGA ACCTGCGGAAGGATC-3')、28R (5'-CCGCCTG ACCTGRGGTC-3', R= A/G)。擴增石菖蒲ITS2序列設計之引子為PCR時用AgR (5'-AGGCATCCGAC-GCCRGAG-3')、AgIF1 (5'-GAGACCCATCGGGTCGAG-3')，Nested PCR用AgR1 (5'-AGGGACTCTGCCTCTCAG-3')及AgIF2(5'-TCA CGCCTTCCGTCGCTC-3')。
5. 瓊脂膠體：Agarose B Low EEO購自Gene Mark (Bio Basic, Canada)。
6. 100 bps ladder marker及6倍載入膠片緩衝液：GeneMark (Bio Basic, Canada)。

(三)器材

1. 迷你電泳槽及鑄膠器(Mupid II, Cosmo Bio, Chuo-Ku, Tokyo, Japan)。
2. 聚合酶連鎖反應器(Gradient Palm-cycler, Corbett Research Co., Australia and Astec PC320, Astec株式會社, Japan)。
3. 影像系統(ImageQuant 300, GE Healthcare, UK)。

二、方法

(一)DNA萃取與純化

DNA萃取與純化方法是依照本局已發表的論文“Identification of Saposhinkoviae Radix in Concentrated Chinese Medicine Preparations by Nested PCR and DNA Sequencing Methods”⁽⁴⁾的方法進行，將檢體藥材及製劑檢體磨碎

或切碎，稱取100 mg置於2 mL微量離心管中搗碎，加入1 mL之lysis buffer (100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 100 mM EDTA, 1% N-lauroyl sarcosine sodium salt, and 1 mg/mL proteinase K)，56°C水浴1小時。加入與溶液等體積之phenol : chloroform : isoamyl alcohol (25 : 24 : 1; v/v/v)，混合萃取，以12000 \times g離心5分鐘。離心後取水層，加入65°C預熱的CTAB-NaCl溶液(10% hexadecyltrimethylammonium bromide in 0.7 M NaCl)，使CTAB濃度大於1%，加入NaCl溶液使濃度大於0.7 M，混合後置於65°C水浴15分鐘，加入等體積之chloroform : isoamyl alcohol (24 : 1; v/v)，混合萃取，以12000 \times g離心5分鐘。離心後取水層，加入0.7倍體積之isopropanol及1/10倍體積之3 M sodium acetate_(aq)，以12000 \times g離心5分鐘。離心後倒去上清液，使沉澱物風乾後，加入50 - 100 μ L之無菌水溶解。以PCR純化套組純化檢體DNA後，DNA溶液供PCR與Nested PCR之用。

(二)PCR與Nested PCR

標準藥材以2 μ L DNA溶液作模板，25 μ M primer 18F1、28R 各0.5 μ L進行PCR，條件為94°C/30 sec，58°C/30 sec，72°C/30 sec共40 cycles。以GenBank石菖蒲ITS2序列設計之引子時，取4 μ L DNA溶液作模板，25 μ M primer AgR、AgIF1各0.5 μ L進行PCR，條件為94°C/30 sec，56°C/30 sec，72°C/30 sec共30 cycles。取第一次PCR產物取2 μ L作模板，25 μ M primer AgR1、AgIF2各0.5 μ L進行Nested PCR，條件為94°C/30 sec，58°C/30 sec，72°C/30 sec共30 cycles。

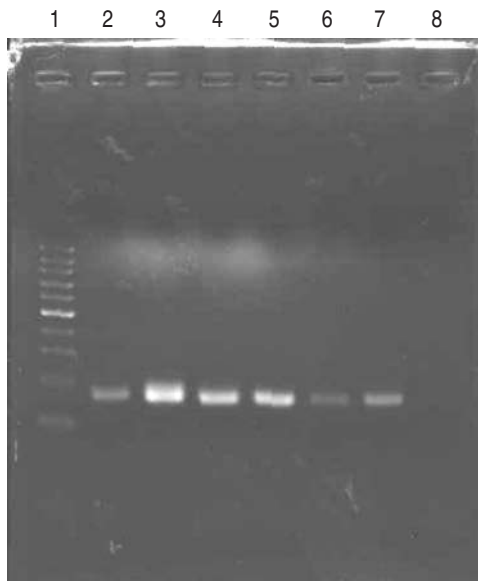
(三)電泳與定序分析

取PCR產物5 μ L，與6倍載入膠片緩衝液1 μ L混合，置入1.8 %瓊脂膠體，在電泳槽(+)極端加入0.5 μ L 10 mg/mL ethidium bromide後，進行電泳，電泳條件100V、30分鐘，以影像系統觀察，確認PCR結果，並拍攝影像。PCR結果確認後，委託明欣(台北，台灣)進行DNA定序，將定序結果與美國國家衛生院之

GenBank資料庫進行序列比對，得到鑑定結果。

結果與討論

自大陸收集石菖蒲藥材兩件參考藥材，標示為*Acorus gramineus*及*Acorus tatarinowii*，分別為中華中藥典與中華人民共和國藥典的所規定之石菖蒲藥材，將藥材抽出DNA後，以普遍性引子18F1、28R做PCR擴增ITS片段並做定序分析，這兩件參考藥材所得的ITS序列不相同，與GenBank上收載之ITS序列比對，序列相似度分別為參考藥材*Acorus gramineus*與GenBank accession No.: GI 62903191 *Acorus gramineus* 僅88%，參考藥材*Acorus tatarinowii*與GenBank accession No.: GI 62903193 *Acorus tatarinowii*僅92%，但仍嘗試依據此兩種參考藥材之序列分別設計不同的引子，對石菖蒲製劑做檢測，在製劑檢體中，以*Acorus gramineus*參考藥材所設計的引子，在製劑檢體中，得不到理想的結果，而以*Acorus tatarinowii*參考藥材所設計的引子，Nested PCR後，僅有少數檢體有DNA片段形成。



圖一、以 GenBank 石菖蒲 ITS2 序列設計引子之 Nested PCR 結果電泳 Lane 1: 100 bps ladder maker, Lane 2: AgA, Lane 3: AgB, Lane 4: Ag1A, Lane 5: Ag1D, Lane 6: Ag2B, Lane 7: Ad3A, Lane 8: blank (no template)

石菖蒲成份無法由製劑檢體檢出，有可能是參考藥材基原有疑問，需要再確認，而以 GenBank 兩種石菖蒲 (GI 62903191 *Acorus gramineus* 與GI 62903193 *Acorus tatarinowii*) 的ITS1-5.8S RNA- ITS2序列所設計的引子，對製劑檢體進行Nested PCR後，仍然無法有DNA片段形成。

在製劑檢體中，也可能因為藥材本身性質影響，如藥材質地較軟，較易在製劑製作的熬煮過程破壞，因此導致藥材DNA斷裂太過，如以ITS1-5.8S RNA- ITS2序列約600 bps長度的DNA作為PCR模板，將不易有PCR產物擴增出來。因此嘗試僅選取前述GenBank中兩種石菖蒲的ITS2序列設計引子，再進行Nested PCR，終於獲致結果，Nested PCR結果電泳如圖一所示。

Nested PCR產物大小約160 bps，再將其定序並分析序列，製劑檢體序列可分為兩種，第一種是檢體Ag1A定序所得序列，序列長度159 bps，再與GenBank資料庫比對，與accession No.: GI 62903193的*Acorus tatarinowii*僅有1個base的差異，Ag1A序列及與GI 62903193序列差異位置，列示於圖二。除Ag1A外，其餘檢體序列均相同，歸類為第二種序列，序列長度161 bps，上載至GenBank進行比對，與GI 62903191 *Acorus gramineus* 的序列一致，以檢體Ag1D定序所得序列為代表，將序列列示如圖三。

所有製劑檢體的鑑定結果表列於表一，由表一中可以看出，多數檢體所含的石菖蒲基原仍是*Acorus gramineus*，只有一件Ag1A是*Acorus tatarinowii*，而另有1件檢體Ag2D在本次研究中，未能檢出石菖蒲成分，因Ag2D與另外二個可檢出的檢體Ag2A、Ag2B皆是天王補心丹，所含藥材成分相同，應不會是因為成分含有抑制PCR進行的化學成分所致，而該檢體所含之人參成分，

```
CACGCCTTCC GTCGCTCCGC GGCATCATCC CCGCCCGATG GGGGATCG
TCCCGGATGC GGATGCTGGC CCTCCGTTCC CCGTGGGCGG TCGGCTGAAA
CCCAAGGTCC GCTGCGGGTC GCGGCACGGC ATTGCGGTGG GCTGAGAGGC
AGAGTCCCT
```

圖二、石菖蒲製劑檢體 Ag1A 定序所得 ITS2 序列 (序列長度 159 bps)，反白標示部分為和 GenBank GI 62903193 *Acorus tatarinowii* 差異位置

TCACGCCTTC CGTCGCTCCG CGGCATGATC CCCC GCCCGA
 TGGCGGGGAT CGTCCCGGAT GCGGATGCTG GCCCTCCGTT
 CCCC GTGGGC GGTTCGCTGA AACCCAAGGT CCGCTGCGGG
 TCGCGGCACG GCATTGCGGT GGGCTGAGAG GCAGAGTCCC
 T

圖三、石菖蒲製劑檢體 Ag1D 定序所得 ITS2 序列 (序列長度 161 bps)，和 GenBank GI 62903191 *Acorus gramineus* 序列一致

表一、石菖蒲製劑中石菖蒲成份鑑定結果

	藥劑名	鑑定結果
AgA	石菖蒲	<i>Acorus gramineus</i>
AgB	石菖蒲	<i>Acorus gramineus</i>
Ag1A	還少丹	<i>Acorus tatarinowii</i> (-1) ¹
Ag1B	還少丹	<i>Acorus gramineus</i>
Ag1D	還少丹	<i>Acorus gramineus</i>
Ag2A	天王補心丹	<i>Acorus gramineus</i>
Ag2B	天王補心丹	<i>Acorus gramineus</i>
Ag2D	天王補心丹	-- ²
Ag3A	定志丸	<i>Acorus gramineus</i>
Ag4A	桑螵蛸散	<i>Acorus gramineus</i>
Ag4B	桑螵蛸散	<i>Acorus gramineus</i>
Ag4D	桑螵蛸散	<i>Acorus gramineus</i>

¹ 括號內數字表示檢體DNA序列與GenBank序列資料差異的base數

² "--" 表未能檢出

可經PCR檢出人參之DNA，亦排除為抽取之DNA品質不良因素所致，因此推論未檢出之原因可能有二，一是引子設計是依據*A. gramineus*及*A. tatarinowii*序列，如果Ag2D所含為其他*Acorus*同屬植物，則可能無法檢出，二是Ag2D不含有石菖蒲。

由研究結果可以看出，雖然目前檢體中，含有石菖蒲藥材的製劑仍使用*Acorus gramineus*為主，由於中華中藥典與中華人民共和國藥典記載石菖蒲基原不同，而國內所使用藥材多自大陸進口，未來產地因應中華人民共和國藥典的規定，*Acorus gramineus*的產量可能減少，而取而代之將是以*Acorus tatarinowii*為主，是否將中華人民共和

國藥典所載之*Acorus tatarinowii*列入中華中藥典規範，應多加思考。

結 論

縮短Nested PCR擴增的DNA片段長度，僅對ITS1或ITS2擴增，有利於提高實驗的敏感度，解決藥材DNA在製劑製作過程，DNA太過斷裂，而無法增測的問題。本研究中所使用鑑別石菖蒲的方法，提供檢驗中藥製劑成分的一種有力方法，更提高Nested PCR與DNA定序方法鑑定中藥製劑的可應用性。

參考文獻

1. Lee, H. S. 2007. Fungicidal property of active component derived from *Acorus gramineus* rhizome against phytopathogenic fungi. *Bioresour Technol.* 98(6): 1324-1328.
2. Lee, J. Y., Lee, J. Y., Yun, B. S. and Hwang, B. K. 2004. Antifungal activity of beta-asarone from rhizomes of *Acorus gramineus*. *J. Agric Food Chem.* 52(4): 776-780.
3. Hwang, J. H. and Lee, B. M. 2007. Inhibitory effects of plant extracts on tyrosinase, L-DOPA oxidation, and melanin synthesis. *J. Toxicol Environ Health A.* 70(5): 393-407.
4. Liao, W. P., Chen, L., Yi, Y. H., Sun, W. W., Gao, M. M., Su, T. and Yang, S. Q. 2005. Study of antiepileptic effect of extracts from *Acorus tatarinowii* Schott. *Epilepsia.* 46 Suppl 1: 21-24.
5. Kim, H., Moon, K. H., Ryu, S. Y., Moon, D. C. and Lee, C. K. 1998. Screening and isolation of antibiotic resistance inhibitors from herb materials IV-resistance inhibitors from *Anethum graveolens* and *Acorus gramineus*. *Arch Pharm Res.* 21(6): 734-737.
6. Lu, K. T., Lo, C. F., Chang, H. C. and Lin, J. H. 2005. Identification of *Saposhinkovia* Radix in concentrated Chinese medicine preparations by nested PCR and DNA sequencing methods. *J. Food and Drug Analysis.* 13: 219-224.

Identification of *Acori Graminei Rhizoma* in Chinese Medicine Preparations by Nested PCR and DNA Sequencing Methods

KANG-TSU LU, HSIAO-MEI HSU, CHI-FANG LO AND JER-HUEI LIN

Pharmacognosy Division

ABSTRACT

As recorded in Pharmacopoeia of Chinese Medicine, *Acori Graminei Rhizoma* is the dried rhizome of *Acorus gramineus* Soland. But *Acori Graminei Rhizoma* is the dried rhizome of *A. tatarinowii* Schott. in Pharmacopoeia of the People's Republic of China. In this study, Nested PCR was employed with two specific primer sets based on the DNA sequences of ITS (internal transcribed spacer) of *A. gramineus* and *A. tatarinowii* from GenBank, followed by DNA sequencing analysis for the identification of *Acori Graminei Rhizoma* in sample preparations. DNA of ITS1-5.8S RNA-ITS2 region couldn't be amplified with the primer sets from the extracted total DNA at first. We thus redesigned another primer sets targeted to ITS2 region and obtained the amplicon by nested PCR. The amplicon was sequenced and compared with GenBank database to check which *Acori Graminei Rhizoma* is in samples. The results showed that ten of twelve samples were identified as *Acorus gramineus*, one as *Acorus tatarinowii* and one without contented *Acori Graminei Rhizoma*.

Key words: *Acori Graminei Rhizoma*, nested PCR, DNA sequencing, identification