

多重位点特异性 PCR 鉴别海龙及其混伪品

刘富艳^{1,2}, 金艳¹, 袁媛^{1*}, 秦雯², 赵玉洋¹, 蒋超^{1*}

(1. 道地药材国家重点实验室培育基地, 中国中医科学院 中药资源中心, 北京 100700;
2. 北京城市学院 生物医药学部, 北京 100083)

[摘要] **目的:**建立一种高效、准确的中药材海龙及其常见混伪品的特异性聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 鉴别方法。**方法:**通过比较海龙及其混伪品的细胞色素 C 氧化酶亚基 I 基因 (cytochrome C oxidase subunit I, *CO I*) 基因序列差异, 根据变异位点设计刁海龙、尖海龙及拟海龙的特异性鉴别引物, 优化反应体系, 并对此方法进行耐受性和适用性的考察和验证。在此基础上, 将 3 对特异性引物组合, 构建多重 PCR 体系。**结果:**在多重 PCR 体系中, 刁海龙能扩增出 485 bp 片段, 尖海龙可扩增出 120 bp 片段, 拟海龙可以扩增出 240 bp 片段, 其他混伪品均无条带。所设计的特异性鉴别引物具有高度的特异性。**结论:**该文所建立的位点特异性 PCR 鉴别方法可实现海龙的准确鉴别。

[关键词] 海龙; 特异性 PCR; 分子鉴别; 混伪品

[中图分类号] R285.5; R931.74; R289; R282.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)15-0057-08

[doi] 10.13422/j.cnki.sjfx.20181136

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180315.0919.006.html>

[网络出版时间] 2018-03-15 10:40

Multiplex Allele-Specific PCR Method for Identification of *Syngnathus* and Its Adulterants

LIU Fu-yan^{1,2}, JIN Yan¹, YUAN Yuan^{1*}, QIN Wen², ZHAO Yu-yang¹, JIANG Chao^{1*}

(1. State Key Laboratory of Dao-di Herbs Breeding Base, National Resource Center for Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;
2. Department of Biomedical Sciences, Beijing City University, Beijing 100083, China)

[Abstract] **Objective:** To establish an effective and accurate specific polymerase chain reaction (PCR) identification method for herb *Syngnathus* and its common adulterates. **Method:** Based on the difference in cytochrome C oxidase subunit I (*CO I*) gene DNA sequences among *Solenognathus hardwickii*, *Syngnathoides biaculeatus*, *S. acus* and adulterants, the specific primers were designed; the reaction conditions were optimized, and the PCR method for identification was explored and verified in terms of tolerance and feasibility. The three pairs of specific primers were combined to build multiplex PCR systems. **Result:** Through the established multiplex PCR reaction system, 485, 240, 120 bp fragments were amplified from DNA templates of *S. shardwickii*, *S. biaculeatus* and *S. acus*, respectively. All the adulterants had no bands. **Conclusion:** The designed identification primers were highly specific, and the PCR amplification of specific alleles established in this paper can be used to accurately identify the *Syngnathus*.

[Key words] *Syngnathus*; PCR amplification of specific alleles; molecular identification; adulterants

[收稿日期] 20180118(011)

[基金项目] 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项 (ZZ10-008); 中央本级重大增减支项目 (2060302)

[第一作者] 刘富艳, 在读硕士, 从事中药分子鉴定研究, E-mail: 1257970496@qq.com

[通信作者] *袁媛, 研究员, 从事中药鉴定与分子生药学研究, Tel: 010-64087649, E-mail: y_yuan0732@163.com;

*蒋超, 助理研究员, 从事中药分子鉴定研究, Tel: 010-64087649, E-mail: jiangchao0411@163.com

海龙是我国传统名贵中药,来源于海龙科动物刁海龙、拟海龙、尖海龙等的干燥体。由于海龙品种众多,价格昂贵,市场上经常出现与其形态相似的混伪品^[1-2]。此前的调查研究表明,中药市场上常以宝珈海龙、黑斑刁海龙、多棘刁海龙、粗吻海龙、光粗吻海龙、短尾粗吻海龙、斗氏刁海龙及葛氏海蠋鱼等混作海龙正品药材进行出售,不仅造成了药材市场的混乱,也对临床用药安全造成了威胁^[3]。因此急需建立简单方便、准确可靠的海龙基原鉴别方法。

近年来,DNA 分子鉴别方法尤其是特异性聚合酶链式反应(PCR)鉴别方法因其操作简便、结果准确,在中药基原鉴别方面起到了越来越重要的作用^[4-9]。2010 年版《中国药典》已开始收载了蕲蛇、乌梢蛇的 PCR 鉴别方法,2015 年《中国药典》增补本已公示金钱白花蛇的快速 PCR 鉴别方法。目前已有使用 DNA 分子方法鉴别海龙药材的研究,如吴艳等^[10]探索了随机扩增多态性 DNA(RAPD)技术鉴定不同种海龙药材,为海龙药材的正确应用提供分子水平依据;GAO 等^[11]基于 12 S 序列建立了一种鉴别海龙的特异性 PCR 方法;ZHANG 等^[12]采用细胞色素 C 氧化酶亚基 I 基因(CO I)作为条形码,通过序列分析达到鉴别海龙真伪的目的。然而由于海龙为多基原中药,目前广泛应用的位点特异性 PCR 技术只能通过单个 PCR 反应鉴别药材真伪,鉴别多个基原需进行多次 PCR 反应。为达到一次 PCR 反应即可鉴别所有药用海龙的基原,需建立一种能同时鉴别多种海龙的方法。

多重 PCR 是一种能同时扩增和检测多个目的片段的方法,具有节省时间、降低成本、提高效率的优点^[13]。本文基于多重特异性 PCR 技术,通过扩增海龙及其混伪品的 CO I 基因序列并测序,结合 GenBank 数据库中收录的序列,经序列分析发现 3 种正品海龙的特异性鉴别位点,根据其鉴别位点设计了特异性鉴别 3 种正品海龙的引物,并通过影响 PCR 反应时间的退火温度,循环次数,DNA 模板量,Taq 酶浓度等因素进行优化,并对不同型号 PCR 仪和不同 Taq 酶种类进行考察,分别获得刁海龙、拟海龙、尖海龙的 PCR 反应程序,建立一种快速准确鉴别海龙的分子手段。

1 材料

1.1 药材 样本购自河北安国、安徽亳州、山东菏泽、广西玉林等药材市场以及广东汕头、辽宁丹东、广东潮州、山东青岛等地区。样品共计 117 份,其中刁海龙 20 份,拟海龙 20 份,尖海龙 22 份,海龙类伪

品共 55 份,所有样品经中国中医科学院中药资源中心金艳博士、蒋超博士鉴定,保存于中国中医科学院中药资源中心。来源信息见表 1。

表 1 海龙试验材料来源信息

Table 1 Information of Syngnathus materials in this study

序号	材料名称	拉丁名	数量/批	采集地
1	刁海龙	<i>Solenognathus hardwickii</i>	6	广西玉林
2	刁海龙	<i>S. hardwickii</i>	9	河北安国
3	刁海龙	<i>S. hardwickii</i>	5	安徽亳州
4	拟海龙	<i>Syngnathoides biaculeatus</i>	2	广西玉林
5	拟海龙	<i>S. biaculeatus</i>	10	河北安国
6	拟海龙	<i>S. biaculeatus</i>	8	安徽亳州
7	尖海龙	<i>S. acus</i>	7	安徽亳州
8	尖海龙	<i>S. acus</i>	2	广东汕头
9	尖海龙	<i>S. acus</i>	2	辽宁丹东
10	尖海龙	<i>S. acus</i>	2	广东潮州
11	尖海龙	<i>S. acus</i>	1	广东湛江
12	尖海龙	<i>S. acus</i>	1	广西北海
13	尖海龙	<i>S. acus</i>	1	广西玉林
14	尖海龙	<i>S. acus</i>	2	山东青岛
15	尖海龙	<i>S. acus</i>	1	四川成都
16	宝珈海龙	<i>Doryichthys boaja</i>	3	河北安国
17	宝珈海龙	<i>D. boaja</i>	2	山东菏泽
18	宝珈海龙	<i>D. boaja</i>	2	安徽亳州
19	宝珈海龙	<i>D. boaja</i>	1	云南昆明
20	宝珈海龙	<i>D. boaja</i>	1	广东湛江
21	宝珈海龙	<i>D. boaja</i>	1	广西玉林
22	粗吻海龙	<i>Trachyrhamphus serratus</i>	3	河北安国
23	粗吻海龙	<i>T. serratus</i>	4	山东菏泽
24	粗吻海龙	<i>T. serratus</i>	2	安徽亳州
25	粗吻海龙	<i>T. serratus</i>	1	广东汕头
26	多棘刁海龙	<i>S. spinosissimus</i>	3	河北安国
27	多棘刁海龙	<i>S. spinosissimus</i>	2	安徽亳州
28	黑斑刁海龙	<i>S. lettiensis</i>	3	河北安国
29	黑斑刁海龙	<i>S. lettiensis</i>	1	安徽亳州
30	海蠋鱼	<i>Halicampus grayi</i>	4	山东菏泽
31	海蠋鱼	<i>H. grayi</i>	2	安徽亳州
32	光粗吻海龙	<i>T. bicoarctatus</i>	6	河北安国
33	光粗吻海龙	<i>T. bicoarctatus</i>	3	山东菏泽
34	光粗吻海龙	<i>T. bicoarctatus</i>	1	安徽亳州
35	短尾粗吻海龙	<i>T. longirostris</i>	8	河北安国
36	短尾粗吻海龙	<i>T. longirostris</i>	2	山东菏泽

1.2 试剂 蛋白酶 K(美国 Promega 公司,批号 GE201-01);Ex Taq DNA 聚合酶(批号 RR001A),

SpeedSTAR HS *Taq* DNA 聚合酶(批号 RR070A), *rTaq* DNA 聚合酶(批号 R001A), 2 000 bp DNA Marker (批号 BM111-01)均购自大连 Takara 公司, *Taq* Plus DNA polymerase (上海生工生物公司,批号 SC0013); Ezup 柱式动物基因组 DNA 抽提试剂盒(上海生工生物公司,批号 B518251), *Taq* DNA polymerase (美国 Thermo Scientific 公司,批号 EP0402), 2 × T5 Super PCR Mix (北京擎科新业生物技术有限公司,批号 TSE005), 以及 Mix Green PCR 预混液 (MLAB 公司,批号 TSE101)。

1.3 仪器 Veriti™ 型 PCR 仪, GeneAmp 9700 型 PCR 仪(美国 Applied Biosystem 公司); PTC-100 型 PCR 仪, SYNGENE, SYNGENE 型凝胶成像系统 (Gene 公司); TC-512 型 PCR 仪 (上海 Techne 公司); VORTEX-2 GENIE 型漩涡震荡仪 (美国 Scientific industries 公司); Nanodrop 2000 型微量核

酸定量分析仪(美国 Thermo Scientific 公司)。

2 方法

2.1 引物设计 通过搜索 GenBank 查找刁海龙、尖海龙、拟海龙、宝珈海龙、黑斑刁海龙、多棘刁海龙、粗吻海龙、光粗吻海龙、长吻粗吻海龙、斗氏刁海龙及葛氏海蠋鱼的 CO I 基因序列,同时对刁海龙、黑斑刁海龙、多棘刁海龙、葛氏海蠋鱼使用通用引物 FishF1/R1^[14],按照标准程序进行扩增,并进行双向测序,序列经拼接后与下载的序列一起利用 Clustal W 程序进行多重序列比对,分析正品海龙及其混伪品的 CO I 基因序列差异。

使用引物设计软件 Premier Primer5.0 设计特异性鉴别引物,引物分别命名为 SHL-120F 和 SHL-120R, NHL-240F 和 NHL-240R, DHL-485F 和 DHL485R,由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。引物序列见表 2。

表 2 海龙鉴别引物及 PCR 反应条件

Table 2 Primers and PCR reaction conditions for *Syngnathus*' identification

引物名称	鉴别物种	序列(5'-3')	反应条件
Fish	通用引物	上游 TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC	94 °C 5 min, 35 cycles (94 °C 30 s, 57 °C 30 s, 72 °C 30 s), 72 °C 10 min
		下游 TAGACTTCTGGGTGCCCAAAGAATCA	
DHL-485	刁海龙	上游 TGACCAAATTTATAATGCAG	94 °C 5 min, 35 cycles (94 °C 30 s, 50 °C 20 s, 72 °C 15 s), 72 °C 7 min
		下游 CGTTAGTAGTATAGTGATAACC	
NHL-240	拟海龙	上游 ATTGATTGATCTTACCCTT	94 °C 5 min, 35 cycles (94 °C 30 s, 50 °C 20 s, 72 °C 15 s), 72 °C 7 min
		下游 ATTATGCTCACTTTGATG	
SHL-120	尖海龙	上游 TGTGAAAGATTATAAGTGAGCAAG	94 °C 5 min, 35 cycles (94 °C 30 s, 50 °C 20 s, 72 °C 15 s), 72 °C 7 min
		下游 CAATAAATAATCCGTGTTTATGAG	

2.2 基因组 DNA 提取 样品使用 70% 乙醇擦拭表面,晾干。取海龙肌肉组织样品约 30 mg,置 2 mL 离心管中,经 DNA 提取研磨仪多次研磨至粉末,按照 Ezup 柱式动物基因组 DNA 抽提试剂盒说明书提取总 DNA,采用 Nanodrop 2000 微量核酸定量分析仪测定其浓度,并根据吸光度 A_{260}/A_{280} , A_{260}/A_{230} 的值判断 DNA 提取质量,用于 PCR 反应或于 -20 °C 保存备用。通用引物对 FishF1/R1 用于 PCR 反应,以检测 DNA 质量。PCR 反应体系 25 μL,包含 10 × Fast buffer 2.5 μL, dNTPs(10 mmol·L⁻¹) 1.5 μL,上游及下游引物 0.25 μL, SpeedSTAR HS *Taq* DNA 聚合酶 0.2 μL, DNA 模板 1 μL,反应程序见表 2。

2.3 单重 PCR 扩增条件的确定 特异性 PCR 反应初始体系: PCR 反应体系 25 μL,包含 10 × Fast buffer 2.5 μL, dNTPs(10 mmol·L⁻¹) 1.5 μL,上游及下游引物 0.25 μL, Speed STAR HS *Taq* DNA 聚合

酶 0.2 μL, DNA 模板 1 μL,加灭菌蒸馏水补足至 25 μL,初始反应程序见表 2。PCR 反应结束后,取反应产物,加入 6 × Loading buffer 5 μL (Takara 公司),混匀后于溴化乙脞(EB)染色的 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测,SYNGENE 凝胶成像系统观察、成像。

使用海龙鉴别引物对对海龙正品及其常见伪品 DNA 进行扩增,分别考察了(1)退火温度 44,46,48,50 °C;(2)PCR 循环次数 31,33,35,37;(3)模板 DNA 90,30,10,3 ng;(4) *Taq* 酶 0.15,0.2,0.25,0.3 μL;(5)不同型号 PCR 仪 Veriti™ 型,ABI 9700 型,PTC-100 型 (Gene 公司),TC-512 型;(6) *Taq* 酶种类:r *Taq*,2 × *Taq* PCR Master Mix,2 × T5 Super PCR Mix,2 × Master Mix, *Taq* Plus, *Taq* DNA 以及 Mix Green PCR 预混液对 PCR 反应稳定性的影响。

2.4 方法适用性考察 采用上述条件考察后所确

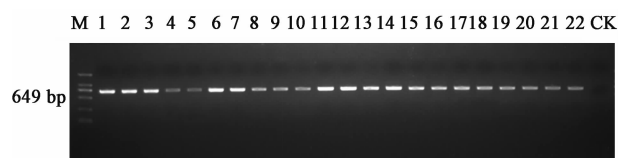
定的最佳反应体系和反应参数,进行海龙特异性 PCR 鉴别的适用性实验考察,对市场上收集的样品:刁海龙 20 批、拟海龙 20 批、尖海龙 20 批及其他 55 批混伪品药材样品进行检测鉴别,验证该体系是否能稳定准确地鉴别海龙。

2.5 多重 PCR 鉴别体系的建立 前期实验结果发现使用对应的特异性鉴别引物进行扩增,刁海龙、拟海龙、尖海龙在 44 ~ 50 °C 时分别能扩出约 485, 240, 120 bp 大小的条带,以此为基础构建多重 PCR 反应体系及条件,对退火温度、循环数进行进一步调校,确定多重位点特异性 PCR 鉴别条件。反应体系为 25 μL: 10 × PCR buffer 2.5 μL, dNTPs 混合液 (10 mmol·L⁻¹) 1.5 μL, 上下游引物 2.4 μL (各 0.4 μL), r *Taq* DNA 聚合酶 0.2 μL, DNA 模板 1 μL, 双蒸灭菌水 17.4 μL。PCR 扩增条件: 预变性 94 °C 5 min; 94 °C 变性 30 s, 48 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 38 个循环; 产物末端 72 °C 延伸 7 min。

2.6 PCR 产物检测 扩增结束后取 PCR 产物 3 μL, 加入 6 × Loading buffer 4 μL 于 EB 染色的 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测, SYNGENE 凝胶成像系统观察、成像。

3 结果与分析

3.1 通用引物验证 用鱼类通用引物 FishF1/R1 对正品海龙及其混伪品的 DNA 进行 PCR 扩增, 检测样品的 DNA 模板质量。电泳结果表明该引物可以在所研究的样本中成功地扩增, 得到约 649 bp 的条带, 说明样品的模板 DNA 质量符合本实验研究中 PCR 反应的要求。见图 1。



M. DL2000 Marker; 1, 2. 刁海龙; 3, 4. 尖海龙; 5, 6. 拟海龙; 7, 8. 宝珈海龙; 9, 10. 粗吻海龙; 11, 12. 多棘刁海龙; 13, 14. 黑斑刀海龙; 15, 16. 海蠋鱼; 17, 18. 光粗吻海龙; 19, 20. 短尾粗吻海龙; 21, 22. 斗氏刁海龙; CK. 空白对照

图 1 通用引物 FishF1/R1 扩增海龙类物种

Fig. 1 PCR results of amplification Syngnathus DNA using universal primer FishF1/R1

3.2 PCR 鉴别条件的确定

3.2.1 退火温度考察 分别设置退火温度 44, 46, 48, 50 °C, 结果表明在 44 ~ 50 °C 时, 样本均可获得良好的条带, 刁海龙能扩增得到 485 bp 的亮带, 拟海龙能扩增出 240 bp 的条带, 尖海龙可以扩增出

120 bp 的条带, 所有样本的空白对照在此范围内均未扩增, 见图 2。为确保 PCR 退火温度的稳定, 确定刁海龙、拟海龙、尖海龙的 PCR 退火温度分别为 50, 48, 46 °C。

3.2.2 循环次数考察 分别选用 31, 33, 35, 37 个循环进行考察, 结果表明 31 ~ 37 循环时, 所有样本均可看到条带, 见图 2。但 37 循环时, 拟海龙和尖海龙出现非特异性扩增, 为保证结果的稳定性和准确性, 确定刁海龙和尖海龙选择中间的 35 个循环进行 PCR 反应, 拟海龙选择 33 个循环进行 PCR 反应。

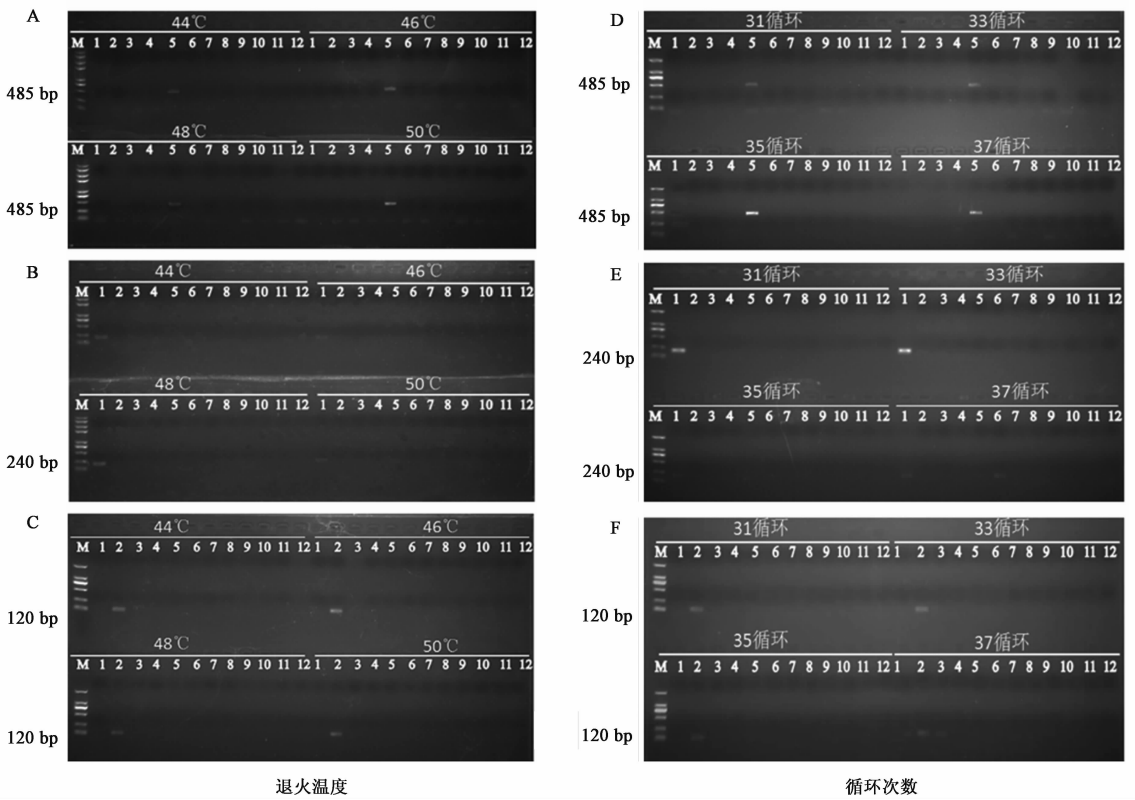
3.2.3 DNA 模板量考察 对 25 μL PCR 反应体系中的模板 DNA 用量进行了考察, 调整 DNA 浓度约 30 mg·L⁻¹, 分别设置相当于 3, 1 μL, 稀释 1/3 倍, 稀释 1/9 倍的 DNA 模板 (DNA 量分别为 90, 30, 10, 3 ng), 结果表明所有样本均能扩增, 见图 3。为防止模板浓度过高产生假阳性或过低产生假阴性的错误鉴别结果, 确认刁海龙、拟海龙、尖海龙都选择 25 μL 体系中加入 1 μL (约 30 ng) 作为最终模板浓度。

3.2.4 *Taq* 酶用量考察 对 25 μL PCR 反应体系中的 *Taq* 酶用量进行了考察, 分别设置 *Taq* 酶为 0.15, 0.2, 0.25, 0.3 μL, 结果表明 0.15 ~ 0.3 μL, 所有样本均能扩增, 见图 3。为保证 PCR 反应的稳定, 确定刁海龙、拟海龙、尖海龙都选择 25 μL 体系中加入 *Taq* 酶 0.2 μL 作为最终浓度。

因此, 刁海龙的特异性 PCR 扩增反应的最佳参数为 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s; 50 °C 退火 30 s; 72 °C 延伸 30 s; 35 个循环后, 72 °C 再延伸 7 min。拟海龙的特异性 PCR 扩增反应的最佳参数为 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 48 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s; 33 个循环后, 72 °C 再延伸 7 min。尖海龙的特异性 PCR 扩增反应的最佳参数为 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s; 46 °C 退火 30 s; 72 °C 延伸 30 s; 35 个循环后, 72 °C 再延伸 7 min。

3.3 方法耐受性实验考察

3.3.1 不同 *Taq* 酶种类考察 为考察不同保真度的酶对刁海龙、拟海龙、尖海龙鉴别结果的影响, 刁海龙选择 r *Taq*, 2 × *Taq* PCR Master Mix, 2 × T5 Super PCR Mix; 以及 2 × Master Mix 进行实验, 尖海龙选择 r *Taq*, *Taq* Plus, *Taq* DNA, 以及 Mix Green PCR 预混液进行实验, 拟海龙选择 r *Taq*, 2 × *Taq* PCR Master Mix, 2 × T5 Super PCR Mix, *Taq* DNA 进行实验, 结果表明不同公司的酶由于活力不同而表现出扩增条带的亮度有差异, 不影响鉴别结果判读,



A. 刁海龙; B. 拟海龙; C. 尖海龙; M. DL2000 Marker; 1. 拟海龙; 2. 尖海龙; 3. 宝珈海龙; 4. 粗吻海龙; 5. 刁海龙; 6. 多棘刁海龙; 7. 黑斑刁海龙; 8. 海蠋鱼; 9. 光粗吻海龙; 10. 短尾粗吻海龙; 11. 斗氏刁海龙; 12. 空白对照(图 3, 4 同)

图 2 不同退火温度和循环次数对海龙特异性 PCR 鉴别的影响

Fig. 2 Influence of annealing temperature and thermo cycles number on Syngnathus' specific identification

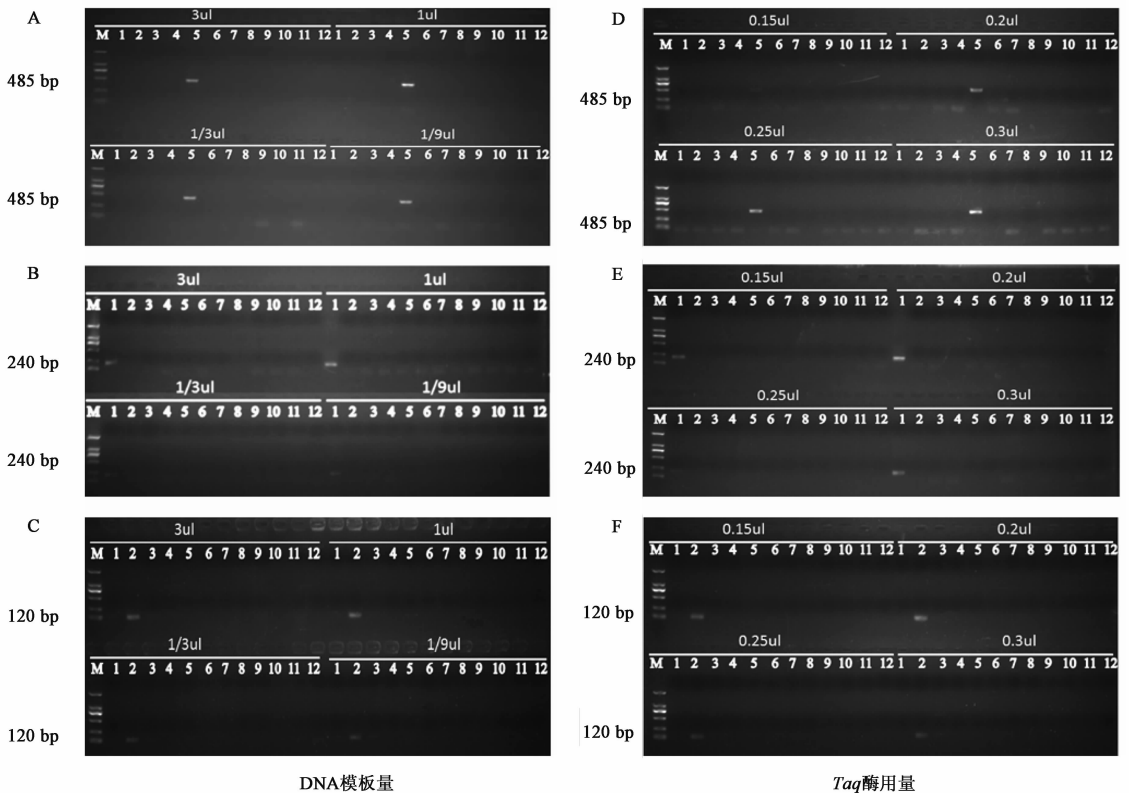


图 3 不同 DNA 模板量和 Taq 酶用量对海龙特异性 PCR 鉴别的影响

Fig. 3 Influence of DNA concentration and amount of Taq polymerase on Syngnathus' specific identification

但 Mix Green PCR 预混液却不能扩增出尖海龙的条

带,见图 4。

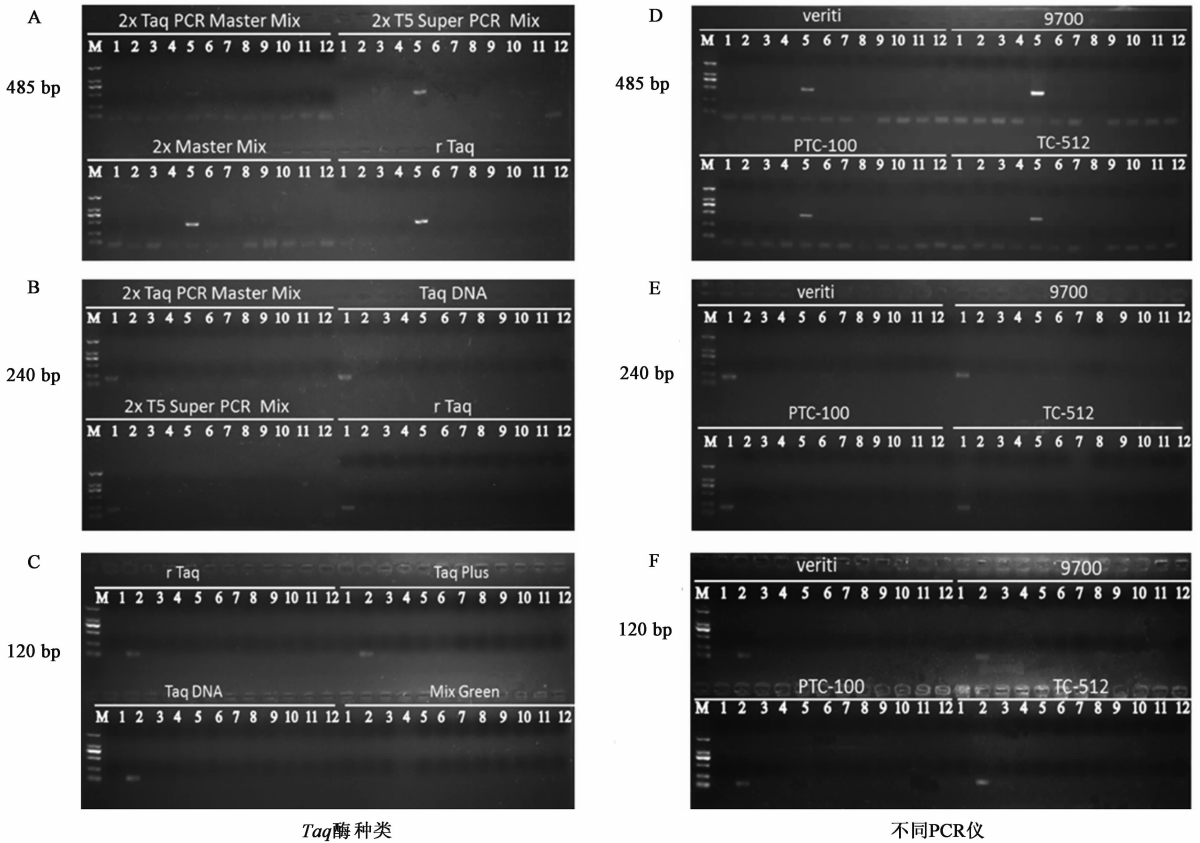


图 4 不同 Taq 酶种类和不同 PCR 仪对海龙特异性 PCR 鉴别的影响

Fig. 4 Influence of different kinds of Taq polymerases and thermocyclers on Syngnathus' specific identification

3.3.2 不同 PCR 仪考察 分别用 ABI 9700, Veriti, PTC-100 以及 TC-512 型基因扩增仪进行 PCR 扩增,结果表明所有海龙正品均能扩增得到亮带,阴性对照在此范围内均未扩增。表明以上 4 种型号的 PCR 仪均能进行鉴别,见图 4。

3.4 方法的适用性考察 使用海龙类特异性鉴别引物对,采用筛选出的最优体系和反应条件,分别对不同药材市场上的各 20 批刁海龙、拟海龙和尖海龙及其宝珈海龙、黑斑刁海龙、多棘刁海龙、粗吻海龙、光粗吻海龙、短尾粗吻海龙、斗氏刁海龙及葛氏海蠋鱼 8 种共 55 批海龙伪品进行扩增,产物经琼脂糖凝胶电泳检测,发现刁海龙产生约 485 bp 的明亮单一条带,拟海龙产生约 240 bp 的明亮单一条带,尖海龙产生约 120 bp 的明亮单一条带,伪品无条带,不同市场来源的正品海龙均产生一致结果,表明该体系能稳定准确地鉴别海龙。见图 5~10。

3.5 多重 PCR 特异性验证 经退火温度和循环数的微调,结果显示,在 48 ℃ 退火温度下,经 35 个 PCR 循环后,3 种海龙的凝胶电泳均出现特异性单一条带,尖海龙、拟海龙、刁海龙多重 PCR 反应扩增

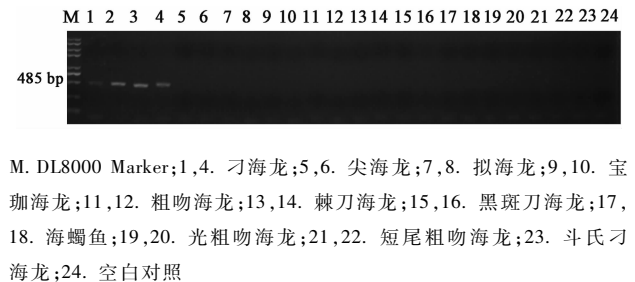


图 5 刁海龙正伪品特异性 PCR 鉴别

Fig. 5 Specific PCR identification of *Solenognathus hardwickii* and its adulterants

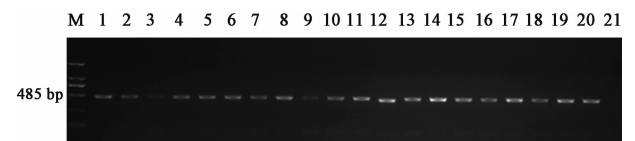
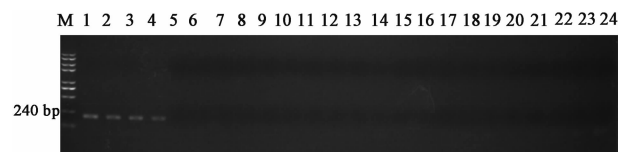


图 6 20 批刁海龙特异性 PCR 鉴别

Fig. 6 Specific PCR identification of 20 batches of *Solenognathus hardwickii* from different herbal markets

产物长度不同,可相互区分,而其余混伪品多重



M. DL8000 Marker; 1~4. 拟海龙; 5, 6. 尖海龙; 7, 8. 刁海龙; 9, 10. 宝珈海龙; 11, 12. 粗吻海龙; 13, 14. 棘刀海龙; 15, 16. 黑斑刀海龙; 17, 18. 海蠋鱼; 19, 20. 光粗吻海龙; 21, 22. 短尾粗吻海龙; 23. 斗氏刁海龙; 24. 空白对照

图 7 拟海龙正伪品鉴别
Fig. 7 Specific PCR identification of *Solenognathus biaculeatus* and its adulterants



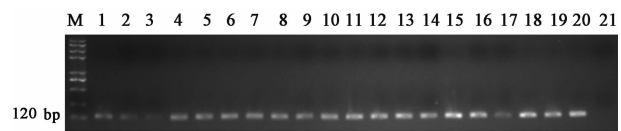
M. DL8000 Marker; 1, 2. 拟海龙(玉林); 3~12. 拟海龙(安国); 13~20. 拟海龙(亳州); 21. 空白对照

图 8 20 批拟海龙特异性 PCR 鉴别
Fig. 8 Specific PCR identification of 20 batches of *Solenognathus biaculeatus* from different herbal markets



M. DL2000 Marker; 1~4. 尖海龙; 5, 6. 刁海龙; 7, 8. 拟海龙; 9, 10. 宝珈海龙; 11, 12. 粗吻海龙; 13~14. 棘刀海龙; 15~16. 黑斑刀海龙; 17~18. 海蠋鱼; 19~20. 光粗吻海龙; 21~22. 短尾粗吻海龙; 23. 斗氏刁海龙; 24. 空白对照

图 9 尖海龙正伪品鉴别
Fig. 9 Specific PCR identification of *Solenognathus acus* and its adulterants



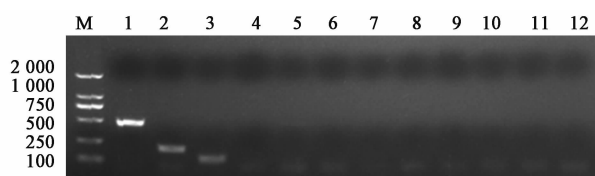
M. DL8000 Marker; 1~7. 尖海龙(亳州); 8, 9. 尖海龙(汕头); 10, 11. 尖海龙(丹东); 12, 13. 尖海龙(潮州); 14. 尖海龙(湛江); 15. 尖海龙(北海); 16. 尖海龙(玉林); 17~19. 尖海龙(青岛); 20. 尖海龙(成都); 21. 空白对照

图 10 20 批尖海龙特异性 PCR 鉴别
Fig. 10 Specific PCR identification of 20 batches of *Solenognathus acus* from different herbal markets

PCR 反应后均无条带, 见图 11。

4 讨论

海龙作为传统名贵动物药材, 疗效显著, 应用广



M. DL2000 Marker; 1. 刁海龙; 2. 拟海龙; 3. 尖海龙; 4. 宝珈海龙; 5. 粗吻海龙; 6. 多棘刁海龙; 7. 黑斑刀海龙; 8. 海蠋鱼; 9. 光粗吻海龙; 10. 短尾粗吻海龙; 11. 斗氏刁海龙; 12. 空白对照

图 11 刁海龙、拟海龙、尖海龙的多重位点特异性 PCR 鉴别
Fig. 11 Multiplex allele-specific PCR identification of medicinal *Syngnathus* and its adulterants

泛, 对其进行准确的鉴定尤为重要。为了达到有效鉴定的目的, 本研究对正品海龙及其伪品的 CO I 序列进行分析, 筛选获得用于鉴别刁海龙、拟海龙、尖海龙的 3 个 SNP 位点, 设计了特异性的 PCR 鉴别引物, 并建立了位点特异 PCR 鉴别方法, 并对实验中各因素和条件进行了优化和考察, 确定了最佳的 PCR 体系, 并对此方法进行了耐受性和适用性的考察, 海龙样品的特异性 PCR 鉴别结果均与形态学鉴别结果一致, 进一步验证了该鉴别引物用于海龙类药材真伪鉴别的可靠性和稳定性。

影响多重 PCR 反应效果的因素很多, 其中引物设计直接影响 PCR 扩增的特异性, 特异性 PCR 鉴别引物的设计主要是基于正品海龙和常见伪品在 CO I 序列的碱基差异, 本研究所设计的鉴别引物, 保证了正品海龙引物的 3' 末端与 SNP 位点匹配, 而与混伪品的碱基错配^[14], 以确保所设计的引物具有很强的特异性。此外, 本实验所设计的引物退火温度都在 50 ℃ 左右, 为后续多重 PCR 能在 48 ℃ 同一退火温度下扩增所有片段提供了便利的条件。另外, 适宜的引物浓度也是影响多重 PCR 扩增的重要因素之一, 本文所建立的多重 PCR 鉴别方法是经过多次各引物浓度比例摸索建立起来的。

该序列位点特异性 PCR 操作简便, 重复性好, 特异性高, 无需测序, 只通过简单的 PCR 反应即可将正品海龙从其他海龙类药材中鉴别出来, 并且对鉴别人员的技术要求和仪器设备不高, 具有较强的实用性, 有望得到广泛的推广应用。

[参考文献]

[1] 张朝晖, 徐国钧, 徐璐珊, 等. 海龙类药材性状与商品鉴定[J]. 中药材, 1997, 20(2): 63-66.
[2] 税丕先. 海龙及其混淆品掺假品的鉴别[J]. 中国药业, 2004, 13(7): 59-60.
[3] 刘富艳, 秦雯, 袁媛, 等. 基于形态和 DNA 序列分

- 析的海龙类药材商品的基原调查[J]. 世界中医药, 2018, 13(2):18-23.
- [4] 魏艺聪, 蒋超, 袁媛, 等. 基于 CO I 与 SRY 序列建立梅花鹿、马鹿及其杂交鹿茸的分子鉴别方法[J]. 中国中药杂志, 2017, 42(23): 4588-4592.
- [5] 尹艳, 刘逊, 王兵, 等. 中药穿山甲的 DNA 分子鉴定研究[J]. 中国中药杂志, 2017, 42(11): 2078-2084.
- [6] 蒋超, 屠李婵, 袁媛, 等. 金银花配方颗粒的位点特异性 PCR 鉴别研究[J]. 中国中药杂志, 2017, 42(13): 2484-2491.
- [7] 蒋超, 罗宇琴, 袁媛, 等. 多重位点特异性 PCR 鉴别人参、三七、西洋参掺杂[J]. 中国中药杂志, 2017, 42(7): 1319-1323.
- [8] 蒋超, 赵群, 金艳, 等. 快速 PCR 技术鉴别中药材蛤蚧的方法研究[J]. 中国现代中药, 2017, 19(1):21-25.
- [9] 王凤云, 蒋颖诗, 赖小平. 基于 ND2 基因序列的燕窝 DNA 条形码鉴别[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(13): 36-40.
- [10] 吴艳, 刘佳, 王梦月, 等. 海龙及其常见伪品的 RAPD 鉴别[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(14): 1758-1760.
- [11] GAO L, YIN Y, LI J, et al. Identification of traditional Chinese medicinal pipefish and exclusion of common adulterants by multiplex PCR based on 12 S sequences of specific alleles[J]. Mitochondrial DNA A, 2017, doi: 10.1080/24701394.2016.1278538.
- [12] ZHANG Y H, QIN G, ZHANG H X, et al. DNA barcoding reflects the diversity and variety of brooding traits of fish species in the family syngnathidae along China's coast[J]. Fish Res, 2017, doi.org/10.1016/j.fishres.2016.09.015.
- [13] 陈明洁, 方侗, 柯涛, 等. 多重 PCR——一种高效快速的分子生物学技术[J]. 武汉理工大学学报, 2005, 27(10):37-40.
- [14] 黄璐琦, 袁媛. 中药分子鉴定操作指南[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2014: 49.

[责任编辑 全燕]