

特异性 PCR 鉴别蜈蚣及其混伪品

田娜^{1,2}, 袁媛², 金艳², 杨全¹, 赵玉洋², 蒋超^{2*}

(1. 广东药科大学 中药学院, 广州 510006;

2. 中国中医科学院 中药资源中心, 道地药材国家重点实验室培育基地, 北京 100700)

[摘要] **目的:** 蜈蚣是我国传统的中药材,具有良好的药用价值。目前市场上蜈蚣的混伪品日益增多,临床用药的安全性和有效性难以保证。该研究建立了一种蜈蚣基原物种的特异性聚合酶链式反应(PCR)方法,以准确、简便的鉴别蜈蚣及其常见混伪品。**方法:** 通过比较蜈蚣及其混伪品基原物种的 COI 基因序列差异,根据变异位点设计蜈蚣正品少棘巨蜈蚣的特异性鉴别引物 WG-500. F 和 WG-500. R,采集蜈蚣原动物样本及药材样本,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。**结果:** 少棘巨蜈蚣原动物样本及蜈蚣正品药材使用设计的蜈蚣鉴别引物经 PCR 扩增和凝胶电泳后出约 500 bp 的单一明亮条带,其他混伪品如多棘蜈蚣、模棘蜈蚣、哈氏蜈蚣、海南蜈蚣等均无条带出现。**结论:** PCR 鉴别方法可准确鉴别蜈蚣原动物和药材的真伪,具有高度特异性,为中药材蜈蚣的真伪鉴别提供了良好的科学依据。该方法具有简单、直观等特点,有利于广泛的普及与应用,在中药材鉴定方面有着广阔的应用前景。

[关键词] 蜈蚣; 聚合酶链式反应; 少棘巨蜈蚣; 混伪品

[中图分类号] R284. 2;R285;R22;R2-031 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)17-0113-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20191711

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20190515.1742.017.html>

[网络出版时间] 2019-05-17 11:34

Specific PCR Method for Identification of Medicinal Scolopendra

TIAN Na^{1,2}, YUAN Yuan², JIN Yan², YANG Quan¹, ZHAO Yu-yang², JIANG Chao^{2*}

(1. School of Traditional Chinese Medicine, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China;

2. State Key Laboratory Breeding Base of Dao-di Herbs, National Resource Center for Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** Scolopendra was a traditional Chinese medicine (TCM) with a good medicinal value. Nowadays, there have been increasingly more adulterates of Scolopendra in the medicine market. To ensure the safe and effectiveness of clinical medicines, a convenient and accurate specific polymerase chain reaction (PCR) method for identification of medicinal Scolopendra from its common adulterates was established. **Method:** Based on the differences of COI gene DNA sequences among *Scolopendra subspinipes mutilans* and adulterants, the specific primer was designed, the reaction conditions were optimized, and the PCR method for identification was explored and verified in terms of tolerance and feasibility. Besides, the original animal samples and medicine of Scolopendra were collected. **Result:** Through the established PCR reaction system, the bright and simple fragments of 500 bp was amplified from DNA templates of *S. subspinipes mutilans*. All of the adulterants were negative by the multiplex PCR assay, such as *S. multidentis*, *S. subspinipes*, *S. dehaani*, *S. hainanum*. **Conclusion:** The identified primer is highly specific, and the specific PCR method established in this paper can accurately identify Scolopendra and its adulterants, so as to provide an excellent scientific basis for the identification

[收稿日期] 20190104(009)

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

[第一作者] 田娜, 硕士, 从事中药分子鉴定, E-mail: 2509769269@qq.com

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

of TCM Scolopendra. The method is simple and intuitive, and facilitates wide promotion and application of the method, with a broad application prospect in the identification of TCM.

[**Key words**] Scolopendra; polymerase chain reaction (PCR); *Scolopendra subspinipes mutilans*; adulterants

蜈蚣来源于蜈蚣科动物少棘巨蜈蚣 *Scolopendra subspinipes mutilans* 的干燥体^[1], 具有抗肿瘤^[2]、抗心肌缺血^[3]、镇痛^[4]等作用。近年来, 其临床应用日益扩大, 混伪品日益增多。蜈蚣物种鉴定主要依据体型大小、颜色、触角节数、齿板形态、步足附刺有无、最末步足棘刺等形态特征^[5-7]。然而, 在制成药材、饮片过程中, 步足、触角丢失, 齿板断裂, 背板颜色改变, 致使形态鉴别困难。正品少棘巨蜈蚣原动物具有显著特征, 其头壳红到红橙色, 背板黑色或黑绿色, 表面泛光泽, 但加工成药材后, 头壳颜色转为暗红, 背板颜色变浅, 与多棘蜈蚣、哈氏蜈蚣等形态相似, 难以准确判别正伪。

DNA 分子标记技术为蜈蚣真伪鉴定提供了

新手段。特异性聚合酶链式反应(PCR)因其简单、准确等特点, 已广泛用于动物药材的基原鉴别^[8-12]。2015 年版《中国药典》收录了使用特异性 PCR 鉴别蕲蛇、乌梢蛇、金钱白花蛇真伪的方法。在此基础上, 本研究使用特异性 PCR, 建立了快速、准确鉴别蜈蚣及其常见混伪品的方法。

1 材料

1.1 原动物 少棘巨蜈蚣等 9 个常见蜈蚣属物种原动物样品采自老挝、泰国、越南、马来西亚及我国湖北、广东、广西、海南、云南、贵州等地, 采集后置 75% 乙醇中保存, 样品经中国中医科学院中药资源中心蒋超博士根据文献鉴定^[5,7,13], 保存于中国中医科学院中药资源中心(表 1)。

表 1 蜈蚣原动物样品信息

Table 1 Samples table of *Scolopendra's* original animal

No.	物种	拉丁名	来源地(样品数)
1	少棘巨蜈蚣	<i>Scolopendra subspinipes mutilans</i>	湖北随州(2), 湖北京山(1), 湖北襄阳(1)
2	多棘蜈蚣	<i>S. multidentis</i>	广西(2), 云南红河(2), 广东(1)
3	模棘蜈蚣	<i>S. subspinipes</i>	云南金平(1), 云南红河(2), 广西钦州(1), 马来西亚金马伦(1), 马来西亚婆罗洲(1)
4	哈氏蜈蚣	<i>S. dehaani</i>	越南(5), 泰国(1), 云南金平(6), 云南红河(2)
5	海南蜈蚣	<i>S. hainanum</i>	广西(2)
6	间斑蜈蚣	<i>S. dawydoffi</i>	贵州安顺(1), 云南昆明(1)
7	黑头蜈蚣	<i>S. negrocipitis</i>	安徽宣城(1)
8	墨江蜈蚣	<i>S. mojiangica</i>	云南保山(1), 云南西双版纳(1)
9	角齿蜈蚣	<i>S. angulata</i>	产地不明(1)

1.2 药材 样品购自河北安国、安徽亳州、广东清平、山东菏泽等药材市场、湖北等产区以及 14 家中药饮片公司。共计 63 批, 其中少棘巨蜈蚣 47 批, 蜈蚣类混伪品 16 批, 经金艳博士、蒋超博士鉴定, 保存于中国中医科学院中药资源中心(表 2)。

1.3 试剂 Promega Wizard SV Genomic DNA Purification System 试剂盒(普洛麦格北京生物技术有限公司, 批号 0000303114); SpeedSTAR HS *Taq* DNA 聚合酶, Mighty Amp DNA 聚合酶(大连 Takara 公司, 批号 RR070A, R071A); FastPfu Fly DNA 聚合酶(NEB 公司, 批号 M10527); PCR BIO Ultra Polymerase (PcrBio 公司, 批号 PB603); 2 000 bp

DNA Marker(北京全式金生物技术有限公司, 批号 BM101)。

1.4 仪器 Veriti™ 型 PCR 仪, GeneAmp 9700 型 PCR 仪(美国 Applied Biosystem 公司); PTC-100 型 PCR 仪, SYNGENE 型凝胶成像系统(Gene 公司); TC-512 型 PCR 仪(上海 Techne 公司); VORTEX-2 GENI 型漩涡震荡仪(美国 Scientific Industries 公司); Nanodrop 2000 型微量核酸定量分析仪(Thermo Scientific 公司)。

2 方法

2.1 基因组 DNA 提取 样品使用 70% 乙醇擦拭表面, 晾干。取蜈蚣肌肉组织样品约 30 mg, 置 2 mL

表 2 蜈蚣药材来源信息

Table 2 Sample information of medicinal Scolopendra material

No.	材料名称	拉丁名	数量	购买地/产地	编号
1	少棘巨蜈蚣	<i>Scolopendra subspinipes mutilans</i>	13	安徽亳州 ¹⁾	SJ-1 ~ 13
2	少棘巨蜈蚣	<i>S. subspinipes mutilans</i>	6	安徽合肥 ¹⁾	SJ-14 ~ 19
3	少棘巨蜈蚣	<i>S. subspinipes mutilans</i>	4	河北安国 ¹⁾	SJ-20 ~ 23
4	少棘巨蜈蚣	<i>S. subspinipes mutilans</i>	8	广东清平 ¹⁾	SJ-24 ~ 31
5	少棘巨蜈蚣	<i>S. subspinipes mutilans</i>	2	山东菏泽 ¹⁾	SJ-32 ~ 33
6	少棘巨蜈蚣	<i>S. subspinipes mutilans</i>	1	朝鲜 ²⁾	SJ-34
7	少棘巨蜈蚣	<i>S. subspinipes mutilans</i>	12	湖北 ²⁾	SJ-35 ~ 46
8	少棘巨蜈蚣	<i>S. subspinipes mutilans</i>	1	四川 ²⁾	SJ-47
9	哈氏蜈蚣	<i>S. dehaani</i>	1	安徽亳州 ¹⁾	HS-1
10	哈氏蜈蚣	<i>S. dehaani</i>	1	河北安国 ¹⁾	HS-2
11	哈氏蜈蚣	<i>S. dehaani</i>	1	广西玉林 ¹⁾	HS-3
12	多棘蜈蚣	<i>S. multidentis</i>	1	河北安国 ¹⁾	DJ-1
13	多棘蜈蚣	<i>S. multidentis</i>	1	广西玉林 ¹⁾	DJ-2
14	多棘蜈蚣	<i>S. multidentis</i>	2	广东清平 ¹⁾	DJ-3 ~ 4
15	模棘蜈蚣	<i>S. subspinipes</i>	1	河北安国 ¹⁾	MJ-1
16	模棘蜈蚣	<i>S. subspinipes</i>	2	安徽亳州 ¹⁾	MJ-2 ~ 3
17	模棘蜈蚣	<i>S. subspinipes</i>	1	广东清平 ¹⁾	MJ-4
18	海南蜈蚣	<i>S. hainanum</i>	5	河北安国 ¹⁾	HN-1 ~ 5

注: ¹⁾ 药材购买地; ²⁾ 药材产地。

离心管中,经 DNA 提取研磨仪多次研磨至粉末,按照 Dneasy 血液及组织核酸提取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。

2.2 引物设计 通过分析 Genbank 中少棘巨蜈蚣、多棘蜈蚣、哈氏蜈蚣、赤蜈蚣、日本蜈蚣、模棘蜈蚣、墨江蜈蚣及菲律宾蜈蚣的 COI 基因序列,同时使用 Clustal W 程序对其序列进行多重序列比对,分析正品蜈蚣及其混伪品的 COI 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,设计出能特异性鉴别基原物种少棘巨蜈蚣鉴别引物对 WG-500 上游 5'-TCAATAATCGG AACAGCAT-3' 和 WG-500 下游 5'-ATACTGACCA TACAAATAAAGGAG-3',由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

2.3 PCR 扩增条件的确定 初始 PCR 反应体系: 25 μ L PCR 反应体系包含 10 \times PCR buffer 2.5 μ L, 10 mmol \cdot L⁻¹ dNTPs 1.5 μ L, 上游及下游引物 0.25 μ L, rTaq DNA 聚合酶 0.2 μ L, DNA 模板 1 μ L, 加灭菌蒸馏水补足至 25 μ L。初始反应程序: 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 35 个循环 (94 $^{\circ}$ C 20 s, 56 $^{\circ}$ C 20 s,

72 $^{\circ}$ C 45 s), 72 $^{\circ}$ C 终延伸 5 min。PCR 反应结束后,取反应产物,加入 6 \times Loading buffer 5 μ L (Takara 公司),混匀后于溴化乙锭(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。对退火温度,循环数, DNA 模板量, Taq 酶用量, Taq 酶种类, PCR 仪型号等影响鉴别特异性的核心因素进行考察,确定最佳反应体系和反应参数,使用该条件对市场收集的所有样品进行 PCR 鉴别,验证该体系是否能稳定准确地鉴别蜈蚣。

2.4 测序验证 使用 COI 序列扩增引物对鉴定为混伪品的市售药材样品进行测序验证。COI 序列扩增引物为 HCO2198 5'-TAAACTTCAGGGTGAC CAAAAATCA-3' 和 LCO1490 5'-GGTCAACAAATCA TAAAGATATTGG-3'。25 μ L PCR 反应体系包含 10 \times PCR buffer 2.5 μ L, 10 mmol \cdot L⁻¹ dNTPs 1.5 μ L, 上游及下游引物 0.25 μ L, rTaq DNA 聚合酶 0.2 μ L, DNA 模板 1 μ L, 加灭菌蒸馏水补足至 25 μ L。PCR 扩增程序: 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 5 循环 (94 $^{\circ}$ C 30 s, 45 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s), 然后 35 循环 (94 $^{\circ}$ C 20 s, 50 $^{\circ}$ C 20 s, 72 $^{\circ}$ C 45 s); 72 $^{\circ}$ C 终延伸 5 min。扩增产物使用 EB 染色的 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。取阳性扩增产物送由睿博兴科生物

技术有限公司进行双向测序。使用 BioEdit 7.2.6 软件对测序峰图进行校对、去除引物序列并拼接, 获得对应测序结果。从 GenBank 获取不同蜈蚣 COI 序列, 与测序序列一起经多重序列比对后利用 MEGA 6.0 基于 Kimura-2-parameter 模型使用 Maximum Likelihood 法构建系统发育树, bootstrap 值设定为 100 次重复。

3 结果与分析

3.1 方法学的条件考察

3.1.1 PCR 鉴别条件的考察 使用 2.2 项设计的蜈蚣特异性鉴别引物 WG-500 上游和 WG-500 下游进行 PCR 扩增, 54 ~ 60 °C, 正品蜈蚣均扩增获得约 500 bp 特异性鉴别条带, 混伪品无条带 (图 1A), 选择 56 °C 为适宜退火温度。在此基础上分别选用 31, 33, 35 和 37 个循环进行考察, 结果表明 31 ~ 37 个循环均出现特异性鉴别结果 (图 1B), 选择 35 个循环为适宜条件进行 DNA 模板用量。对每个 PCR 反应的 DNA 模板量进行考察, 结果表明 3 ~ 90 ng 总 DNA 均能获得有效鉴别 (图 1C)。对 PCR 反应体系中的 *rTaq* DNA 聚合酶用量进行了考察, 结果表明在 *Taq* 酶用量为 0.75 ~ 1.5 U 时均能获得明亮鉴别条带 (图 1D)。

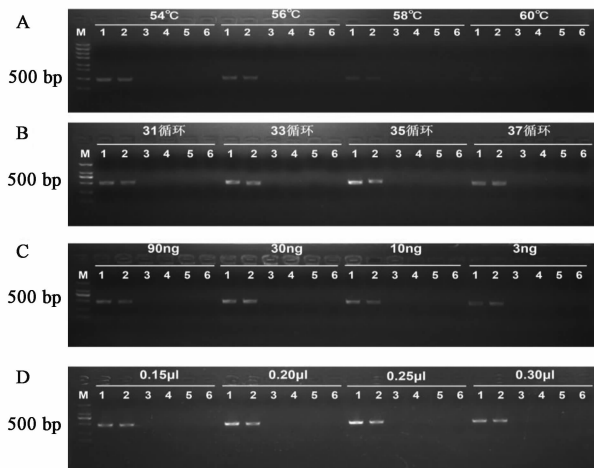


图 1 蜈蚣特异性 PCR 鉴别条件考察
A. 退火温度; B. 循环数; C. DNA 模板量; D. *Taq* 酶用量; M. DL2000 Marker; 1 ~ 2. 少棘巨蜈蚣; 3. 多棘蜈蚣; 4. 哈氏蜈蚣; 5. 模棘蜈蚣; 6. 阴性对照 (以 ddH₂O 为模板)

图 1 蜈蚣特异性 PCR 鉴别条件考察

Fig. 1 Identification results of different conditions about specific PCR for Scolopendra

3.1.2 耐受性考察 为测试不同保真度 *Taq* 酶和不同 PCR 仪对蜈蚣特异性 PCR 鉴别结果的影响, 分别使用 SpeedSTAR HS *Taq*, MightyAmp *Taq*, FastPfu Fly *Taq* 聚合酶预混液以及 Ultra 聚合酶预混液进行试验, 结果表明使用不同程度的保真酶进行

PCR 反应均结果表明均能扩增得到 500 bp 的亮带, 混伪品无条带 (图 2E); 使用 Veriti, ABI 9700, PTC-100 以及 TC-512 型基因扩增仪进行 PCR 扩增, 均可获得正确的鉴别结果 (图 2F)。

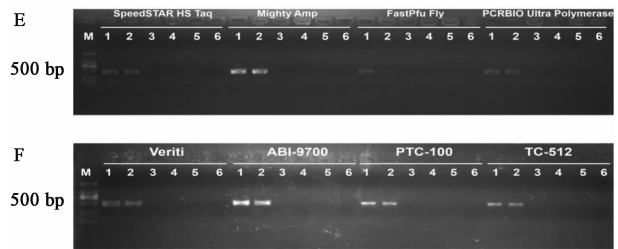


图 2 蜈蚣特异性 PCR 鉴别耐受性考察
E. 聚合酶种类; F. PCR 仪种类; M. DL2000 Marker; 1 ~ 2. 少棘巨蜈蚣; 3. 多棘蜈蚣; 4. 哈氏蜈蚣; 5. 模棘蜈蚣; 6. 阴性对照 (以 ddH₂O 为模板)

图 2 蜈蚣特异性 PCR 鉴别耐受性考察

Fig. 2 Identification results of tolerance about specific PCR for Scolopendra

3.2 适用性考察 根据 3.1 和 3.2 项下确定的最优 PCR 鉴别体系和 PCR 鉴别条件 (94 °C 预变性 3 min; 94 °C 变性 20 s, 56 °C 退火 20 s, 72 °C 延伸 45 s, 35 个循环; 72 °C 再延伸 5 min), 对不同药材市场上的正品少棘巨蜈蚣及混伪品哈氏蜈蚣、多棘蜈蚣、模棘蜈蚣、海南蜈蚣、墨江蜈蚣、黑头蜈蚣、间斑蜈蚣、角齿蜈蚣进行 PCR 扩增, 产物经琼脂糖凝胶电泳检测, 结果不同来源的少棘巨蜈蚣均产生约 500 bp 的明亮单一条带, 伪品无条带, 表明该体系能稳定准确地鉴别蜈蚣 (图 3)。

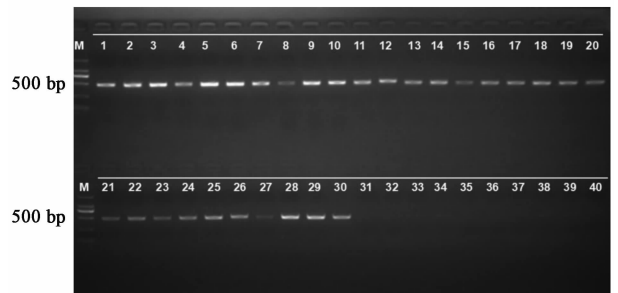


图 3 不同来源的 40 批蜈蚣 PCR 扩增
M. DL2000 Marker; 1 ~ 4. 少棘巨蜈蚣原动物; 5 ~ 30. 少棘巨蜈蚣药材; 31 ~ 32. 哈氏蜈蚣; 33. 多棘蜈蚣; 34. 模棘蜈蚣; 35. 海南蜈蚣; 36. 墨江蜈蚣; 37. 黑头蜈蚣; 38. 间斑蜈蚣; 39. 角齿蜈蚣; 40. 空白对照 (ddH₂O 为模板)

图 3 不同来源的 40 批蜈蚣 PCR 扩增

Fig. 3 Specific PCR identification results of 40 batches Scolopendra from different regions

3.3 混伪品的测序验证 对收集的原动物样本和所有特异性 PCR 鉴定为阴性的药材样品 COI 片段使用引物 LCO1490/HCO2198 进行 PCR 扩增并双向测序, 经最大似然法利用实验序列和 GenBank 序列

