

地龙的多重位点特异性 PCR 鉴别

田娜^{1,2}, 魏艺聪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:** 近年来, 中药材地龙的商品价格不断上涨, 市场的混伪品随之增加。其主要鉴别特征在药材中大部分丢失, 难以区分。因此, 急需建立一种准确、稳定的中药材地龙基原鉴别方法。**方法:** 根据地龙及其混伪品的 COI 基因序列差异找到变异位点, 从而设计参环毛蚓、通俗环毛蚓、威廉环毛蚓及栉盲环毛蚓的特异性鉴别引物, 优化反应体系并进行耐受性和适用性的考察和验证。在此基础上将特异性引物组合, 构建多重聚合酶链式反应 (PCR) 体系, 从而建立了一种高效准确、操作简便、专属性强、重复性好的中药材地龙及其常见混伪品的多重位点 PCR 鉴别方法。**结果:** 在该方法下广地龙基原参环毛蚓可得到 366 bp 片段, 沪地龙基原通俗环毛蚓和威廉环毛蚓可得到 487 bp 片段, 栉盲环毛蚓可得到 475 bp 片段, 其他混伪品均无条带。将之组合形成的多重 PCR 可在一次鉴定操作中根据条带位置同时鉴别沪地龙和广地龙。**结论:** 该文所建立的多重位点特异性 PCR 鉴别方法可准确鉴别中药材地龙真伪。

[关键词] 地龙; 多重位点特异性聚合酶链式反应; 分子鉴别; 混伪品; 参环毛蚓; 通俗环毛蚓; 威廉环毛蚓; 栉盲环毛蚓

[中图分类号] R284.2; R285; R22; R2-031 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)17-0124-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20191716

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20190517.1700.003.html>

[网络出版时间] 2019-05-20 15:35

Identification of *Pheretima* by Multiplex Allele-specific PCR

TIAN Na^{1,2}, WEI Yi-cong², YUAN Yuan^{2*}, JIN Yan², YANG Quan¹, ZHAO Yu-yang², JIANG Chao^{2*}

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

2. State Key Laboratory Breeding Base of Dao-di Herbs, China Academy of Chinese Medical

Sciences, National Resource Center for Chinese Materia Medica, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** In recent years, with the increase in the commodity price of medicinal pheretima, there have emerged increasing adulterates in the medicine market. Besides, the medicinal materials have mostly lost the main identification features, and are difficult to distinguish. Therefore, it is urgent to establish an accurate and stable method for the identification of pheretima. **Method:** According to the differences of COI gene DNA sequences among *Pheretima aspergillum*, *Pheretima vulgaris*, *Pheretima guillelmi*, *Pheretima pectinifera* and adulterants, the variation site was found, the specific primers were designed, the reaction conditions were optimized, and the polymerase Chain reaction (PCR) method for identification was explored and verified in terms of tolerance and feasibility in this study. The specific primers were combined to build multiple PCR systems. An effective, accurate, convenient, highly specific and repeatable Multiplex Allele-Specific PCR identification method was established for identifying medicinal pheretima and its common adulterants. **Result:** Through the

[收稿日期] 20190319(012)

[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); 中国中医科学院中药资源中心自主选题项目 (ZZXT201709)

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

[通信作者] * 袁媛, 博士, 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, 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

established multiplex PCR reaction system, 366, 487, 487 and 475 bp of fragments were amplified from DNA templates of *P. aspergillum*, *P. vulgaris*, *P. guillelmi* and *P. pectinifera* respectively. All of the adulterants were negative by the multiplex PCR assay. The PCR amplification of specific alleles method established in this paper can accurately identify pheretima. **Conclusion:** The Multiplex Allele-Specific PCR identification method established in this paper can accurately identify medicinal pheretima and its adulterants.

[**Key words**] Pheretima; multiplex allele-specific polymerase chain reaction; molecular identification; adulterants; *Pheretima aspergillum*; *Pheretima vulgaris*; *Pheretima guillelmi*; *Pheretima pectinifera*

中药地龙具有清热定惊,通络,平喘,利尿等功效。2015 年版《中国药典》将其分为来源于参环毛蚓 *Pheretima aspergillum* 的“广地龙”和来源于通俗环毛蚓 *P. vulgaris*, 威廉环毛蚓 *P. guillelmi*, 或栉盲环毛蚓 *P. pectinifera* 的“沪地龙”两类^[1]。地龙是中药商品基原物种最为复杂的中药之一,在我国主要药材市场至少有 30 余种蚯蚓作为地龙入药。经剖开、除去内脏、晒干后,内脏结构等主要鉴别特征在地龙药材中全部丢失,表面环节、生殖孔挤压变形,难以区分。混伪品的存在严重威胁地龙用药的安全性和有效性,急需建立准确、稳定的地龙基原鉴别方法^[2]。

DNA 分子鉴别方法因其准确、稳定的特点,在中药基原鉴别方面体现出巨大优势^[3-10]。多种 DNA 方法已用于地龙的分子鉴别研究,韦健红等^[11]对 COI 和 16S rRNA 片段进行测序,建立了快速、准确和标准化的广地龙 DNA 分子标记鉴别方法;陈维明等^[12]通过比对 12S rRNA 序列,设计并筛选出的高特异性鉴别引物 12Si/12Sf 鉴别广地龙及其混伪品。地龙为多基原中药,目前广泛应用的位点特异性聚合酶链式反应(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地龙的基原,需建立一种能同时鉴别多种地龙的方法。

多重位点特异性 PCR 可以同时扩增和检测多个目的片段,成本低廉,节省时间,能够极大的提高实验效率^[13]。该方法已用于海龙及海马等动物药材的 DNA 分子鉴别当中^[14-15]。本文基于多重特异性 PCR 技术,建立了一种快速、准确的地龙 DNA 分子鉴别方法。

1 材料

样本购自河北安国、安徽亳州、广西玉林、广东清平、山东菏泽等药材市场以及上海、浙江杭州、重庆、贵州铜仁、江苏苏州等地区。样品共计 208 批,其中参环毛蚓 36 批,通俗环毛蚓 27 批,威廉环毛蚓 13 批,栉盲环毛蚓 21 批,地龙类伪品药材及原动物共 111 批,样品经上海交通大学邱江平教授和西南

大学刘彬教授鉴定,保存于中国中医科学院中药资源中心(表 1)。

Dneasy 血液及组织核酸提取试剂盒(上海凯杰企业管理有限公司,批号 69506);Ex Taq DNA 聚合酶(批号 RR001B),rTaq DNA 聚合酶(批号 R001B),SpeedSTAR HS Taq DNA 聚合酶(批号 RR070A),Mighty Amp DNA 聚合酶(R071A),均购自大连 Takara 公司。2 × T5 Super PCR Mix(北京擎科新业生物技术有限公司,批号 TSE005),2 × Master Mix with standard buffer(北京纽英伦生物技术有限公司,批号 M0484S),Taq 2 × Master Mix(北京纽英伦生物技术有限公司,批号 M0496S);2 000 bp DNA Marker(北京全式金生物技术有限公司,批号 BM101)。

PTC-100 型 PCR 仪(Gene 公司);Veriti™ 型, GeneAmp 9700 型 PCR 仪(美国 Applied Biosystem 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(Thermo Scientific 公司);SYNGENE SYNGENE 型凝胶成像系统(GENE 公司)。

2 方法

2.1 引物设计 测序并分析 Genbank 中参环毛蚓、通俗环毛蚓、威廉环毛蚓、栉盲环毛蚓、毛利远盲蚓、棋盘远盲蚓、葡腺远盲蚓、直隶腔蚓、通俗腔蚓、光亮远盲蚓及武临远盲蚓等的 COI 基因序列,同时使用 Clustal W 程序进行多重序列比对来分析正品地龙及其混伪品的 COI 基因序列差异。

使用引物设计软件 Premier Primer 5.0 设计中药地龙的特异性鉴别引物,得到能特异性鉴别广地龙基原物种参环毛蚓的鉴别引物对 SHMY-366F/SHMY-366R,以及能同时鉴别沪地龙 3 个基原物种的引物组 TSWL-487F/TSWL-487R 和 ZM-475F/ZM-475R,由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,反应条件:95 ℃ 3 min,35 个循环(94 ℃ 20 s,60 ℃ 20 s,72 ℃ 45 s),72 ℃ 5 min(表 2)。

表 1 地龙试验材料来源信息

Table 1 Information of Pheretima materials in this study

No.	中文名称	拉丁名称	数量/批	采集地	No.	中文名称	拉丁名称	数量/批	采集地
1	参环毛蚓	<i>Pheretima aspergillum</i>	9	亳州	33	毛利远盲蚓	<i>A. morrisi</i>	2	安国
2	参环毛蚓	<i>P. aspergillum</i>	15	安国	34	壮伟远盲蚓	<i>A. robustus</i>	1	重庆
3	参环毛蚓	<i>P. aspergillum</i>	14	玉林	35	皮质远盲蚓	<i>A. corticis</i>	1	亳州
4	参环毛蚓	<i>P. aspergillum</i>	4	四川荷花池	36	优雅远盲蚓	<i>A. gracilis</i>	1	普宁
5	参环毛蚓	<i>P. aspergillum</i>	2	清平	37	舒脉腔蚓	<i>M. schmardae</i>	1	安国
6	通俗环毛蚓	<i>P. vulgaris</i>	3	上海	38	阿美远盲蚓	<i>A. amis</i>	1	上海
7	通俗环毛蚓	<i>P. vulgaris</i>	23	亳州	39	参环毛蚓	<i>Pheretima aspergillum</i>	1	重庆
8	通俗环毛蚓	<i>P. vulgaris</i>	3	安国	40	通俗环毛蚓	<i>P. vulgaris</i>	2	杭州
9	通俗环毛蚓	<i>P. vulgaris</i>	2	玉林	41	威廉环毛蚓	<i>P. guillelmi</i>	1	杭州
10	通俗环毛蚓	<i>P. vulgaris</i>	1	四川荷花池	42	多肉远盲蚓	<i>A. carnosus</i>	2	重庆
11	通俗环毛蚓	<i>P. vulgaris</i>	3	普宁	43	光亮远盲蚓	<i>A. candidus</i>	1	重庆
12	威廉环毛蚓	<i>P. guillelmi</i>	10	上海	44	加州腔环蚓	<i>M. californica</i>	1	重庆
13	威廉环毛蚓	<i>P. guillelmi</i>	1	亳州	45	加州腔环蚓	<i>M. californica</i>	3	上海
14	威廉环毛蚓	<i>P. guillelmi</i>	1	安国	46	加州腔环蚓	<i>M. californica</i>	2	苏州
15	栉盲环毛蚓	<i>P. pectinifera</i>	18	上海	47	露玻远盲蚓	<i>A. tayalis</i>	1	重庆
16	栉盲环毛蚓	<i>P. pectinifera</i>	2	亳州	48	毛利远盲蚓	<i>A. morrisi</i>	1	重庆
17	栉盲环毛蚓	<i>P. pectinifera</i>	1	安国	49	葡腺远盲蚓	<i>A. uvaglandularis</i>	1	重庆
18	保宁腔蚓	<i>Metaphire magna</i>	20	亳州	50	棋盘远盲蚓	<i>A. tessellatus</i>	1	重庆
19	保宁腔蚓	<i>M. magna</i>	4	清平	51	十字远盲蚓	<i>A. cruxus</i>	1	重庆
20	保宁腔蚓	<i>M. magna</i>	4	玉林	52	舒脉腔蚓	<i>M. schmardae</i>	1	重庆
21	保宁腔蚓	<i>M. magna</i>	8	四川荷花池	53	双颐腔蚓	<i>M. bucculenta</i>	1	重庆
22	保宁腔蚓	<i>M. magna</i>	11	安国	54	透明远盲蚓	<i>A. lubricata</i>	1	贵州
23	保宁腔蚓	<i>M. magna</i>	3	菏泽	55	王氏远盲蚓	<i>A. wangi</i>	1	重庆
24	豆叶远盲蚓	<i>Amyntas phaselus</i>	2	亳州	56	武临远盲蚓	<i>A. wulinensis</i>	4	重庆
25	豆叶远盲蚓	<i>A. phaselus</i>	2	四川荷花池	57	颜氏腔环蚓	<i>M. yeni</i>	5	重庆
26	豆叶远盲蚓	<i>A. phaselus</i>	1	安国	58	优雅远盲蚓	<i>A. gracilis</i>	3	重庆
27	暗孔远盲蚓	<i>A. octopapillatus</i>	4	安国	59	优雅远盲蚓	<i>A. gracilis</i>	1	铜仁
28	暗孔远盲蚓	<i>A. octopapillatus</i>	1	玉林	60	友燮远盲蚓	<i>A. yushii</i>	1	杭州
29	暗孔远盲蚓	<i>A. octopapillatus</i>	1	亳州	61	玉质远盲蚓	<i>A. caballus</i>	1	重庆
30	多肉远盲蚓	<i>A. carnosus</i>	2	清平	62	直隶腔蚓	<i>M. tschiliensis</i>	1	湖北
31	安德爱胜蚓	<i>Eisenia andrei</i>	1	安国	63	壮伟远盲蚓	<i>A. robustus</i>	3	重庆
32	枯萎远盲蚓	<i>A. emarcidus</i>	1	亳州	64	湖北远盲蚓	<i>A. hupeiensis</i>	2	杭州

2.2 基因组 DNA 提取 使用 70% 乙醇擦拭样品表面,晾干后取地龙肌肉组织样品约 30 mg 置于 2 mL 离心管中。经 DNA 提取研磨仪多次研磨至粉末后,按照 Dneasy 血液及组织核酸提取试剂盒说明书提取总 DNA。提取的地龙 DNA 采用 Nanodrop 2000 型微量核酸定量分析仪测定浓度,并根据吸光度 A_{260}/A_{280} , A_{260}/A_{230} 的值判断其 DNA 提取质量,用于 PCR 扩增或于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

2.3 单重 PCR 扩增条件的确定 先分别建立广地龙和沪地龙的特异性鉴别方法,考察其适用性。特异性 PCR 反应初始体系 25 μL , 包含上游及下游引物 0.25 μL , 10 \times Ex buffer 2.5 μL , 10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ dNTPs 1.5 μL , Ex Taq DNA 聚合酶 0.2 μL , DNA 模板 1 μL , 加灭菌蒸馏水补足至 25 μL (表 2)。PCR 反应结束后,反应产物中加入 6 \times Loading buffer 5 μL (Takara 公司),混匀后于溴化乙锭 (EB) 染色

表 2 地龙鉴别引物

Table 2 Primers and PCR reaction conditions for Pheretima identification

引物名称	靶向物种	序列(5'-3')
SHMY-366	参环毛蚓	上游 CTAATACGGGAAGCGACAA
		下游 GACTGCTCCCACTTATACTATGA
TSWL-487	通俗环毛蚓	上游 GGCAGGGATAGTAGCAGCAA
	威廉环毛蚓	下游 GAATTGAGCTAAGACAGCCC
ZM-475	栉盲环毛蚓	上游 TACTGGTAGGGATAGAAGTAGTAGG
		下游 ACCGGGCTCATTCCTGAGC

的 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测,经 SYNGENE 凝胶成像系统观察、成像。

使用地龙鉴别引物对地龙正品及其常见伪品 DNA 进行扩增,分别考察了①退火温度,58,60,62,64 °C;②PCR 循环次数,31,33,35,37 循环;③模板 DNA 浓度,100,30,10,3 ng;④Taq 酶种类,Ex Taq, rTaq, 2 × T5 Super PCR Mix, Mighty Amp, SpeedSTAR HS Taq, 2 × Master Mix with standard buffer, Taq 2 × Master Mix。⑤ PCR 仪型号, Veriti™ 型, ABI 9700 型, PTC-100 型, TC-512 型。

2.4 多重 PCR 鉴别体系的建立 经 2.3 项下确定的单重 PCR 扩增条件,确定地龙特异性 PCR 鉴别的适用范围,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

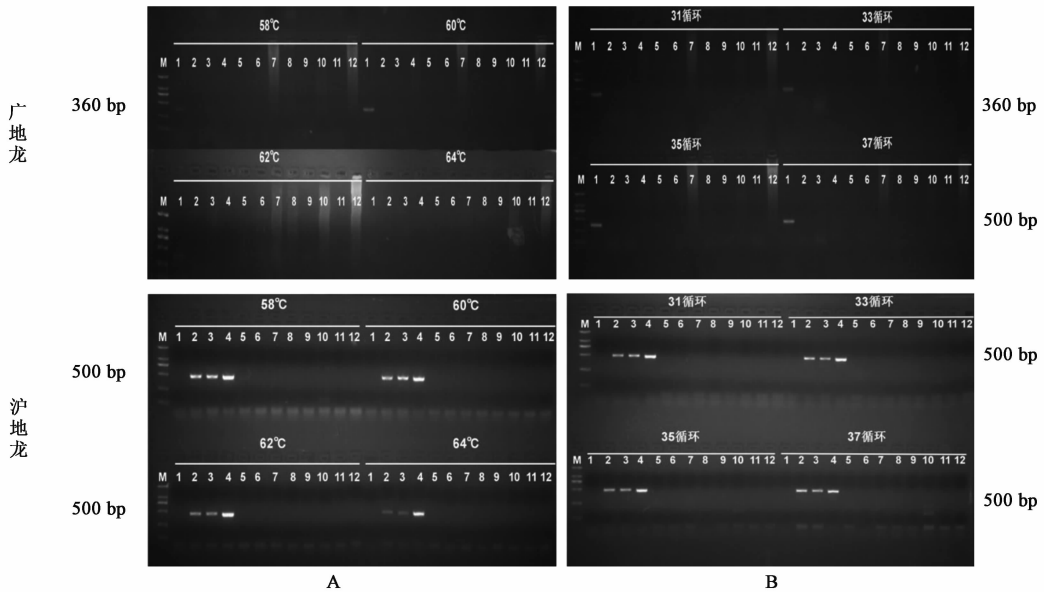
多重位点特异性 PCR 鉴别条件。反应体系为 25 μL:上下游引物 1.5 μL(各 0.25 μL), 10 × Ex Buffer 2.5 μL, 10 mmol · L⁻¹ dNTPs 1.5 μL, Ex Taq DNA 聚合酶 0.2 μL, DNA 模板 1 μL, 双蒸灭菌水 10 μL。PCR 扩增条件:预变性 94 °C 3 min;94 °C 变性 20 s, 60 °C 退火 20 s, 72 °C 延伸 45 s, 33 个循环;产物末端 72 °C 延伸 5 min。

2.5 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,进行地龙特异性 PCR 鉴别的适用性实验考察,对市场上收集的 36 批广地龙,61 批沪地龙,及 111 批其他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地龙。

3 结果与分析

3.1 PCR 鉴别条件的确定

3.1.1 退火温度和循环次数 使用对应鉴别引物进行 PCR 扩增,退火温度为 58 ~ 62 °C 时,广地龙能扩增得到 366 bp 的条带;58 ~ 64 °C 时沪地龙获得约 500 bp 条带(其中通俗环毛蚓和威廉环毛蚓扩增获得 487 bp 的条带,栉盲环毛蚓获得 475 bp 的条带),混伪品及阴性对照无条带(图 1A)。PCR 鉴别反应循环次数为 31 ~ 37 循环时,所有样本均获得特异性鉴别条带,混伪品及阴性对照无条带(图 1B),确定广地龙和沪地龙 PCR 鉴别退火温度均为 60 °C, PCR 循环次数为 33 次。



M. DL2000 Marker; 1. 参环毛蚓; 2. 通俗环毛蚓; 3. 威廉环毛蚓; 4. 栉盲环毛蚓; 5. 豆叶远盲蚓; 6. 保宁腔蚓; 7. 壮伟远盲蚓; 8. 皮质远盲蚓; 9. 暗孔远盲蚓; 10. 优雅远盲蚓; 11. 多肉远盲蚓; 12. 阴性对照(图 2, 3 同)

图 1 退火温度(A)和循环次数(B)对地龙特异性 PCR 鉴别的影响

Fig. 1 Influence of annealing temperature(A) and thermo cycles number(B) on Pheretima of specific identification

3.1.2 DNA 模板量考察 对 25 μL PCR 反应体系中 DNA 模板量进行考察,调整 DNA 模板量分别为 100,30,10,3 ng 进行地龙特异性 PCR 鉴别反应。广

地龙特异性 PCR 鉴别体系除模板 DNA 量为 100 ng 外均扩增获得特异性结果,沪地龙特异性 PCR 鉴别体系使用 3 ~ 100 ng 均扩增获得特异性结果(图 2)。

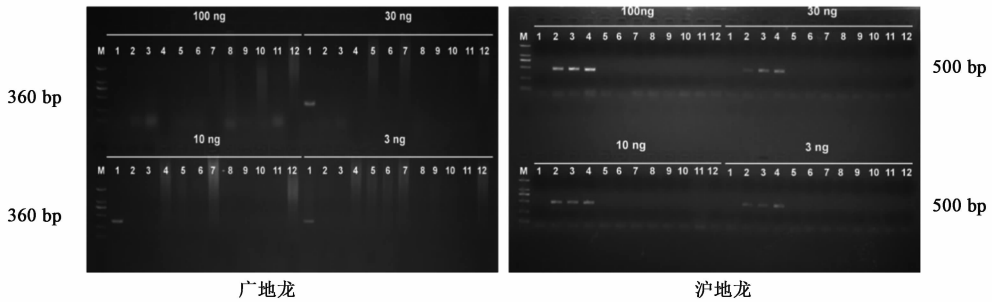


图 2 DNA 模板量对地龙特异性 PCR 鉴别的影响

Fig.2 Influence of DNA concentration on Pheretima of specific identification

3.2 方法耐受性实验考察

3.2.1 Taq 酶种类考察 考察不同酶对广地龙和沪地龙鉴别结果的影响,表明沪地龙 PCR 鉴别体系中使用 Ex Taq, Mighty Amp, 2 \times Master Mix, Taq 2 \times Master Mix 等 DNA 聚合酶进行扩增均获得特异性鉴别结果,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;而广地龙 PCR 鉴别体系使用 T5 和 r Taq 扩增获得特异性鉴别结果,但使用高保真的 Mighty Amp 和 SpeedSTAR HS Taq 扩增时保育腔蚓、暗孔远盲蚓、多肉远盲蚓等 3 个物种出现假阳性条带(图 3A)。

均未扩增,表明以上 4 种型号的 PCR 仪均能进行鉴别(图 3B)。

3.3 多重特异性 PCR 建立 经退火温度和循环数的微调,将广地龙引物和沪地龙引物组合在一起进行多重 PCR 鉴别。结果显示,在 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火温度下,经 33 个 PCR 循环后,4 种地龙的凝胶电泳均出现特异性单一条带,广地龙和沪地龙分别产生约 360 bp 和 500 bp 的特异性鉴别条带,而其余混伪品多重 PCR 反应后均无条带(图 4)。使用该方法可以鉴别待检样品是否为正品地龙且同时区分是否为广地龙或沪地龙。

3.2.2 PCR 仪考察 分别用 Veriti, ABI 9700, PTC-100 以及 TC-512 型基因扩增仪进行 PCR 扩增,所有地龙正品均能扩增得到亮带,阴性对照在此范围内

3.4 适用性考察 分别对不同药材市场地龙药材及不同地区蚯蚓原动物样本进行扩增,产物经琼脂糖凝胶电泳检测,发现参环毛蚓产生约 360 bp 的

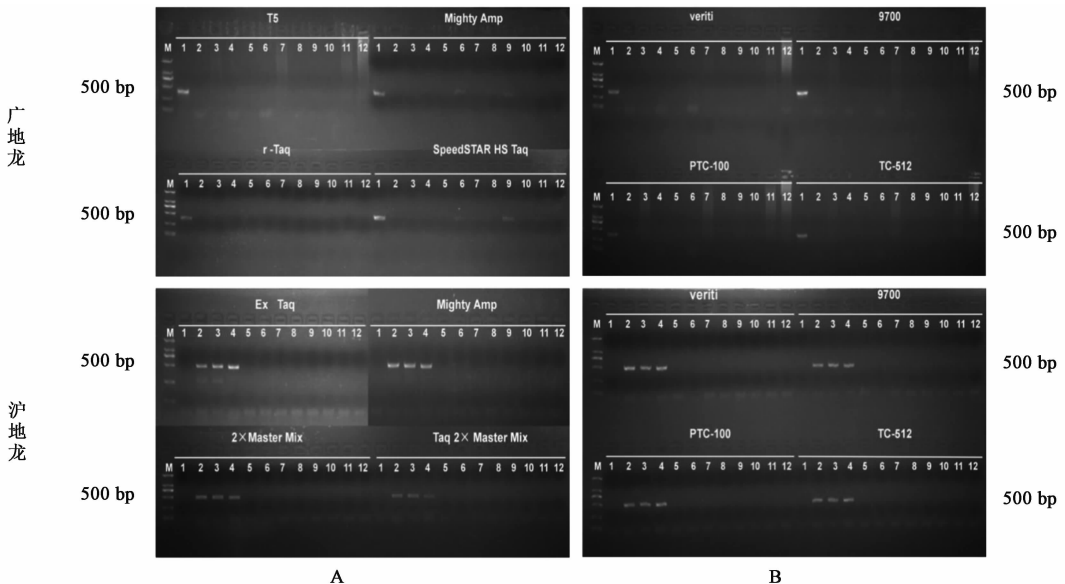


图 3 Taq 酶种类(A)和 PCR 仪(B)对地龙特异性 PCR 鉴别的影响

Fig.3 Influence of different kinds of Taq polymerases(A) and thermocyclers(B) on Pheretima of specific identification

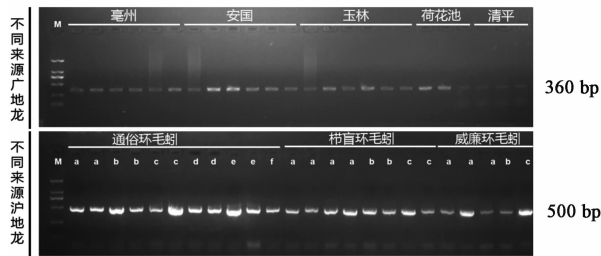


M. DL2000 Marker; 1. 参环毛蚓; 2. 通俗环毛蚓; 3. 威廉环毛蚓; 4. 栉盲环毛蚓; 5. 豆叶远盲蚓; 6. 保宁腔蚓; 7. 壮伟远盲蚓; 8. 皮质远盲蚓; 9. 暗孔远盲蚓; 10. 优雅远盲蚓; 11. 多肉远盲蚓; 12. 露玻远盲蚓; 13. 毛利远盲蚓; 14. 葡腺远盲蚓; 15. 棋盘远盲蚓; 16. 十字远盲蚓; 17. 舒脉腔蚓; 18. 双颞腔蚓; 19. 透明远盲蚓; 20. 王氏远盲蚓; 21. 武临远盲蚓; 22. 颜氏腔环蚓; 23. 优雅远盲蚓; 24. 阴性对照

图 4 参环毛蚓、通俗环毛蚓、威廉环毛蚓、栉盲环毛蚓的多重位点特异性 PCR 鉴别

Fig. 4 Multiplex allele-specific PCR identification results of medicinal Pheretima and its adulterants

明亮单一条带,通俗环毛蚓、威廉环毛蚓、栉盲环毛蚓产生约 500 bp 的明亮单一条带,伪品无条带,不同市场来源的正品地龙均产生一致结果,表明该体系能稳定准确地鉴别地龙(图 5)。



a. 上海; b. 亳州; c. 安国; d. 玉林; e. 四川荷花池; f. 普宁

图 5 不同来源的 48 批正品地龙多重位点特异性 PCR 鉴别

Fig. 5 Multiplex allele-specific PCR identification results of 48 batches authentic Pheretima from different regions

4 讨论

影响多重 PCR 扩增的因素很多,其中适宜的引物浓度是影响多重 PCR 扩增的重要因素之一。本研究建立多重 PCR 鉴别方法时对引物用量进行了多轮实验的优化。结果发现广地龙与沪地龙鉴别引物相对比例对地龙多重 PCR 鉴别具有重要影响,当广地龙与沪地龙鉴别引物比为 1:1, 2:1, 3:1, 1:2 时,随着鉴别引物比的增大,其鉴别条带越明显,当广地龙引物与沪地龙引物比为 3:1 时获最佳鉴别结果;而当引物比为 1:2 时,广地龙无条带。

此外,引物的设计部分也是多重 PCR 扩增中重要的一个环节。本研究的地龙特异性 PCR 鉴别引物主要是根据正品地龙和常见混伪品在 COI 序列的碱基差异设计的。它确保了正品地龙引物的 3' 末端与 SNP 位点匹配,而与混伪品的碱基错配^[16],从而使所设计的引物具有很强的特异性。地龙样品的特异性 PCR 鉴别结果均与形态学鉴别结果一致,

表明该鉴别引物在地龙类药材真伪鉴别方面具有可靠性和稳定性。本研究建立的特异性 PCR 反应不仅操作简便,而且准确性好、特异性高,确保了地龙药材的正品基原,保证了临床的用药安全。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:122.
- [2] 黄庆,李志武,马志国,等. 地龙的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2018,24(13):220-226.
- [3] 魏艺聪,蒋超,袁媛,等. 基于 COI 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.
- [4] 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.
- [5] 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.
- [6] 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.
- [7] 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.
- [8] 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.
- [9] 罗宇琴,蒋超,袁媛,等. 多重位点特异性 PCR 鉴别霍山石斛、铁皮石斛与齿瓣石斛药材[J]. 药学学报,2017,52(6):998-1006.
- [10] 孟虎彪,袁媛,刘富艳,等. 牛膝及川牛膝配方颗粒位点特异性 PCR 鉴别研究[J]. 中国中药杂志,2018,43(5):945-951.
- [11] 韦健红,李薇,吴文如,等. 基于 COI 与 16S rRNA 基因对广地龙的 DNA 分子鉴定研究[J]. 中国药房,2012,23(35):3274-3278.
- [12] 陈维明,马梅,龚玲,等. 广地龙特异性 PCR 分子鉴定[J]. 广州中医药大学学报,2015,32(3):499-503,507.
- [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] 刘富艳,金艳,袁媛,等. 多重位点特异性 PCR 鉴别海龙及其混伪品[J]. 中国实验方剂学杂志,2018,24(15):57-64.
- [15] 刘富艳,袁媛,金艳,等. 多重 PCR 同时鉴别 5 种药用海马[J]. 中国中药杂志,2018,43(23):4562-4568.
- [16] 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 顾雪竹]