中药材鹿心分子鉴定方法及检测试剂的研究

王艳双[1, 3]，姜海瀛[2]，刘美琳[1]，高丽君[2]，李明成[2, 3]，孙丽媛[2]，张丽华[4]，艾金霞[2, 3*]

1. 北华大学医学院，吉林 吉林 132013
2. 北华大学医学技术学院，吉林 吉林 132013
3. 北华大学 吉林省中药 DNA 指纹检测技术科技创新中心，吉林 吉林 132013
4. 吉林雷宁食品药品检测技术服务有限公司，吉林 吉林 132013

摘 要：目的 建立中药材鹿心 DNA 指纹鉴定方法，研发鹿心 DNA 检测试剂盒。**方法** 以梅花鹿和马鹿 mtDNA *Cytb* 基因作为靶基因，设计小片段特异性引物，研制鹿心 DNA 提取及 PCR 检测试剂；应用分子克隆及测序技术，克隆鹿心对照药材；并对试剂的特异性、重现性、稳定性及灵敏度进行考察；对市售鹿心样品进行真伪鉴定。**结果** 自主研发的试剂提取鹿心的 DNA 浓度纯度均达到 PCR 的要求；在退火温度为 63 ℃时引物的特异性最强；克隆测序后的鹿心 DNA 序列与鹿心 mtDNA *Cytb* 特异指纹区段序列一致；自主研发的试剂重现性、稳定性良好，灵敏度达到 0.5%；对市售 30 个鹿心样品进行检测，伪品率为 40%。**结论** 建立的鹿心 DNA 指纹鉴定方法特异、准确、可靠，研制的鹿心 DNA 检测试剂盒操作简便、结果稳定。

关键词：鹿心；DNA 指纹鉴定；DNA 检测试剂盒；分子克隆；测序技术

中图分类号：R282.2 **文献标志码：**A **文章编号：**0253 - 2670(2021)02 - 0544 - 08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.02.028

Study on molecular identification method and detection reagent of Chinese medicinal materials deer heart

WANG Yan-shuang[1, 3], JIANG Hai-ying[2], LIU Mei-lin[1], GAO Li-jun[2], LI Ming-cheng[2, 3], SUN Li-yuan[2], ZHANG Li-hua[4], AI Jin-xia[2, 3]

1. Medical College, Beihua University, Jilin 132013, China
2. School of Medical Technology, Beihua University, Jilin 132013, China
3. Chinese Medicine DNA Fingerprint Detection Technology Innovation Center, Beihua University, Jilin 132013, China
4. Jilin Leining Food and Drug Testing Technology Service Co., Ltd., Jilin 132013, China

Abstract: Objective To establish a DNA fingerprint identification method for Chinese medicinal materials deer heart and develop DNA detection kit for deer heart. **Methods** Using the mtDNA *Cytb* gene of *Cervus nippon* and *C. elaphus* as the target gene, small fragment specific primers were designed and used to develop the deer heart DNA extraction reagent and PCR detection reagent. Using molecular cloning and the sequencing technology, standard materials to deer heart was cloned. And then the specificity, reproducibility, stability and sensitivity of the reagent was investigated. Finally the authenticity of the commercial deer heart samples was verified. **Results** The concentration and purity of DNA extracted by the self-developed reagent reached the requirement of PCR. The specificity of the primer was the strongest when the annealing temperature was 63 ℃. The DNA sequence of deer heart after cloning was consistent with the specific fingerprint section of sika deer heart mtDNA *Cytb* gene. Self-developed reagent had good reproducibility, stability and sensitivity up to 0.5%. Thirty baked deer heart samples for sale were tested and the rate of counterfeit was 40%. **Conclusion** The DNA fingerprint identification method of deer heart established in this study is specific, accurate and reliable. The DNA detection kit for deer heart which developed in this study is simple to use and the result is stable.

Key words: deer heart; DNA fingerprint identification method; DNA detection kit; molecular cloning; sequencing technology

收稿日期：2020-06-09

基金项目：吉林省发改委项目（2018C048-2）；吉林省科技发展计划项目（20180201023YY，20190303093SF，20190301014NY，20200404152YY，20200403047SF）；吉林省科技创新中心建设项目（20190902018TC）

作者简介：王艳双，女，博士，副教授，研究方向为食品及药品 DNA 指纹技术研究与应用。E-mal: wangys5521@163.com

***通信作者：**艾金霞，女，硕士，教授，研究方向为食品及药品 DNA 指纹技术研究与应用。E-mal: 1047085280@qq.com

鹿心为为哺乳纲偶蹄目鹿科鹿属动物梅花鹿 *Cervus nippon* Temminck 或马鹿 *C. elaphus* Linnacus 的心脏[1]。鹿心为吉林省的习用药材，收载在《吉药管注字》［2000］第 132 号。传统中医认为鹿心具有养气补血、安神的功效，以鹿心为主要原料的“心脑康胶囊”（国药准字号 Z20063078），用于冠心病、心绞痛及脑动脉硬化症疗效显著[2-3]。由于鹿心药效独特，疗效确切，其市场价格也较高，大量伪品和混淆品（多为性状相似的猪心、马心、牛心、羊心等）以假乱真现象严重，影响着人们的生命安全。

中药材传统的鉴定方法包括基原鉴定、性状鉴定、显微鉴定、理化鉴定，容易受主观因素及加工炮制的影响[4]，市售鹿心多为炮制过的干燥品，目前，鹿心尚无法定的质量标准，亦无明确的功效成分，很难通过传统方法进行鉴定。中药材品种的差异性归根结底是由物种的遗传物质 DNA 的不同引起的，随着分子生物学技术的发展，依据 DNA 在不同生物个体的差异来鉴别生物物种的分子鉴定技术正逐步成为中药鉴定的主要手段。《中国药典》2020 年版一部收录了川贝母、乌梢蛇、金钱白花蛇以及蕲蛇的分子鉴定方法[5-8]。植物类中药材如紫苏、独活、西洋参、当归、绞股蓝、红景天、浙贝母等的分子鉴定有相关文献报道[9-15]，鹿源类中药材的分子鉴定如鹿茸、鹿血、鹿鞭、鹿胎的研究也有相关报道[16-19]，但是鹿心的分子鉴定及检测试剂的研究未见相关报道。

因此，本研究利用鹿心、猪心、马心、牛心、羊心、驴心在 DNA 水平上的差异，以梅花鹿和马鹿线粒体 DNA 细胞色素 b（mtDNA *Cytb*）基因为靶基因设计小片段的特异性引物，采用 PCR 技术、分子克隆及测序技术，建立中药材鹿心 DNA 指纹鉴定方法，在此基础上开发出鹿心 DNA 检测试剂盒，在分子水平上为鹿心真伪鉴定提供一种标准化、规范化的检验方式。

1 材料与仪器

1.1 材料

鹿心对照药材、鹿心干燥样品（梅花鹿鹿心 1、2，马鹿鹿心 1、2，60～80 ℃烘烤）均由白城市食品药品检验所提供，猪心、马心、牛心、羊心、驴心购自吉林市食品市场（60～80 ℃烘烤后备用）。DL100bp Marker、DNA 回收试剂盒、pGM-T 载体连接试剂盒、DH5α 感受态细胞、质粒 DNA 小量提取试剂盒、氨苄青霉素（Ampicillin，Amp）、5-溴-4-氯-3-吲哚-β-*D*-半乳糖苷（5-bromo-4-chloro-3-indolyl β-*D*-galactoside *X*-gal）、异丙基-β-*D*-硫代吡喃半乳糖苷（Isopropyl-β-*D*-thiogalactopyranoside，IPTG）、2×Taq PCR Master Mix 均购自北京天根生化科技有限公司；引物由上海生物工程有限公司合成。市售鹿心样品信息见表 1。

表 1 市售鹿心样品信息

Table 1 Information of samples

序号	样品编号	样品来源	品质
1	JL-JL-LX-1	吉林市龙潭山鹿制品店	正品
2	JL-JL-LX-2	吉林市龙潭山鹿制品店	正品
3	JL-TH-LX-3	通化市郑翔鹿制品店	正品
4	JL-TH-LX-4	通化市郑翔鹿制品店	伪品
5	JL-SY-LX-5	长春市双阳万圣鹿制品店	正品
6	JL-SY-LX-6	长春市双阳万圣鹿制品店	正品
7	JL-TN-LX-7	白城市洮南关东鹿制品店	正品
8	JL-TN-LX-8	白城市洮南关东鹿制品店	伪品
9	JL-JL-LX-9	吉林市东晟鹿制品店	伪品
10	JL-JL-LX-10	吉林市东晟鹿制品店	正品
11	JL-JL-LX-11	吉林市大海德药店	正品
12	JL-JL-LX-12	吉林市大海德药店	伪品
13	JL-JL-LX-13	吉林市益和大药房有限公司	伪品
14	JL-JL-LX-14	吉林市益和大药房有限公司	正品
15	JL-JL-LX-15	吉林市利群大药房	正品
16	JL-JL-LX-16	吉林市利群大药房	正品
17	JL-YJ-LX-17	延吉市利群大药房	伪品
18	JL-YJ-LX-18	延吉市利群大药房	正品
19	JL-YJ-LX-19	延吉市大保健大药房	正品
20	JL-YJ-LX-20	延吉市大保健大药房	伪品
21	JL-SP-LX-21	四平市天一大药房	伪品
22	JL-SP-LX-22	四平市天一大药房	伪品
23	JL-SP-LX-23	四平市神农大药房	伪品
24	JL-SP-LX-24	四平市神农大药房	正品
25	JL-CC-LX-25	长春市颐和大药房	伪品
26	JL-CC-LX-26	长春市颐和大药房	正品
27	JL-CC-LX-27	长春市九州医药商行	正品
28	JL-CC-LX-28	长春市九州医药商行	正品
29	JL-CC-LX-29	长春市恒爱大药房	伪品
30	JL-CC-LX-30	长春市恒爱大药房	正品

1.2 仪器

D3024R 型高速冷冻离心机（SCILOGEX 公司，美国）；D1008E 型掌上离心机（大龙创兴实验仪器有限公司）；T100 型 PCR 仪（美国 BIORAD 公司）；

电泳仪、电泳槽（北京君意东方电泳设备有限公司）；UV WHITE-2020D 型紫外凝胶成像分析仪（美国 BIORAD 公司）；微量核酸蛋白分析仪：美国 Quawell（6000＋）；千分之一的电子天平、万分之一的电子天平[奥豪斯仪器（常州）有限公司]；ZKW-C 型恒温水浴锅（上海树立仪器仪表有限公司）。

2 方法

2.1 鹿心 DNA 提取检测试剂盒的设计

试剂盒为 20 次用量，由 7 部分组成，包括 DNA 提取和 PCR 扩增（表 1）。

表 1 自主研发 DNA 提取及 PCR 检测试剂盒的组成及特征

Table 1 Composition and characteristics of self-developed kit DNA extraction and PCR detection kit

组成	体积	作用	温度/℃	使用方法
P1	12 mL	释放 DNA	−20	融化完全后使用
P2	25 mL	纯化 DNA	−20	融化完全后使用
P3	5 mL	溶解 DNA	−20	融化完全后使用
阳性对照液	40 μL	阳性对照	−20	融化完全后使用
阴性对照液	40 μL	阴性对照	−20	融化完全后使用
PCR 反应管	23 μL×20 个	PCR 反应体系	−20	融化完全后使用
DNA 色谱柱	20 个	纯化 DNA		

2.2 基因组 DNA 的提取及质量鉴定

2.2.1 自主研发的试剂盒法提取的基因组 DNA 取供试样品 5 g，置乳钵中，充分研磨使成粉末，取样品粉末 100 mg 置 1.5 mL 离心管中；加入 P1 细胞裂解液 500 μL［1 mol/L Tris-HCl（pH 7.5）1 mL，0.5 mol/L EDTA 2 mL，NaCl 0.58 g，10% SDS 10 mL，20 mg/mL 蛋白酶 K 1 mL，加双蒸水定容至 100 mL；RNA 酶 5 μL］，充分混匀，在 55 ℃水浴保温 1 h；加到 DNA 纯化柱中，10 000 r/min 离心 3 min，弃去过滤液，加入 P2 洗脱液 600 μL［5 mol/L KAc 26 μL，l mol/L Tris-HCI（pH 7.5）18 μL，0.5 mol/L EDTA（pH 8.0）3 μL，无水乙醇 480 μL，无菌双蒸水 73 μL］，10 000 r/min 离心 1 min；弃去过滤液，反重复洗脱 2 次，弃去过滤液，再离心 2 min；将 DNA 纯化柱转移入另一离心管中，加入 P3 无菌双蒸水 100 μL，室温放置 10～20 min 后，10 000 r/min 离心 2 min；离心液即供试品 DNA 溶液，置 −20 ℃保存备用。另取鹿心阳性对照药材 100 mg，同法制成阳性对照药材模板 DNA 溶液。

2.2.2 基因组 DNA 浓度及纯度的测定 将上述提取的模板 DNA 原溶液 1 μL，加样到微量核酸蛋白分析仪的加样孔上，使用计算机分析软件自动呈现出 $A_{260\ nm}$ 和 $A_{280\ nm}$ 的吸光度（*A*）值、核酸的纯度（A_{260}/A_{280}）值以及核酸浓度值（$A_{260}\times 50$ ng/μL）。

2.3 PCR 扩增对鹿心引物特异性的检测

以“2.1”项提取的 DNA 为模板，利用鹿心 *Cytb* 基因特异性鉴别引物 F：5’-TCATCGCAGCAC-TCGCTATAGTACACT-3’，R：5’-ATCTCCAAGC-AGGTCTGGTGCGAATAA-3’，扩增片段长度为 194 bp，利用自主研发的试剂盒进行 PCR 扩增。PCR 反应总体积为 25 μL，包括 23 μL 反应体系（PCR 反应管内包括 2×Taq PCR Master Mix 12.5 μL，Primer F（12.5 μmol/L） 1 μL，Primer R（12.5 μmol/L） 1 μL，ddH_2O：8.5 μL）和 DNA 模板 2 μL。利用梯度 PCR 仪，反应参数：94 ℃ 预变性 5 min，循环反应 30 次（94 ℃、30 s，55～65 ℃、30 s，72 ℃、30 s），延伸 72 ℃、5 min。另取无菌 ddH_2O，作为空白对照。并同时利用 *Cytb* 基因通用引物[14] 正向：5’-TACCATGAGGAC-AAATTACATTCTG-3’，反向：5’-CCTCCTAGTT-TGTTAGGGATTGATCG-3’，进行 PCR 扩增，扩增片段长度约 500 bp。反应参数：94 ℃预变性 5min，循环反应 34 次（94 ℃、30 s，57 ℃、30 s，72 ℃、30 s），延伸 72 ℃、5 min。PCR 扩增结束后，使用 1.5%琼脂糖凝胶检测 PCR 结果。

2.4 鹿心对照药材的克隆及测序

取 50 μL 鹿心对照药材的特异性 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳，回收纯化目的基因；将目的基因与 pGM-T 载体连接，16 ℃过夜，组成重组子；碎冰上将重组子转入 DH5α 感受态细胞，增殖 4 h 后取菌液 30 μL 涂布于含 Amp、*X*-gal 和 IPTG 的 LB 固体培养基上，37 ℃过夜，进行蓝-白斑筛选阳性重组子；挑选白色菌落，放入含 Amp 的 LB 液体培养基中培养 12～16 h，次日提取质粒 DNA 进行 PCR 扩增验证为阳性重组体，送至上海生工进行测序。样品均采用正、反 2 个引物双向测序，测序结果分别与每一个样品靶基因进行比对分析。扩增区域 DNA 序列与靶基因特异性指纹区段 DNA 序列同源性为 100%，确定为鹿心 DNA 阳性标准对照液。

2.5 DNA 提取试剂的性能评价

2.5.1 重现性试验 选取鹿心正品和同一批次的提取 DNA 试剂，分别在 3 个实验室，由 3 位技术人员提取基因组 DNA，每人重复 5 次，对 DNA 的完整性、浓度及纯度进行分析，观察 DNA 提取试剂的重现性。

2.5.2 稳定性试验 利用 SPSS17.0 分析软件，对重现性分析所得数据进行统计学分析，并计算 RSD，观察 DNA 提取试剂的稳定性。

2.6 PCR 检测试剂的性能评价

2.6.1 特异性试验 对鹿心正品及其易混品基因组 DNA 进行 PCR 特异性扩增，观察引物的特异性。

2.6.2 重现性试验 对鹿心正品及其易混品分别在 3 个实验室，由 3 位技术人员检测相同样品，观察试剂的重现性。

2.6.3 稳定性试验 随机挑选 1 个试剂盒分别在试剂配制的第 3、6、9、12 个月，对鹿心正品基因组 DNA 进行 PCR 特异性扩增，观察试剂的稳定性。

2.6.4 灵敏性试验 鹿心对照药材初始样本量分别为 100、50、20、10、5、2、1、0.5、0.2、0.1、0.05 mg，提取基因组 DNA，进行 PCR 扩增，检测琼脂糖凝胶电泳分析试剂的灵敏度。

2.7 自主研发的试剂盒检测市售鹿心样品

使用自主研发的鹿心 DNA 指纹检测试剂盒，对市售 30 个鹿心样品进行真伪的鉴定，并与白城市食品药品检验所鉴定结果进行比对。

3 结果与分析

3.1 基因组 DNA 的提取及质量鉴定结果

自主研发试剂提取出鹿心基因组 DNA，通过紫外分光光度法测定 A_{260}/A_{280} 值在 1.7～1.9，计算出的质量浓度为 120～150 ng/μL，达到 PCR 实验的要求（表 2）。

表 2 鹿心正品及其伪品 DNA 纯度及浓度检测结果

Table 2 Determination results of purity and concentration of DNA of deer heart and its adulterants

样品	A_{260nm}	A_{280nm}	纯度	质量浓度/(ng·μL^{-1})
鹿心对照药材	3.104	1.722	1.803	155.20
梅花鹿鹿心 1	2.949	1.628	1.811	147.45
梅花鹿鹿心 2	2.906	1.618	1.796	145.30
马鹿鹿心 1	2.896	1.600	1.809	144.80
马鹿鹿心 2	2.984	1.641	1.818	149.20
猪心	2.755	1.512	1.822	137.75
马心	2.451	1.390	1.763	122.55
牛心	2.514	1.422	1.768	125.70
羊心	2.886	1.583	1.823	144.30
驴心	2.865	1.577	1.821	143.25

3.2 PCR 扩增对鹿心引物特异性的检测

利用特异性引物进行 PCR 扩增后，鹿心对照药材和鹿心正品均在 194 bp 处有 1 条特异性扩增条带，伪品及空白对照均无条带；利用通用引物进行 PCR 扩增后，大约在 500 bp 所有的样品均出现 1 条条带，空白对照无条带（图 1）。

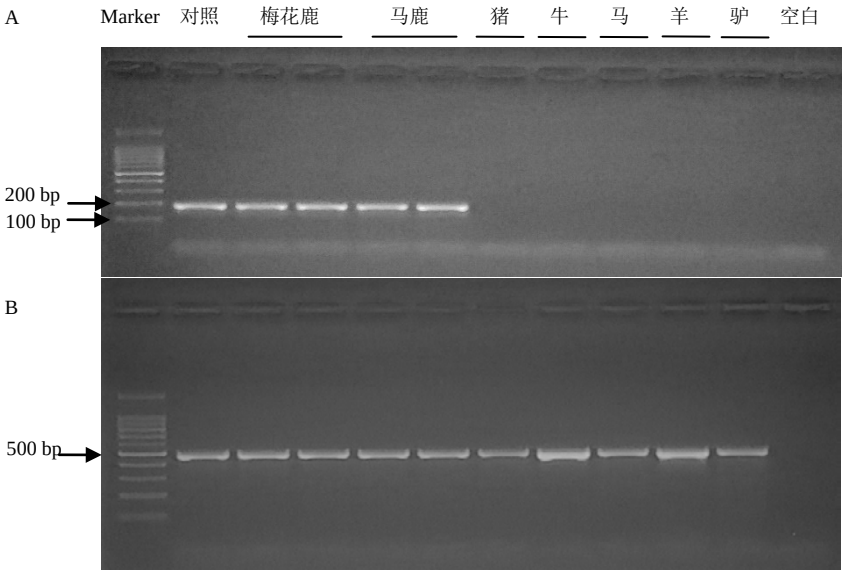


图 1 特异性引物 (A) 和通用引物 (B) 对鹿心 DNA PCR 扩增图谱

Fig. 1 Specific PCR map of deer heart DNA to specific primer (A) and universal primer (B)

3.3 鹿心标准对照液的克隆及测序结果

经过分子克隆蓝-白斑筛选，氨苄阳性平皿出现蓝-白菌落（图 2）。挑区白色菌落培养后，提取质粒 DNA，经特异性引物 PCR 扩增验证条带的位置（图 3）。将鹿心质粒 DNA 送至上海生工进行测序，比对分析结果显示，特异性引物扩增区域 DNA 序列与梅花鹿 *Cytb* 基因特异性指纹区段 DNA 序列完全一致，同源性为 100%，与马鹿 *Cytb* 基因特异性指纹区段 DNA 序列同源性为 96%，与其他伪品序列比对结果均显示没有发现明显的相似性。因此将梅花鹿鹿心 DNA 克隆液确定为鹿心 DNA 阳性对照液（图 4），装入鹿心 DNA 指纹检测试剂盒中。

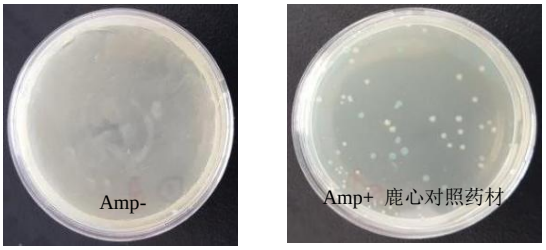


图 2 鹿心 DNA 分子克隆蓝--白斑筛选图

Fig.2 DNA molecular clone blue-white selection of deer heart

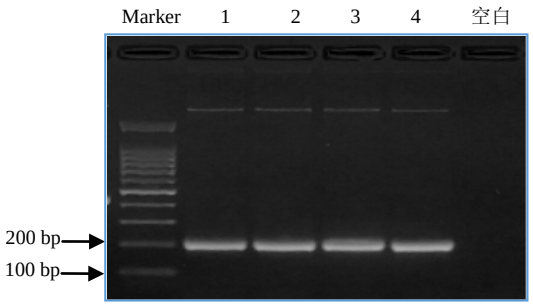


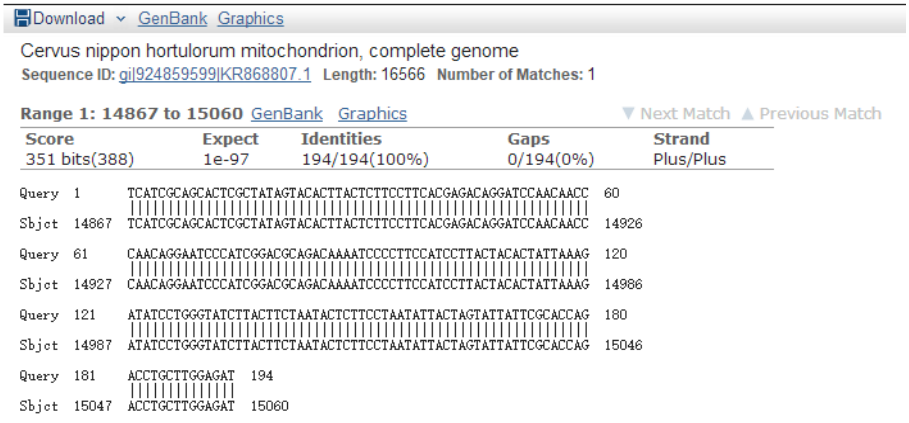
图 3 鹿心质粒 DNA PCR 扩增图谱

Fig. 3 PCR map of deer heart plasmid DNA

3.4 DNA 提取试剂的性能评价

3.4.1 重现性试验 紫外分光光度法检测提取的基因组 DNA，纯度在 1.7～1.9，质量浓度在 130～150 ng/μL。表明自主研发的鹿心 DNA 提取试剂重现性良好。

3.4.2 稳定性试验 （1）组内分析：第 1 组基因组 DNA 的纯度（1.789±0.029），RSD 为 1.60%，DNA 的质量浓度（148.190±2.219）ng/μL，RSD 为 1.49%；第 2 组基因组 DNA 的纯度（1.778±0.040），RSD 为 2.28%，DNA 的质量浓度（141.070±2.837）ng/μL，RSD 为 2.01%；第 3 组基因组 DNA 的纯度（1.809±0.031），RSD 为 1.74%，DNA 的质量浓度（147.78±3.930）ng/μL，RSD 为 2.66%。（2）组间分析：基因组 DNA 的纯度（1.792±0.035），RSD 为 1.96%，DNA 的质量浓度（145.68±4.510）ng/μL，RSD 为 3.10%。可见无论组内和组间的标准差和 RSD 都很小，表明各组数据非常接近，离散度非常低。证实自主研发的鹿心 DNA 提取试剂稳定性良好。


Download GenBank Graphics

Cervus nippon hortulorum mitochondrion, complete genome

Sequence ID: gi|924859599|KR868807.1 Length: 16566 Number of Matches: 1

Range 1: 14867 to 15060 GenBank Graphics ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
351 bits(388)	1e-97	194/194(100%)	0/194(0%)	Plus/Plus

```
Query  1      TCATCGCAGCACTCGCTATAGTACACTTACTCTTCCTTCACGAGACAGGATCCAACAACC  60
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  14867  TCATCGCAGCACTCGCTATAGTACACTTACTCTTCCTTCACGAGACAGGATCCAACAACC  14926

Query  61     CAACAGGAATCCCATCGGACGCAGACAAAATCCCCTTCCATCCTTACTACACTATTAAAG  120
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  14927  CAACAGGAATCCCATCGGACGCAGACAAAATCCCCTTCCATCCTTACTACACTATTAAAG  14986

Query  121    ATATCCTGGGTATCTTACTTCTAATACTCTTCCTAATATTACTAGTATTATTCGCACCAG  180
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  14987  ATATCCTGGGTATCTTACTTCTAATACTCTTCCTAATATTACTAGTATTATTCGCACCAG  15046

Query  181    ACCTGCTTGGAGAT  194
              ||||||||||||||
Sbjct  15047  ACCTGCTTGGAGAT  15060
```

图 4 鹿心质粒 DNA 测序与梅花鹿 mtDNA *Cytb* 基因比对结果

Fig. 4 Comparison of deer heart plasmid DNA sequencing with mtDNA *Cytb* gene in *C. nippon*

3.5 PCR 检测试剂的性能评价

3.5.1 特异性试验 使用自主研发的鹿心 DNA 指纹检测试剂盒进行试验，鹿心对照液（A）、鹿心对照药材（B）和鹿心样品均在 194 bp 处有 1 条特异性扩增条带，而猪心、牛心、马心、羊心、驴心及空白对照均未出现扩增条带。

3.5.2 重现性试验 使用自主研发的鹿心 DNA 指纹检测试剂盒，由 3 个实验室的 3 个技术人员进行试验，鹿心对照液、鹿心对照药材和鹿心样品均在 194 bp 处有一条特异性扩增条带，而猪心、牛

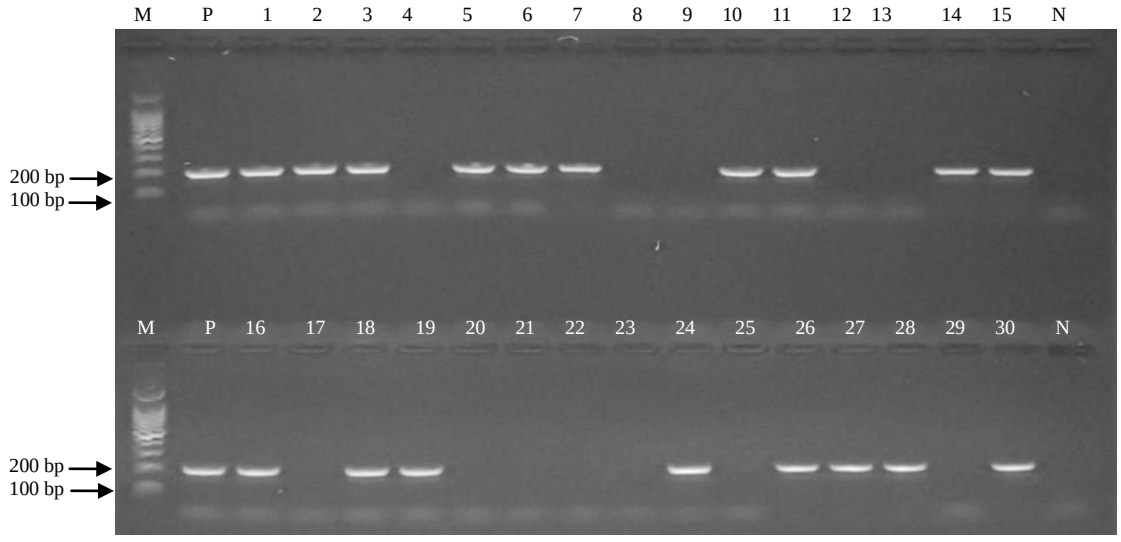
心、马心、羊心、驴心样品及空白对照均未出现扩增条带。

3.5.3 稳定性试验 使用自主研发的鹿心 DNA 指纹检测试剂盒进行试验，试剂配制后的 3、6、9、12 个月鹿心对照液、鹿心对照药材和鹿心样品均在 194 bp 处有 1 条特异性扩增条带，而空白对照未出现扩增条带。

3.5.4 灵敏度试验 使用自主研发的鹿心 DNA 指纹检测试剂盒进行试验，随着样品取样量的减少，PCR 产物条带的亮度逐渐降低，取样量为 0.5 mg 时，PCR 产物条带清晰可见，取样量低于 0.5 mg 时，PCR 产物条带均隐约可见模糊不清。因此，自主研发的鹿心 DNA 指纹检测试剂盒检测的灵敏度为 0.5%。

3.6 自主研发的试剂盒检测市售鹿心样品检测结果

使用自主研发的鹿心 DNA 指纹检测试剂盒进行检测，市售 30 个鹿心样品，18 个是正品（有特异条带），12 个是伪品（无特异条带），伪品率为 40%。与白城市食品药品检验所鉴定结果一致（图 5）。



M-Marker P-鹿心阳性对照液 1～30-同表 1 样品编号 N-空白对照

M-Marker P-positive control solution of deer heart 1—30-same as table 1 N-blank control

图 5 自主研发的试剂盒检测市售鹿心样品琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 5 Electrophoresis map of PCR of detection of product from deer heart and its adulterants by self-developed kit

4 讨论

中药材基原真伪鉴别是中药学研究领域中的重要研究方向和首要问题，中药材是否“正本清源”直接影响到用药安全。对中药材基原鉴别可以从源头上控制中药的质量，对保障中药生产和中药产业的健康发展起到举足轻重的作用[20]。

线粒体 DNA 作为细胞核外遗传信息载体，具有结构简单、不含间隔区、不含内含子、无重复序列、母系遗传、进化速度快等特点，是研究物种群体分子分类、遗传结构、分子系统发育的理想分子标记[21-22]。Cytb 是线粒体 DNA 唯一参与线粒体呼吸链电子传递的细胞色素，Cytb 进化速度适中，含有丰富的 SNP 位点，结构相对保守，适用于动物种属间差异和进化关系的研究分析[23-26]。作为有效的分子遗传学标记是目前研究的热点，极大地弥补了传统鉴定的不足。

本研究考虑干燥鹿心样品是经高温烘烤而成，会导致 DNA 降解严重，同时根据各样品 *Cytb* 基因 SNP 位点的差异，设计小片段 194 bp 的特异性引物进行 PCR 扩增，在退火温度为 63 ℃时引物特异性最强，引物只与鹿心的 *Cytb* 基因的指纹区段特异性结合，扩增出大量的产物，在 194 bp 处出现一条特异性条带；但是，在此温度时，引物不会与其他伪品的指纹区段结合，因此伪品与空白对照均无条带。利用鹿心 *Cytb* 基因特异性引物，只要优化好引物的退火温度，就可以准确地鉴定出鹿心的真伪。而如果是通用引物进行扩增，正品与伪品均会出现一样的条带，无法区分，就必须进行聚合酶链式反应-限制性片段长度多态性（Polymerase chain reaction-restriction

fragment length polymorphism，RCP-RFLP）。如果就是用来区分鹿心与不同种属的伪品，本研究建立的鉴定方法简单易行，结果准确可靠，完全可以区分。但是如果区分同种属的样本如梅花鹿鹿心与马鹿鹿心，那么 RCP-RFLP 还是很有优势的，如王凤霞等[16]对鹿血的 PCR-RFLP 鉴定研究。因为本研究样品鹿心指的就是梅花鹿与马鹿的心脏，所以不用细分，因此本研究建立的鹿心 DNA 指纹鉴定方法只要与不同种属的伪品区分开来即可。

运用 DNA 序列分析对比法对未知样品是否属于某一特定物种是最可靠的，最令信服的鉴定方法[27-28]。为了验证引物的特异性以及扩增的特异性基因片段序列的正确性，对鹿心对照药材特异性 PCR 扩增片段进行克隆和基因序列测定，比对结果与梅花鹿 *Cytb* 特异的指纹区段 DNA 序列完全一致，同源性为 100%；与马鹿 *Cytb* 特异的指纹区段 DNA 序列同源性高达 96%，有 8 个碱基存在差异，表明在种的水平上该指纹区段进化是保守的；而与其他伪品序列比对均显示没有明显的相似性。表明本研究建立的鹿心 DNA 指纹鉴定方法具有特异性、可行性和可靠性，并且验证了如果是同种属样本的鉴定 RCP-RFLP 的优势。因此将梅花鹿鹿心克隆液作为鹿心对照液装进试剂盒中。

本研究根据建立了鹿心 DNA 指纹鉴定方法，进而研制出鹿心 DNA 指纹检测试剂盒，从特异性、重现性、稳定性及灵敏度 4 个方面进行评价，性能良好。并且对市售 30 个鹿心样品进行检测，结果 18 个正品，12 个伪品，伪品率为 40%，实用性强。本试剂盒，包括 DNA 提取试剂、PCR 检测试剂和阳性对照药材 DNA 克隆液，只需按照操作流程约 4 h 就可以快速、准确地完成鹿心真伪的鉴定，实现了鹿心分子鉴定的标准化和规范化，达到可以推广的条件。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] Glenn T C, Ojerio R S, Braun M J. Microsatellite DNA loci for genetic studies of cranes [J]. *Proc North Am Crane Workshop*, 1997, 7: 36-45.

[2] Ellegren H, Chowdhary B P, Johansson M, *et al*. Primary linkage map of the genome revealsa low rate of genetic recombination [J]. *Genetic*, 1994, 137: 1089-1100.

[3] 徐吉臣, 朱立煌. 遗传图谱中的分子标记 [J]. 生物工程进展, 1992, 12(5): 1-3.

[4] 张军, 邓伟, 张进, 等. 心脑康胶囊联合曲美他嗪治疗冠心病心绞痛的临床研究 [J]. 现代药物与临床, 2017, 32(1): 25-29.

[5] 中国药典 [S]. 一部. 2020：38-39.

[6] 中国药典 [S]. 一部. 2020：80-81.

[7] 中国药典 [S]. 一部. 2020：229.

[8] 中国药典 [S]. 一部. 2020：388-389.

[9] 夏至, 李贺敏, 张红瑞, 等. 紫苏及其变种的分子鉴定和亲缘关系研究 [J]. 中草药, 2013, 44(8): 1027-1032.

[10] 魏晓雨, 田义新, 赵智灵, 等. 不同产地西洋参种质遗传多样性的 RAPD 和 ISSR 分析 [J]. 中草药, 2014, 45(21): 3153-3158.

[11] 孙稚颖, 姚辉. 不同产地菘蓝 ISSR 分析与鉴定 [J]. 中草药, 2014, 45(22): 3323-3326.

[12] 李敏, 黄龙妹, 赵欣, 等. 浙贝母特异性 PCR 鉴定方法研究 [J]. 中草药, 2014, 45(12): 1754-1757.

[13] 朱田田, 晋玲, 张裴斯, 等. 基于 ISSR 的甘肃不同产区栽培当归遗传多样性研究 [J]. 中草药, 2015, 46(23): 3549-3557.

[14] 李华, 史美荣, 肖娅萍. 绞股蓝种质资源遗传多样性及亲缘关系的 ISSR 分析 [J]. 中草药, 2015, 46(11): 1666-1672.

[15] 王梦亮, 任晓琳, 崔晋龙, 等. 野生红景天的 RAPD 和 ISSR 遗传多样性分析 [J]. 中草药, 2016, 47(3): 469-473.

[16] 王凤霞, 陈媛媛, 任贵奇, 等. 鹿血的 PCR-RFLP 鉴定研究 [J]. 中草药, 2018, 49(8): 1914-1918.

[17] 白根本, 张林源, 刘春生, 等. 鹿源类中药材 DNA 序列分析及马鹿和梅花鹿的 PCR 鉴定 [J]. 中草药, 2006, 37(10): 1566-1569.

[18] 刘向华, 王义权, 周开亚, 等. 鹿类中药材的位点特异性 PCR 鉴定研究 [J]. 药学学报, 2001, 36(8): 631-635.

[19] 黄璐琦, 袁媛, 蒋超, 等. 一种基于 PCR-RFLP 鉴定中药材鹿茸的方法, 中国: CN105176988A [P]. 2015-12-23.

[20] 李西林, 陈科力, 李薇, 等. 试析中药鉴定中的基原鉴定问题 [J]. 中药材, 2009, 32(12): 1929-1932.

[21] Augot D, Ninio C, Akhoundi M, *et al*. Characterization of two cryptic species, *Culicoides stigma* and *C. parroti* (Diptera: Ceratopogonidae), based on barcode regions and morphology [J]. *J Vector Ecol*, 2013, 38(2): 260-265.

[22] 王健胜, 高雅琴. 基于 Cytb 基因的动物检材种属鉴定在非传统领域的部分运用 [J]. 生物技术通报, 2010(1): 37-43.

[23] Wang Y S, Yuan G X, Zhang L H, *et al*. Establishment of mink heart identification method based on mitochondrial cytochrome b gene and development of its detection kit [J]. *Mitochondrial DNA Part A*, 2019,

30(2): 325-331.

[24] 高丽君, 何程远, 李盈诺, 等. 基于双重 PCR 技术的鹿茸及其伪品 DNA 指纹特征和鉴定 [J]. 吉林大学学报: 医学版, 2018, 44(4): 839-844.

[25] Smerkova K, Vaculovic T, Vaculovicova M, *et al*. DNA interaction with platinum-based cytostatics revealed by DNA sequencing [J]. *Anal Biochem*, 2017, 539: 22-28.

[26] 曲晓娟，李昭燕，宋倩，等. 基于线粒体 DNA 序列分析研究泰山赤鳞鱼的分类和进化 [J]. 山东理工大学学报: 自然科学版, 2017, 31(5): 18-23.

[27] Marco C. The mitochondrial genome, a growing interest inside an organelle [J]. *Int J Nanomed*, 2008, 16: 51-57.

[28] Petrovskaya A V. Genetic structure of the sable *Martes zibellina* L. populations from Magadan oblast as inferred from mitochondrial DNA variation [J]. *Russ J Genet*, 2007, 43(4): 424-429.

[责任编辑 时圣明]