

沪地龙 3 个基原的多重位点特异性 PCR 鉴别

李 雷¹, 李奇璋², 张汉明¹, 张 磊^{1*}

1. 海军军医大学药学院, 上海 200433

2. 淮北师范大学 生命科学学院创新药物研发中心, 安徽 淮北 235000

摘要:目的 沪地龙 3 个基原药材(通俗环毛蚓 *Pheretima vulgaris*、威廉环毛蚓 *P. guillelmi*、栉盲环毛蚓 *P. pectinifera*) 在外观性状方面相似度高, 传统鉴定方法难以有效区分, 通过建立多重位点特异性 PCR 方法同时鉴别沪地龙 3 个基原。方法 通过比对沪地龙和其他 7 个蚯蚓品种线粒体全基因序列的多态性位点差异, 分别设计通俗环毛蚓、威廉环毛蚓及栉盲环毛蚓的特异性鉴别引物, 建立单基原反应体系, 并对耐受性和适用性进行考察和验证; 而后优化特异性引物组合, 构建多重位点特异性 PCR 鉴别体系; 反应体系为 25 μ L: 2 \times Rapid Taq Master Mix 12.5 μ L, 引物 1.5 μ L (通俗环毛蚓: 威廉环毛蚓: 栉盲环毛蚓=1:1.2:0.8), DNA 模板 0.5 μ L (50 ng/ μ L), 灭菌水补足至 25 μ L。PCR 扩增条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 4 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 15 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 15 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 20 s, 循环 33 次; 产物末端 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。结果 通俗环毛蚓可得到 535 bp 条带, 威廉环毛蚓可得到 219 bp 条带, 栉盲环毛蚓可得到 435 bp 条带, 其他品种蚯蚓样品均无条带。结论 多重位点特异性 PCR 鉴别体系可根据条带位置同时鉴别沪地龙 3 个基原。该方法可用于沪地龙基原和真伪鉴别, 并为地龙的质量控制和研究提供参考。

关键词: 沪地龙; 通俗环毛蚓; 威廉环毛蚓; 栉盲环毛蚓; 多重位点特异性聚合酶链式反应; 分子鉴定

中图分类号: R286.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)16-5619-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.16.023

Multiplex site-specific PCR identification of three motifs from Shanghai *Pheretima*

LI Lei¹, LI Qizhang², ZHANG Hanming¹, ZHANG Lei¹

1. School of Pharmacy, Naval Medical University, Shanghai 200433, China

2. Innovative Drug Research and Development Center, College of Life Sciences, Huaibei Normal University, Huaibei 235000, China

Abstract: Objective The three motif medicinal materials of Shanghai *Pheretima* (*Pheretima vulgaris*, *P. guillelmi*, *P. pectinifera*) have high similarity in appearance. It is difficult to distinguish by traditional identification methods. Multiple site-specific PCR method was established to identify the three motifs of Shanghai *Pheretima* simultaneously. **Methods** By comparing the differences of polymorphic sites in the mitochondrial whole gene sequences of Shanghai *Pheretima* and seven other earthworm species, specific identifying primers were designed for the *P. vulgaris*, *P. guillelmi*, *P. pectinifera*, respectively, and a single-motif reaction system was set up, and the tolerance and applicability were examined and verified; And then the specific primer combinations were optimized to construct a multiplex site-specific PCR identification system; The reaction system was 25 μ L: 2 \times Rapid Taq Master Mix 12.5 μ L, primers 1.5 μ L (*P. vulgaris*: *P. guillelmi*: *P. pectinifera* = 1:1.2:0.8), DNA template 0.5 μ L (50 ng/ μ L), and double-distilled water to make up to 25 μ L. PCR amplification conditions: pre-denaturation at 95 $^{\circ}$ C for 4 min, denaturation at 95 $^{\circ}$ C for 15 s, annealing at 60 $^{\circ}$ C for 15 s, extension at 72 $^{\circ}$ C for 20 s, cycling 33 times; the product end was extended at 72 $^{\circ}$ C for 7 min. **Results** 535, 435 and 219 bp of fragments were amplified from DNA templates of *P. vulgaris*, *P. guillelmi* and *P. pectinifera*, respectively. There were no bands be found in other earthworms. **Conclusion** The multiplex site-specific PCR identification system can simultaneously identify three motifs of Shanghai *Pheretima* according to the site of the brand. It could be used to identify motif and authenticity of Shanghai *Pheretima* and provide reference for the quality control and research of *Pheretima*.

Key words: Shanghai *Pheretima*; *Pheretima vulgaris* Chen; *Pheretima guillelmi* Michaelsen; *Pheretima pectenifera* Michaelsen; multiplex site-specific polymerase chain reaction; molecular identification

收稿日期: 2024-02-05

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(82225047); 科技部“中医药现代化”重点研发计划(2022YFC3501703)

作者简介: 李 雷, 硕士研究生, 研究方向为中药资源与质量评价。E-mail: 2101202810@qq.com

*通信作者: 张 磊, 教授, 博士生导师, 从事中药资源与生物技术研究。E-mail: zhanglei@smmu.edu.cn

沪地龙是对钜蚓科 (Megascolecidae) 动物通俗环毛蚓 *Pheretima vulgaris* Chen、威廉环毛蚓 *P. guillelmi* Michaelsen 和栉盲环毛蚓 *P. pectinifera* Michaelsen 等 3 个基原药材的合称^[1], 其与广地龙参环毛蚓 *P. aspergillum* E. Perrier 通过性状鉴别即可区分, 而沪地龙 3 个基原药材外观性状相似度高, 仅依据形态特征难以准确鉴别, 导致其不作基原区分混而用之的情况较为突出。2020 年国家食品药品监督管理局对中药复方制剂中的药材基原问题提出了明确要求^[2], 通过固定药材基原与产地提高中药制剂临床疗效的稳定性与安全性, 因此, 有必要建立一种准确、简便的方法对沪地龙进行基原区分。

现代分子生物学方法用于鉴定药材基原已被广泛认可, 其中 DNA 条形码方法可对沪地龙各基原进行区分^[3-4], 但需要测序、拼接和数据库比对, 步骤多耗时长。特异性 PCR 具有专属性强, 操作简便等特点, 在中药材分子鉴定的研究和应用中较多, 蛇类药材的特异性 PCR 鉴定方法已被《中国药典》2020 年版收载^[1], 而且广地龙已基于线粒体 COI 基因、12S rRNA 基因建立了特异性 PCR 鉴定方法^[5-7]。相对于特异性 PCR, 多重位点特异性 PCR 方法具有通量高、特异性强的特点, 在快速检测和科学研究领域中应用广泛^[8-9]。田娜等^[10]设计的多重位点特异性 PCR 能区分广地龙、沪地龙及伪品, 但不能区分沪地龙 3 个基原。因此, 本研究通过比对线粒体全基因组设计了 3 对特异性引物, 并建立了多重位点特异性 PCR 方法用于鉴定沪地龙各基原。

1 仪器与材料

1.1 仪器

JS-power300 型培清电泳仪 (上海培清有限公司); JS-3000 型培清凝胶成像仪 (上海培清有限公司); HH-6 型恒温水浴箱 (上海邦西仪器有限公司); Mastercycler 6331 型 PCR 仪 (德国 Eppendorf 有限公司); TP350 型 PCR 仪 (TarKaRa 有限公司); A300 型 PCR 仪 (杭州 Longgen 有限公司); T20 型 PCR 仪 (杭州 Longgen 有限公司); Nano300 核酸定量分析仪 (杭州奥盛有限公司)。

1.2 试剂

FastPure Cell/Tissue DNA Isolation Mini Kit (批号 DC102-1, 南京诺唯赞生物科技股份有限公司); 2×Rapid Taq Master Mix (批号 P222-AA, 南京诺唯赞生物有限公司); 2×sanTaq PCR Mix (批号 H312KC0052, 上海生工生物工程有限公司); 2×

Trans Taq PCR Super Mix (+dye) (批号 A011, 北京全式金生物技术有限公司); 2×Taq Plus Master Mix (批号 P212-AA, 南京诺唯赞生物有限公司); 无水乙醇 (上海泰坦科技股份有限公司); Marker [批号 3427A, 宝日医生物技术 (北京) 有限公司]; Gel Red [批号 21G0511, 宝天生物科技 (上海) 有限公司]。

样品收集自上海、江苏、安徽、广东、广西、浙江、河南、北京、陕西、江西、黑龙江等地药材市场、医院、养殖基地或野外。共收集蚯蚓样品 20 种, 95 批次, 409 个样品, 其中通俗环毛蚓 23 批次, 威廉环毛蚓 16 批次, 栉盲环毛蚓 11 批次, 参环毛蚓 10 批次, 其他品种蚯蚓共 34 批次, 样品经海军军医大学张汉明教授鉴定。样品来源信息见表 1。

2 方法

2.1 DNA 提取和质量检测

鲜蚯蚓样品经乙醇固定后, 在靠近尾部位置剪取约 0.5 cm 长度肌肉组织, 用去离子水洗净后置于 1.5 mL 离心管中, 剪碎。药材样品用 75%乙醇擦拭消毒, 晾干后剪取约 40 mg 置于 1.5 mL 离心管中, 剪碎。按照 FastPure Cell/Tissue DNA Isolation Mini Kit 试剂盒提取各批次样品 DNA。用 Nanodrop 300 型核酸定量分析仪测定 DNA 浓度, 取适量并稀释至质量浓度 50 ng/μL, 4 °C 保存备用。

2.2 引物设计

下载 Genbank 中已完成全线粒体基因组测序的参状远盲蚓、通俗腔蚓、威廉腔蚓、栉盲远盲蚓、多肉远盲蚓、壮伟远盲蚓、皮质远盲蚓、加州腔蚓、简洁远盲蚓、毛利远盲蚓和三星远盲蚓等蚯蚓的线粒体基因组序列, 见表 2 (地龙名称和拉丁名采用 Genbank 中收录名称)。使用 MEGA7 软件中 Clustal W 程序对上述序列进行序列比对, 手动检索、分析沪地龙 3 个基原和其他蚯蚓线粒体基因序列差异, 在特异性高、长度适宜并含有多态性位点的序列片段设计引物, 并将所得引物在 NCBI 进行在线 Primer BLAST, 选取能单一扩增的引物作为实验验证对象。引物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成, 见表 3。

2.3 单基原特异性 PCR 条件的确定

取沪地龙 3 个基原 (上海康桥药业有限公司) 的 DNA, 分别建立特异性鉴别体系并考察其适用性。反应体系为 25 μL, 其中上游及下游引物各 0.25 μL, 2×Rapid Taq Master Mix 12.5 μL, DNA 模板 0.5 μL (50 ng/μL), 加灭菌水补足至 25 μL。PCR

表 1 样品来源信息

Table 1 Information of sample materials

序号	种类	拉丁名称	数量/个	采集地/产地
1	通俗环毛蚓	<i>Pheretima vulgaris</i>	19	亳州药材市场
2	通俗环毛蚓	<i>P. vulgaris</i>	27	上海康桥药业
3	通俗环毛蚓	<i>P. vulgaris</i>	10	上海虹桥药业
4	通俗环毛蚓	<i>P. vulgaris</i>	1	上海奉贤区新桥村
5	通俗环毛蚓	<i>P. vulgaris</i>	10	上海雷允上药业
6	通俗环毛蚓	<i>P. vulgaris</i>	1	河北美康药业
7	通俗环毛蚓	<i>P. vulgaris</i>	14	上海浦东区新振村
8	通俗环毛蚓	<i>P. vulgaris</i>	3	上海浦东新区东海村
9	通俗环毛蚓	<i>P. vulgaris</i>	10	上海崇明区三星镇
10	通俗环毛蚓	<i>P. vulgaris</i>	4	上海崇明区横沙岛
11	通俗环毛蚓	<i>P. vulgaris</i>	2	海军军医大学药用植物园
12	通俗环毛蚓	<i>P. vulgaris</i>	14	江苏淮安涟水县
13	通俗环毛蚓	<i>P. vulgaris</i>	14	江苏江安
14	通俗环毛蚓	<i>P. vulgaris</i>	6	江苏如东
15	通俗环毛蚓	<i>P. vulgaris</i>	2	江苏如皋
16	通俗环毛蚓	<i>P. vulgaris</i>	11	江苏徐州
17	通俗环毛蚓	<i>P. vulgaris</i>	10	江苏句容
18	通俗环毛蚓	<i>P. vulgaris</i>	2	安徽宿州灵璧县
19	通俗环毛蚓	<i>P. vulgaris</i>	15	河南沈丘付井镇
20	通俗环毛蚓	<i>P. vulgaris</i>	4	河南沈丘纸店镇
21	通俗环毛蚓	<i>P. vulgaris</i>	7	河南沈丘纸店镇本地
22	通俗环毛蚓	<i>P. vulgaris</i>	1	上海万仕诚药业
23	通俗环毛蚓	<i>P. vulgaris</i>	2	上海浦东区万祥镇公平村
24	威廉环毛蚓	<i>P. guillelmi</i>	4	亳州药材市场
25	威廉环毛蚓	<i>P. guillelmi</i>	7	上海虹桥药业
26	威廉环毛蚓	<i>P. guillelmi</i>	6	上海康桥药业
27	威廉环毛蚓	<i>P. guillelmi</i>	4	上海崇明区三星镇
28	威廉环毛蚓	<i>P. guillelmi</i>	5	上海崇明区横沙岛
29	威廉环毛蚓	<i>P. guillelmi</i>	1	上海雷允上
30	威廉环毛蚓	<i>P. guillelmi</i>	3	江苏江安
31	威廉环毛蚓	<i>P. guillelmi</i>	1	江苏徐州
32	威廉环毛蚓	<i>P. guillelmi</i>	3	江苏镇江
33	威廉环毛蚓	<i>P. guillelmi</i>	2	江苏句容
34	威廉环毛蚓	<i>P. guillelmi</i>	2	河南沈丘付井镇基地
35	威廉环毛蚓	<i>P. guillelmi</i>	2	河南商水
36	威廉环毛蚓	<i>P. guillelmi</i>	3	江苏淮安涟水县
37	威廉环毛蚓	<i>P. guillelmi</i>	2	海军军医大学药用植物园
38	威廉环毛蚓	<i>P. guillelmi</i>	2	上海奉贤区新桥村
39	威廉环毛蚓	<i>P. guillelmi</i>	1	河北美康药业
40	威廉环毛蚓	<i>P. guillelmi</i>	1	安徽宿州灵璧县
41	威廉环毛蚓	<i>P. guillelmi</i>	2	上海浦东区新振村
42	栉盲环毛蚓	<i>P. pectinifera</i>	4	上海康桥药业
43	栉盲环毛蚓	<i>P. pectinifera</i>	6	上海康桥益大本草园
44	栉盲环毛蚓	<i>P. pectinifera</i>	2	浙江杭州天目山
45	栉盲环毛蚓	<i>P. pectinifera</i>	3	上海浦东公平村
46	栉盲环毛蚓	<i>P. pectinifera</i>	5	上海浦东刘家宅
47	栉盲环毛蚓	<i>P. pectinifera</i>	4	上海奉贤新桥村
48	栉盲环毛蚓	<i>P. pectinifera</i>	6	上海奉贤北宋村
49	栉盲环毛蚓	<i>P. pectinifera</i>	5	上海浦东伍陆村
50	栉盲环毛蚓	<i>P. pectinifera</i>	5	上海金山区山阳镇
51	栉盲环毛蚓	<i>P. pectinifera</i>	4	上海交大闵行校区
52	栉盲环毛蚓	<i>P. pectinifera</i>	5	上海嘉定区马陆镇
53	参环毛蚓	<i>P. aspergillum</i>	4	广西玉林
54	参环毛蚓	<i>P. aspergillum</i>	5	亳州药材市场
55	参环毛蚓	<i>P. aspergillum</i>	2	广东阳江
56	参环毛蚓	<i>P. aspergillum</i>	6	江苏徐州铜山区

表 1 (续)

序号	种类	拉丁名称	数量/个	采集地/产地
57	参环毛蚓	<i>P. aspergillum</i>	4	河北荷花池药业
58	参环毛蚓	<i>P. aspergillum</i>	5	黑龙江江鼎元药业
59	参环毛蚓	<i>P. aspergillum</i>	4	上海万仕诚药业
60	参环毛蚓	<i>P. aspergillum</i>	5	西安盛堂药业
61	参环毛蚓	<i>P. aspergillum</i>	5	上海蔡德同堂药业
62	参环毛蚓	<i>P. aspergillum</i>	3	江苏天江药业
63	多肉远盲蚓	<i>Amythas carnosus</i>	5	上海虹桥药业
64	多肉远盲蚓	<i>A. carnosus</i>	4	上海康桥药业
65	多肉远盲蚓	<i>A. carnosus</i>	4	海军军医大学药用植物园
66	多肉远盲蚓	<i>A. carnosus</i>	3	上海雷允上药业
67	多肉远盲蚓	<i>A. carnosus</i>	5	江苏徐州铜山区
68	多肉远盲蚓	<i>A. carnosus</i>	2	亳州药材市场
69	多肉远盲蚓	<i>A. carnosus</i>	2	河南周口
70	多肉远盲蚓	<i>A. carnosus</i>	2	江苏如东
71	多肉远盲蚓	<i>A. carnosus</i>	1	上海崇明区
72	三星远盲蚓	<i>A. triastriatus</i>	3	海军军医大学药用植物园
73	异骈远盲蚓	<i>A. incongruus</i>	2	海军军医大学药用植物园
74	异骈远盲蚓	<i>A. incongruus</i>	1	上海浦东区新振村
75	壮伟远盲蚓	<i>A. robust</i>	3	上海滨江森林公园
76	简洁远盲蚓	<i>A. gracilis</i>	3	海军军医大学药用植物园
77	舒脉腔蚓	<i>Metaphire</i>	2	浙江杭州天目山
78	舒脉腔蚓	<i>M. schmardae</i>	2	海军军医大学药用植物园
79	舒脉腔蚓	<i>M. schmardae</i>	2	上海浦东区新振村
80	毛利远盲蚓	<i>A. morrisis</i>	2	海军军医大学药用植物园
81	湖北远盲蚓	<i>A. hupeiensis</i>	2	上海崇明区三星镇
82	皮质远盲蚓	<i>A. corticis</i>	2	海军军医大学药用植物园
83	标记远盲蚓	<i>A. masatakae</i>	2	海军军医大学药用植物园
84	加州腔蚓	<i>M. californica</i>	3	上海浦东新区东海村
85	加州腔蚓	<i>M. californica</i>	1	上海浦东区新振村
86	加州腔蚓	<i>M. californica</i>	1	海军军医大学药用植物园
87	上井腔蚓	<i>Metaphire aggra</i>	1	内蒙古赤峰市红山区
88	上井腔蚓	<i>M. aggra</i>	2	内蒙古赤峰市松山区
89	安德爱胜蚓	<i>Eisenia andrei</i>	1	上海奉贤区新桥村
90	安德爱胜蚓	<i>E. andrei</i>	2	江苏如皋
91	日本杜拉蚓	<i>Drawida japonica</i>	1	上海康桥益大本草园
92	日本杜拉蚓	<i>D. japonica</i>	2	上海浦东公平村
93	朝鲜杜拉蚓	<i>D. koreana</i>	5	上海崇明区三星镇
94	赤子爱胜蚓	<i>E. foetida</i>	2	江苏江安
95	赤子爱胜蚓	<i>E. foetida</i>	2	河南沈丘付井

表 2 特异性引物设计参考序列

Table 2 Specific primer design reference sequence

物种名称	拉丁名	登录号	物种名称	拉丁名	登录号
通俗腔蚓	<i>M. vulgaris</i>	KJ137279.1	加州腔蚓	<i>M. californica</i>	KP688581.1
威廉腔蚓	<i>M. guillelmi</i>	KT429017.1	皮质远盲蚓	<i>A. corticis</i>	KM199290.1
栉盲远盲蚓	<i>M. pectiniferus</i>	KT429018.1	壮伟远盲蚓	<i>A. robustus</i>	KT429019.1
参状远盲蚓	<i>A. aspergillus</i>	NC 025292.1	毛利远盲蚓	<i>A. morrisi</i>	KT429011.1
多肉远盲蚓	<i>A. carnosus</i>	KT429008.1	三星远盲蚓	<i>A. triastriatus</i>	KT429016.1

表3 沪地龙鉴别引物

Table 3 Primers for Shanghai *Pheretima* identification

引物名称	物种	引物序列 (5'-3')
Hmv-535SF	通俗环毛蚓	GCC CAG TAA TCA AAG CAA TAC TCT
Hmv-535RF	通俗环毛蚓	GGC CCC TAT AGT ATA TTT CTA TAG C
Hmg-219SF	威廉环毛蚓	GCC AAC TGA TTT TCC AGT GGT
Hmg-219RF	威廉环毛蚓	CTG TAA GTG CTA CAC TTA TTA TTA CTG AT
Hzm-435SF	栉盲环毛蚓	GTT TTA TAA TCT ATG TCC CAA ACT TAT CT
Hzm-435RF	栉盲环毛蚓	GGT GTG CAT GTC TTA GGT TCT AT

扩增条件: 95 °C 预变性 4 min; 95 °C 变性 15 s, 60 °C 退火 15 s, 72 °C 延伸 20 s, 33 次循环; 产物末端 72 °C 延伸 7 min。PCR 产物用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测, 经培清 JS-3000 凝胶成像系统拍照、存储。

2.4 系统各影响因素的考察

同时对地龙及其常见伪品进行扩增, 分别考察了 (1) 退火温度: 58、60、62、64 °C; (2) 循环次数: 31、33、35、37 次; (3) DNA 模板质量浓度: 5、10、50、100 ng/μL; (4) Taq 酶种类: 2×Rapid Taq Master Mix、2×sanTaq PCR Mix、2×Trans Taq PCR SuperMix、2×Taq Plus Master Mix; (5) PCR 仪型号: Mastercycler 6331 型、Longgen Tp350 型、Effendekter A300 型和 Longgen T20 型。

2.5 多重位点特异性 PCR 体系的建立

以“2.3”项下确定的沪地龙单基原 PCR 扩增条件为参照, 结合退火温度、循环次数和模板用量等因素的

考察结果, 构建沪地龙多重位点特异性 PCR 反应体系。

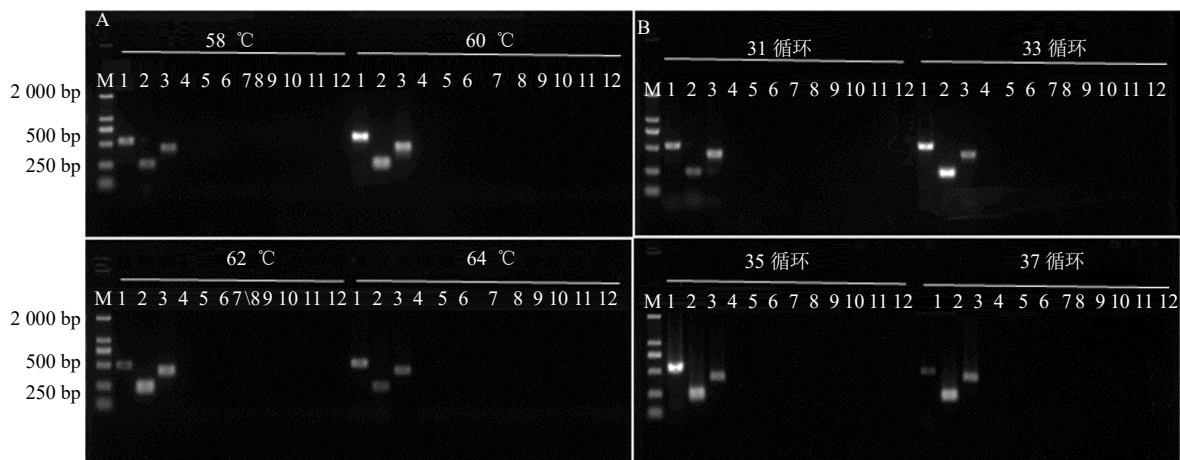
2.6 所建体系的实用性考察

应用“2.5”项下确定的体系和条件, 对收集到的样品进行检测鉴别, 验证该体系鉴别沪地龙的准确性和稳定性。

3 结果与分析

3.1 循环次数和退火温度

使用对应引物进行 PCR 扩增, 退火温度为 58~64 °C 时, 沪地龙 3 个基原均获得特异性条带, 其中通俗腔蚓获得 535 bp 的条带, 威廉腔蚓扩增获得 219 bp 的条带, 栉盲远盲蚓获得 435 bp 的条带, 其他蚯蚓样品及阴性对照无条带, 见图 1-A。PCR 鉴别反应循环次数为 31、33、35 次时, 所有样本均获得特异性鉴别条带, 其他蚯蚓样品及阴性对照无条带, 见图 1-B; 考虑特异性 PCR 的耐用性, 确定退火温度为 60 °C, 循环次数为 33 次。



M-Marker; 1-通俗环毛蚓; 2-威廉环毛蚓; 3-栉盲环毛蚓; 4-参环毛蚓; 5-多肉远盲蚓; 6-三星远盲蚓; 7-异骈远盲蚓; 8-壮伟远盲蚓; 9-简洁远盲蚓; 10-舒脉腔蚓; 11-毛利远盲蚓; 12-阴性对照, 图 2、3 同。

M-Marker; 1-*P. vulgaris*; 2-*P. guillelmi*; 3-*P. pectinifera*; 4-*P. aspergillum*; 5-*A. carnosus*; 6-*A. triastriatus*; 7-*A. incongruous*; 8-*A. robust*; 9-*A. gracilis*; 10-*M. schmaridae*; 11-*A. morrisis*; 12-negative control, Fig. 2, 3 the same.

图1 退火温度 (A) 和循环次数 (B) 对沪地龙特异性 PCR 鉴别的影响

Fig. 1 Influence of annealing temperature (A) and thermocycling number (B) on specific PCR identification of Shanghai *Pheretima*

3.2 DNA 模板量考察

用 5、10、25、100 ng 的 DNA 模板量进行检测能力考察, 均可获得特异性扩增, 模板量在 25 ng 以上时扩增条带质量较好, 见图 2。

3.3 方法耐受性实验考察

3.3.1 酶种类考察 考察了 2×Rapid Taq Master Mix、2×sanTaq PCR Mix、2×Trans Taq PCR SuperMix、2×Taq Plus Master Mix 4 种预混酶对结果的影响, 沪地龙均获得特异性结果, 其他蚯蚓样品和阴性对照均未见条带, 见图 3-A。

3.3.2 不同 PCR 仪考察 分别用 Mastercycler 6331、TP350、A300 和 TC-512 型 PCR 仪进行扩增, 沪地龙均得到特异性结果, 其他蚯蚓样品和阴性对照均未扩增, 表明上述 4 种型号的 PCR 仪均可用于鉴别, 见图 3-B。

3.4 多重 PCR 体系的建立

沪地龙 3 个基原各特异性扩增体系确定后, 将

3 种引物按一定比例混合进行多重 PCR 体系条件调校。最终确定反应体系为 25 μL: 2×Rapid Taq Master Mix 12.5 μL, 引物 1.5 μL (通俗环毛蚓: 威廉环毛蚓: 栉盲环毛蚓=1: 1.2: 0.8), DNA 模板 0.5 μL (50 ng/μL), 灭菌水补足至 25 μL。PCR 扩增条件: 95 °C 预变性 4 min; 95 °C 变性 15 s, 60 °C 退火 15 s, 72 °C 延伸 20 s, 循环 33 次; 产物末端 72 °C 延伸 7 min。结果显示, 沪地龙 3 个物种的凝胶电泳均出现特异性单一条带, 其他品种蚯蚓样品在该体系中均无条带产生, 见图 4。

3.5 方法适用性考察

对不同采集地不同品种蚯蚓样本进行体系验证, 结果通俗环毛蚓、威廉环毛蚓、栉盲环毛蚓均在各自特征性位置产生单一条带, 其他蚯蚓样品无条带, 相同基原不同产地的样品结果具有一致性, 表明该体系能稳定准确地鉴别沪地龙, 部分结果见图 5。

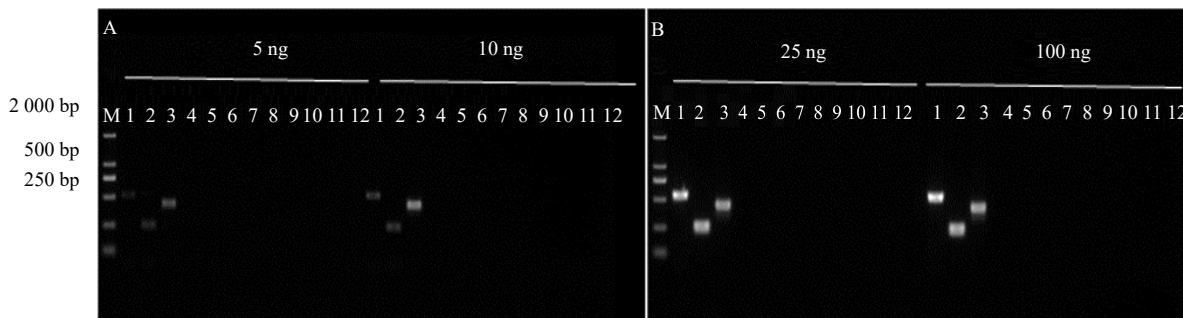


图 2 DNA 模板量对沪地龙特异性 PCR 鉴别的影响

Fig. 2 Influence of DNA template usage on specific PCR identification of Shanghai *Pheretima*

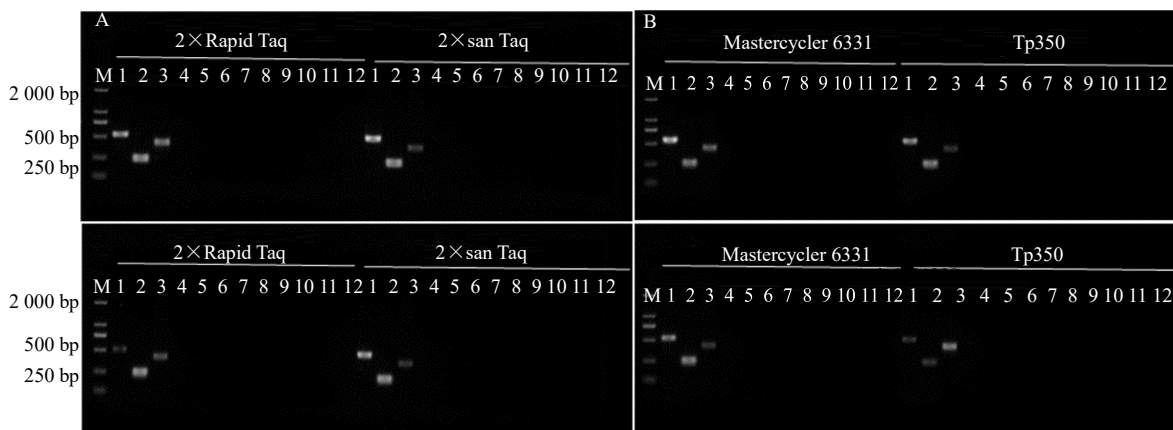


图 3 Taq 酶种类 (A) 和 PCR 仪 (B) 对沪地龙特异性 PCR 鉴别的影响

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

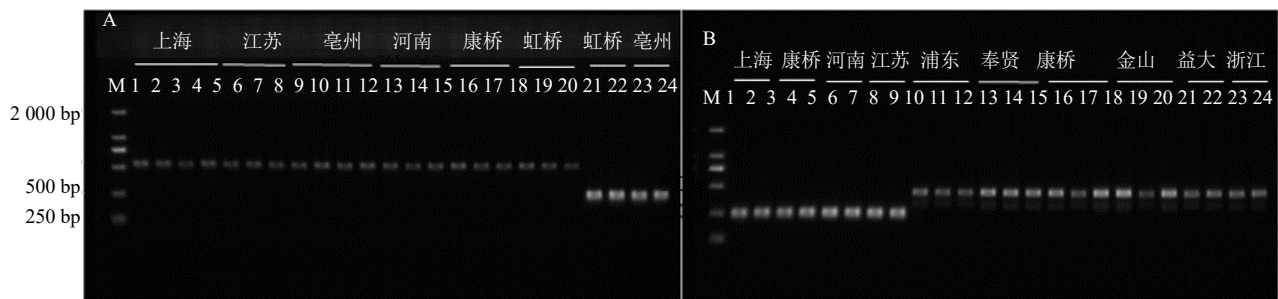


M-Marker; 1-通俗环毛蚓; 2-威廉环毛蚓; 3-栉盲环毛蚓; 4-参环毛蚓; 5-多肉远盲蚓; 6-三星远盲蚓; 7-异骈远盲蚓; 8-壮伟远盲蚓; 9-简洁远盲蚓; 10-舒脉腔蚓; 11-毛利远盲蚓; 12-皮质远盲蚓; 13-湖北远盲蚓; 14-标记远盲蚓; 15-加州腔蚓; 16-上井腔蚓; 17-日本杜拉蚓; 18-朝鲜杜拉蚓; 19-安德爱胜蚓; 20-赤子爱胜蚓; 21-阴性对照。

M-Marker; 1-*P. vulgaris*; 2-*P. guillelmi*; 3-*P. pectinifera*; 4-*P. aspergillum*; 5-*A. carnosus*; 6-*A. triastriatus*; 7-*A. incongruus*; 8-*A. robust*; 9-*A. gracilis*; 10-*M. schmaridae*; 11-*A. morrisis*; 12-*A. cortices*; 13-*A. hupeiensis*; 14-*A. masatakae*; 15-*M. California*; 16-*M. aggra*; 17-*D. japonica*; 18-*D. koreana*; 19-*E. Andrei*; 20-*E. foetida*; 21-negative control.

图 4 沪地龙多重位点特异性 PCR 鉴别

Fig. 4 Multiplex site-specific PCR identification of Shanghai *Pheretima*



M-Marker; A 中 1~20-通俗环毛蚓, 21~24-威廉环毛蚓; B 中 1~8-威廉环毛蚓, 9~24-栉盲环毛蚓。

M-Marker; A:1—20-*P. vulgaris*, 21—24-*P. guillelmi*; B:1—8-*P. guillelmi*, 9—24-*P. pectinifera*。

图 5 不同来源沪地龙多重位点特异性 PCR 鉴定结果

Fig. 5 Multiplex site-specific PCR identification results of Shanghai *Pheretima* from different regions

4 讨论

沪地龙 3 个基原药材相似度高, 根据形态特征难以区分, 混用现象较为严重, 不利于质量控制和临床疗效稳定。本研究通过对沪地龙 3 个基原和其他 7 种蚯蚓的全线粒体基因序列进行比对分析, 结合 SNP 位点信息、扩增长度和扩增效率等因素, 设计并建立了鉴别沪地龙基原的多重位点特异性 PCR 体系。

基原准确是质量控制的前提条件。地龙以产地区分为“广地龙”与“沪地龙”, 广地龙是单基原药材, 在基原鉴定、成分种类和药理作用等研究方面均较“沪地龙”为深入。沪地龙是 3 个基原的习称, 由于产地、药材外观性状相似度高, 在临床应用时常不作区分。现代对多基原药材的研究发现, 不同基原药材间在药效方面存在差异^[11], 而且国家药品监督管理局对“新药研发”提出了“固定基原和产地保证质量的均一性和稳定性”的指导原则, 因此通过建立沪地龙基原鉴定方法对于完善地龙药材质

量控制体系具有重要的实践性意义。

特异性 PCR 是针对物种序列存在的特异性序列或 SNP 位点而建立的鉴定方法, 具有特异性好、准确度高的优势, 在中药药材、饮片和配方颗粒的基原鉴定中应用广泛^[6,12]。引物设计是特异性 PCR 鉴别的核心环节, 同时鉴别多基原药材多采用扩增片段长度的不同来达到鉴别目的^[11]。在引物设计过程中也发现, 根据线粒体 COI 基因序列设计引物不能较好区分通俗环毛蚓和威廉环毛蚓, 因为二者 COI 基因序列相似度高, 差异位点较少, 因此, 本研究选择全线粒体基因组为设计对象, 对沪地龙 3 个基原的差异位点进行分析, 从而设计了用于鉴定的特异性引物。

本研究所用样品均在形态鉴定的基础上, 以 DNA 条形码方法进行再验证, 所建立的特异性鉴别方法与前述二者鉴别结果具有一致性, 表明该鉴别体系在沪地龙基原的真伪鉴别方面具有可靠性和稳定性。本研究建立的方法具有简便、稳定、快捷的

鉴特点,可作为沪地龙的检测工具,也为其质量控制提供参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 80, 127.
- [2] 国家药品监督管理局. 国家药监局药审中心关于发布《中药新药用药材质量控制研究技术指导原则(试行)》的通告(2020年第31号) [EB/OL]. [2020-10-12]. <http://www.cde.org.cn/news.do?method=largeInfo&id=8f11f5ed03d3ef1d>.
- [3] 格小光, 蒋超, 田娜, 等. 基于 DNA 测序技术的市售地龙类药材基原调查与考证研究 [J]. 中国现代中药, 2019, 21(9): 1206-1214.
- [4] 高晓悦, 赵邕, 郭颖, 等. 地龙及其混淆品原动物的形态及 DNA 双重条形码鉴定 [J]. 中草药, 2020, 51(9): 2530-2537.
- [5] 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.
- [6] 胡力, 赵玉洋, 袁媛, 等. 地龙(参环毛蚓)配方颗粒的位点特异性 PCR 鉴别 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(17): 119-126.
- [7] 张前程, 文红梅, 刘娜, 等. 广地龙特异性引物序列的设计及其混伪品的鉴别 [J]. 南京中医药大学学报, 2020, 36(3): 408-413.
- [8] 官昭琪, 李慧敏, 何曼文, 等. 多重 PCR 技术在快速检测中的应用 [J]. 山东化工, 2021, 50(3): 85-88.
- [9] 朋冬琴, 罗蜜蜜, 郭欣慰, 等. 当归实时荧光定量 PCR 内参基因筛选 [J]. 中草药, 2024, 55(1): 269-278.
- [10] 田娜, 魏艺聪, 袁媛, 等. 地龙的多重位点特异性 PCR 鉴别 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(17): 124-129.
- [11] 贺翠, 范巧佳, 宋民宪, 等. 多基原中药材对中成药的影响 [J]. 华西药学杂志, 2017, 32(5): 559-562.
- [12] 朱伟豪, 杜伟锋, 洪浩, 等. 聚合酶链式反应技术在中药鉴定研究中的应用进展 [J]. 中华中医药杂志, 2020, 35(10): 5091-5094.

[责任编辑 时圣明]