

基于DNA条形码和特异性PCR技术鉴别蚂蟥及其常见伪品

解盈盈¹, 李军¹, 汪冰¹, 于雅萌¹, 栾永福¹, 梅桂雪¹, 张全芳², 戴忠^{3*}, 林永强^{1*} (1. 山东省食品药品检验研究院 国家药监局胶类产品质量评价重点实验室 山东省中药标准创新与质量评价工程实验室, 济南 250101; 2. 山东省农业科学院生物技术研究中心应用生命科学实验室, 济南 250101; 3. 中国食品药品检定研究院, 北京 100050)

摘要 目的: 建立蚂蟥特异性PCR鉴别方法, 能够快速准确地鉴别蚂蟥与其常见伪品。方法: 通过分析蚂蟥与其常见伪品的细胞色素C氧化酶亚基 I (CO I) 序列, 寻找蚂蟥SNP变异位点, 设计特异性引物; 通过对退火温度、循环次数、DNA模板量及Taq酶等关键因素的考察, 确立最优反应体系及条件, 并将特异性PCR方法应用到水蛭(蚂蟥)粉末中进行药材粉末的基原鉴别, 同时为保证试验结果的准确性, 将PCR扩增产物进行一代测序。结果: 特异性PCR结果表明蚂蟥在400~600 bp有单一明亮条带, 常见混伪品则无此条带, 试验结果与一代测序结果一致, 为蚂蟥。结论: 该方法能够将蚂蟥与其常见伪品菲牛蛭、东北小水蛭、黑条、小黑条等区别, 且能鉴别水蛭(蚂蟥)粉的基原, 为提升中药监管力度, 打击中药掺伪行为提供了强有力的技术支持。

关键词: DNA条形码; 聚合酶链式反应(PCR)法; 蚂蟥; 混伪品; 蚂蟥粉

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 1002-7777(2023)01-0048-11
doi:10.16153/j.1002-7777.2023.01.006

Identification of *Whitmania pigra* and Their Common Counterfeits Based on DNA Barcoding and the Specific Technique of PCR

Xie Yingying¹, Li Jun¹, Wang Bing¹, Yu Yameng¹, Luan Yongfu¹, Mei Guixue¹, Zhang Quanfang², Dai Zhong^{3*}, Lin Yongqiang^{1*} (1. Shandong Provincial Institute for Food and Drug Control, NMPA Key Laboratory for Quality Evaluation of Gelatin Products, Shandong Engineering Laboratory for Standard Innovation and Quality Evaluation of TCM, Jinan 250101, China; 2. Laboratory of Applied Life Science, Biotechnology Research Center, Shandong Academy of Agricultural Sciences, Jinan 250101; 3. National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China)

Abstract Objective: To establish a specific PCR method quickly and accurately for identifying *Whitmania pigra* and its common counterfeits. **Methods:** By analyzing the Cytochrome Oxidase I(COI) sequences of *Whitmania pigra* and its common forgeries, the SNP mutation sites of *Whitmania pigra* were searched and specific primers were designed; the key factors such as the number of cycles, annealing temperature and the amount of DNA template and Taq enzyme were investigated to established the optimal reaction system and conditions.

基金项目: 山东省重点研发计划重大科技创新工程项目(编号 2021CXGC010511); 山东省重点研发计划项目(编号 2020RKB24001); 山东省人文社会科学课题(编号 2021-YYGL-44)

作者简介: 解盈盈 Tel: 13791103986; E-mail: yingyingc@126.com

通信作者: 林永强 Tel: (0531) 81216523; E-mail: 798981433@qq.com

戴忠 Tel: (010) 67095268; E-mail: daizhong@nifdc.org.cn

The specific PCR method was applied to the medicinal material primordia identification of the *Whitmania pigra* powder. At the same time, in order to ensure the accuracy of the test results, the PCR amplified products were conducted by generation sequencing. **Results:** The specific PCR results showed that there was a single bright band at 400-600 bp, while common adulterants did not have this band. The test results were consistent with the results of generation sequencing, which were *Whitmania pigra*. **Conclusion:** This method can distinguish the *Whitmania pigra* from its common counterfeits such as *Hirudinaria manillensis*, *Erpobdella octoculata*, Black Bar, Little Black Bar and identify the primordium of the *Whitmania pigra* powder. It provides strong technical support for improving the supervision of TCM and cracking down on the adulteration of TCM.

Keywords: DNA barcoding; polymerase chain reaction (PCR); *Whitmania pigra*; mixed false goods; *Whitmania pigra* powder

水蛭药材为水蛭科动物蚂蟥 *Whitmania pigra* Whitman、水蛭 *Hirudo nipponica* Whitman 或柳叶蚂蟥 *Whitmania acranulata* Whitman 的干燥全体；其基原有3种，蚂蟥俗称宽体金线蛭，水蛭称日本医蛭，柳叶蚂蟥称尖细金线蛭，均具有抗肿瘤、抗血栓、抗动脉粥样硬化及调血脂等功效^[1-2]。目前以水蛭提取物或水蛭原粉入药的中药制剂大约有30余种^[3]，剂型包括片剂、散剂、胶囊剂、丸剂等^[4]。近年，野生水蛭数量越来越少，市场流通水蛭多为蚂蟥养殖品^[5]。在以水蛭为原料的中成药中，进口水蛭如缅甸、越南进口水蛭常冒充水蛭正品投料；菲牛蛭因其产量大，易于养殖等特点市场占有率较高。菲牛蛭及进口水蛭的药理学作用及临床用量与水蛭正品有显著差异，如果混用或替代使用会严重影响临床用药安全^[4]。水蛭（蚂蟥）粉作为一种常用临床用药形式，传统鉴别方法难以鉴别其真伪。因此，为保证用药安全，建立蚂蟥特异性鉴别方法是解决水蛭（蚂蟥）粉真伪鉴别的一个有效手段。

在对中药材的鉴定实践中，分子生物学技术具有快速准确、特异性强的特点，能够解决传统中药鉴别易受环境、技术人员专业水平以及药材性状完整程度等问题，在动物药鉴别中广泛应用^[4-6]。采用细胞色素C氧化酶亚基 I（CO I）序列可以将不同基原水蛭药材区分^[7]，但是对于混合样品则较难鉴别；而聚合酶链式反应（Polymerase Chain Reaction, PCR）技术专属性更强，灵敏度和特异性更好，可以解决中药材掺伪掺假鉴定问题，成为当前分子生物学发展的主要方向。

本研究以蚂蟥为主要研究对象，通过对蚂蟥及常见混伪品CO I 序列及全基因组序列进行分

析，设计蚂蟥特异性引物，建立特异性PCR方法。该方法可以快速准确地鉴别蚂蟥及常见混伪品，并可鉴定性状完全破损的水蛭（蚂蟥）粉基原，为蚂蟥的临床用药安全和打击掺杂使假行为提供了有力技术支持。

1 仪器与材料

1.1 仪器

十万分之一天平（Mettler Toledo 公司，型号XSE205DU），离心机（艾本德公司，型号Centrifuge 5424），迷你离心机（博曼克公司，型号Mini Star），恒温混匀仪（瑞诚仪器有限公司，型号TS100，），AB梯度PCR仪（AB公司，型号Vertiti 96 Weu Thermal Cycler），凝胶成像系统（Vilber公司，型号Quantum ST5），电泳仪（伯乐公司，型号Bio-Rad Basice PowerPac Basic）。

1.2 材料

动物基因组DNA提取试剂盒（Omega公司，批号D3396-02），无水乙醇（分析纯），琼脂糖（Biowest公司，批号111860），核酸染料GelRed（Biotium公司，批号41003），Taq DNA聚合酶（Tiangen公司，2×Taq PCR Mix预混试剂，批号S7621），高保真Taq DNA聚合酶（Thermo Scientific公司，批号91235673），引物（上海生工生物工程有限公司合成），试验用水均为高压灭菌双蒸水。

对照药材水蛭（蚂蟥）（批号121061-201305，中国食品药品检定研究院）。蚂蟥药材与其常见混伪品药材样品均由山东省食品药品检验研究院汪冰主任药师收集并鉴定。药材粉末制品由济南三源药业有限公司提供。药材及粉末信息见表1、表2，引物信息见表3。

表1 药材信息表

序号	基原或俗称	编号	药材产地	批号	提供单位
1	蚂蟥(宽体金线蛭)	KT-01	浙江	/	济南三源药业有限公司
2	蚂蟥(宽体金线蛭)	KT-02	浙江	/	济南三源药业有限公司
3	蚂蟥(宽体金线蛭)	KT-03	浙江	/	济南三源药业有限公司
4	蚂蟥(宽体金线蛭)	KT-04	山东	/	济南三源药业有限公司
5	蚂蟥(宽体金线蛭)	KT-05	/	/	滨州医学院
6	蚂蟥(宽体金线蛭)	KT-06	山东	/	聚药堂药业有限公司
7	蚂蟥(宽体金线蛭)	KT-07	山东	/	聚药堂药业有限公司
8	水蛭(日本医蛭)	RY-01	湖北荆州	/	市场购买
9	水蛭(日本医蛭)	RY-02	浙江	/	市场购买
10	水蛭(日本医蛭)	RY-03	山东	/	市场购买
11	水蛭(日本医蛭)	RY-04	湖北荆州	/	市场购买
12	菲牛蛭	FN-01	云南	/	市场购买
13	菲牛蛭	FN-02	广西	/	济南三源药业有限公司
14	菲牛蛭	FN-03	/	/	临沂明瑞药业有限公司
15	东北小水蛭	DBXSZ-01	东北	/	济南三源药业有限公司
16	小黑条	XHT-01	浙江	/	济南三源药业有限公司
17	黑条	HT-01	/	/	济南三源药业有限公司
18	进口水蛭伪品	SZWP-01	缅甸	/	济南三源药业有限公司

表2 粉末信息表

序号	基原或俗称	编号	药材产地	批号	提供单位
1	水蛭(蚂蟥)粉	SZF-01	山东	210101	济南三源药业有限公司
2	水蛭(蚂蟥)粉	SZF-02	吉林	210102	济南三源药业有限公司
3	水蛭(蚂蟥)粉	SZF-03	黑龙江	210103	济南三源药业有限公司
4	水蛭(蚂蟥)粉	SZF-04	山东	210104	济南三源药业有限公司
5	水蛭(蚂蟥)粉	SZF-05	江苏	210105	济南三源药业有限公司
6	水蛭(蚂蟥)粉	SZF-06	山东	210106	济南三源药业有限公司
7	水蛭(蚂蟥)粉	SZF-07	山东	210107	济南三源药业有限公司
8	水蛭(蚂蟥)粉	SZF-08	湖北	210108	济南三源药业有限公司
9	水蛭(蚂蟥)粉	SZF-09	山东	210109	济南三源药业有限公司
10	水蛭(蚂蟥)粉	SZF-10	山东	210110	济南三源药业有限公司

表3 引物序列表

引物	名称	引物序列
CO I	LCO1490	GCTCAACAAATCATAAAGATATTGG
	HCO2198	TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA
特异性鉴别引物	KTA-F	TTTGCTTACTTCTTTCACTA
	KTA-R	TTTGCTTACTTCTTTCACTA

2 方法

2.1 DNA提取

取蚂蟥及其常见混伪品,浸泡12 h,除去内脏及残留的动物血液,洗净,取约30 mg,用DNA提取试剂盒提取DNA, -20 ℃保存,作为DNA模板备用。另取水蛭(蚂蟥)对照药材30 mg,同法制成水蛭(蚂蟥)对照药材模板DNA溶液。

2.2 测序及序列分析

PCR反应体系在200 μL离心管中进行,反应总体积为20 μL。反应体系: Taq DNA聚合酶 10 μL, 引物CO I ($2.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 0.4 μL, DNA模板 1 μL, 灭菌双蒸水8.2 μL。将离心管置PCR仪中, PCR反应参数: 95 ℃预变性4 min, 循环反应35次(95 ℃ 30 s, 50 ℃ 30 s, 72 ℃ 1 min), 72 ℃延伸7 min。取PCR扩增产物4 μL, 于GelRed染色的1.5%琼脂糖凝胶电泳检测, 120 V电压下电泳15 min, 电泳结束后, 取凝胶片置凝胶成像仪上检视。扩增产物委托山东省农业科学院测序, 为后续试验做准备。

2.3 特异性引物设计

从NCBI数据库中下载蚂蟥、水蛭及其常见伪品的CO I序列, 无CO I序列的下载全基因组序列, 与测序获得的序列共同使用BioEdit软件进行同源对齐, 手动校正后寻找差异性SNP位点, 通过软件分析, 进行特异性引物设计, 通过Primer Premier 5.0软件设计出蚂蟥特异性鉴别引物。

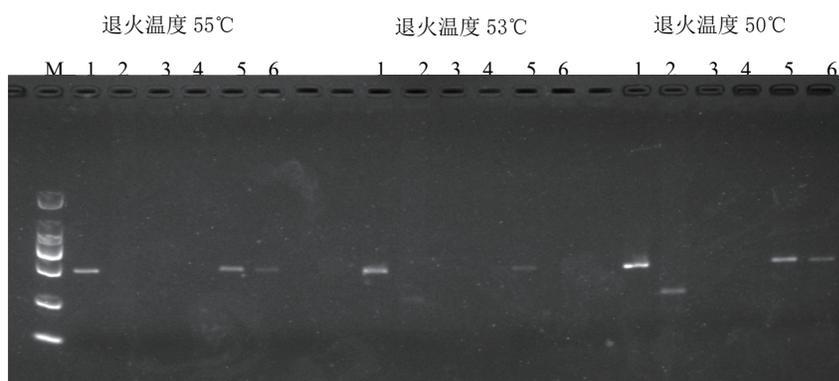
2.4 特异性PCR扩增及电泳

为防止试验过程中出现假阳性和假阴性的结果, 试验中建立了阳性对照和空白对照, 阳性对照为水蛭(蚂蟥)对照药材, 空白对照为灭菌双蒸水。特异性PCR鉴别反应在200 μL离心管中进行, 反应总体积为20 μL, 反应体系: Taq DNA聚合酶 10 μL, 特异性引物 ($2.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 0.4 μL, 灭菌双蒸水7.2 μL, 模板DNA 2 μL, 灭菌双蒸水补足体积至20 μL。将离心管置PCR仪, PCR反应参数: 95 ℃预变性4 min, 循环反应35次(95 ℃ 30 s, 50 ℃ 30 s, 72 ℃ 30 s), 72 ℃延伸5 min。PCR扩增反应结束后, 取扩增产物4 μL, DNA分子量标记上样量为2 μL ($0.5 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$), 于GelRed染色的1.5%琼脂糖凝胶电泳检测, 120 V电压下电泳15 min, 电泳结束后, 取凝胶片置凝胶成像仪上检视。

3 结果与分析

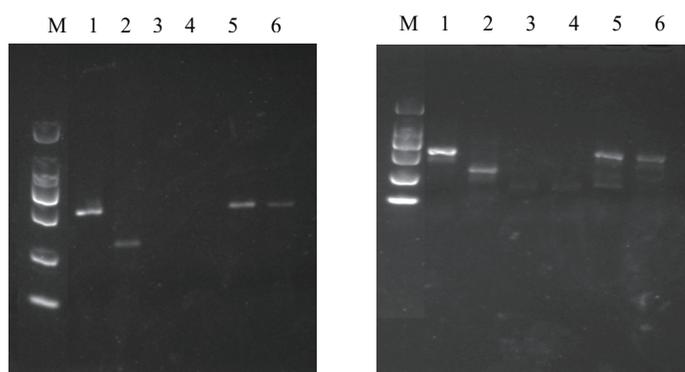
3.1 循环数与退火温度的考察

分别考察35、40个循环对PCR的影响, 结果40个循环时主条带变亮, 但是杂带较多, 35个循环则无杂带, 因此选择35个循环进行PCR。分别考察50、53、55 ℃对扩增的影响, 结果50 ℃时扩增条带亮度适中, 且无杂带, 53 ℃与55 ℃时条带变弱, 因此选择50 ℃作为退火温度。结果见图1及图2。



1.KT-01; 2.RY-01; 3.FN-01; 4.FN-02; 5.KT-02; 6.KT-03; M.DL 2000 DNA Marker。
(注: 条带从下到上代表的分子量大小分别为 100、250、500、750、1000、2000 bp)

图1 不同退火温度的考察



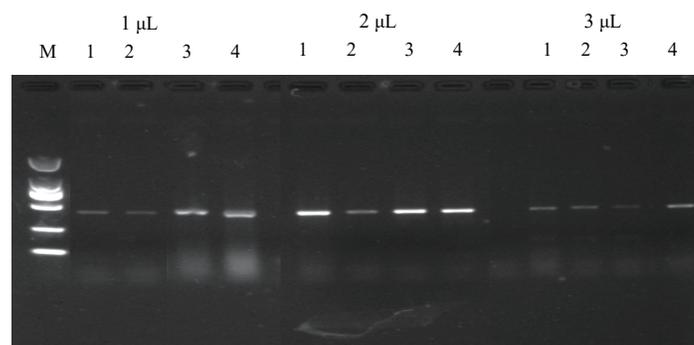
1. KT-01; 2.RY-01; 3.FN-01; 4.FN-02; 5.KT-02; 6.KT-03; M.DL 2000 DNA Marker。
(注: 条带从下到上代表的分子量大小分别为 100、250、500、750、1000、2000 bp)

图2 循环数考察

3.2 模板量的考察

对PCR反应体系中的DNA模板量(1、2、3 μ L)进行考察,结果1~3 μ L DNA模板量扩增产物均有目的条带,其中2 μ L模板量时扩增条带最

亮,随着模板量的增加条带明亮趋势不明显,因此确定PCR反应体系中DNA模板的加入量为2 μ L。结果见图3。



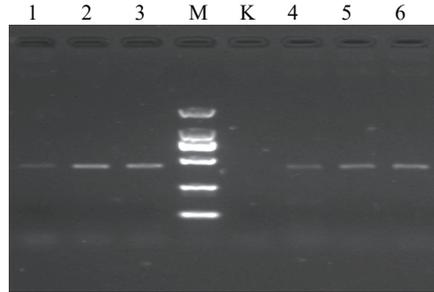
1 ~ 4. KT01 ~ 04; M. DL 2000 DNA Marker。
(注: 条带从下到上分别代表的分子量大小为 100、250、500、750、1000、2000 bp)

图3 DNA 模板量的考察

3.3 Taq DNA聚合酶的考察

Taq DNA聚合酶作为影响PCR反应的因素之一，在PCR过程中起着至关重要的作用，因此对Taq DNA聚合酶进行考察。同时考察了Taq DNA聚合酶（Tiangen公司，2×Taq PCR Mix预混剂，

批号S7621）及高保真Taq DNA聚合酶（Thermo Scientific公司，批号91235673）对PCR扩增条带的影响。结果显示，2个厂家的Taq DNA聚合酶均能扩增出目的条带，且条带无显著性差异。结果见图4。



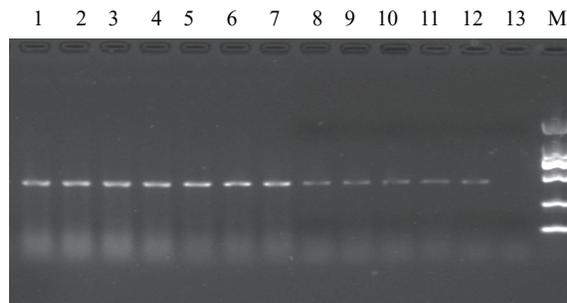
1~3. Taq DNA聚合酶（Tiangen公司）；4~6. 高保真Taq DNA聚合酶（Thermo Scientific公司）；
1、2、4、5. KT01~02；3、6. 水蛭（蚂蟥）对照药材；K. 空白对照；M. 2000 DNA Marker。
（注：条带从下到上代表分子量大小分别为 100、250、500、750、1000、2000 bp）

图4 不同聚合酶考察

3.4 方法验证

经过对PCR反应体系及条件的优化，最终确定蚂蟥的PCR测定方法。因水蛭粉为蚂蟥粉碎后的样

品，因此该方法同样适用于水蛭（蚂蟥）粉；同时试验蚂蟥药材及粉末，结果显示该方法同样适用水蛭（蚂蟥）粉。结果见图5。



1. 水蛭（蚂蟥）对照药材；2~7. 蚂蟥药材；8~12. 水蛭（蚂蟥）粉；13. 空白对照；M. 2000 DNA Marker。
（注：条带从下到上代表分子量大小分别为 100、250、500、750、1000、2000 bp）

图5 方法验证结果

3.5 PCR反应体系及方法的确定

经过对循环次数、退火温度、DNA模板加入量及Taq DNA聚合酶等影响PCR反应的关键因素的考察，确定了蚂蟥最优PCR方法。PCR反应总体积为20 μL，体系为Taq DNA聚合酶（Tiangen公司，2×Taq PCR Mix预混试剂，批号S7621）10 μL，特异性引物（2.5 μmol·L⁻¹）0.4 μL，DNA模板2 μL，灭菌双蒸水7.2 μL。

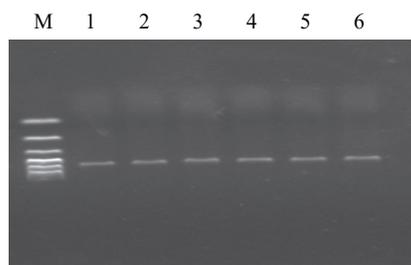
反应条件：将离心管置PCR仪中，反应参数

为95℃预变性4 min、循环反应35次（95℃ 30 s，50℃ 30 s，72℃ 30 s），72℃延伸5 min。

4 方法学试验

4.1 重复性考察

取蚂蟥样品（编号KT-03）粉末6份，采用动物基因组DNA提取试剂盒提取，即得重复性模板DNA溶液，按“3.5”项下方法和条件进行测定。结果显示，6份蚂蟥样品均能扩增出目的条带，该方法重复性良好。结果见图6。



1 ~ 6. 蚂蟥重复性样品; M.2000 DNA Marker。

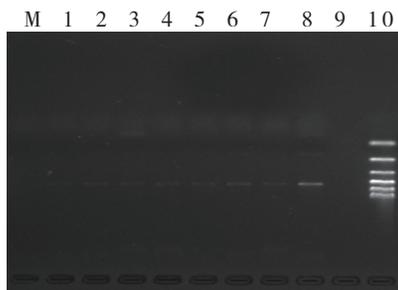
(注: 条带从下到上代表的分子量大小分别为 100、250、500、750、1000、2000 bp)

图6 重复性考察结果

4.2 灵敏度考察

为考察建立方法的检测灵敏度, 在伪品粉末中

添加不同量的蚂蟥粉末, 比例分别为5%、12.5%、25%、37.5%、50%、62.5%、75%、87.5%。结果表明, 混合粉末中含蚂蟥粉末12.5%以上均可检出, 说明该方法灵敏度较好。结果见图7。



1. 空白对照; 2. 水蛭(蚂蟥)对照药材; 3 ~ 10. 蚂蟥比例依次为 87.5%、75%、62.5%、50%、37.5%、25%、12.5%、5%; M.600 DNA Marker。

(注: 条带从下到上代表的分子量大小分别为 100、200、300、400、500、600 bp)

图7 灵敏度考察结果

4.3 PCR扩增产物测序分析

为保证扩增结果的准确性, 同时验证引物的特异性, 委托山东省农业科学院对目的条带进行测序, Chromatogram软件序列拼接后, NCBI序列比对, 结果显示目的条带为蚂蟥DNA扩增产物。测序结果见图8。

5 样品测定

采用建立的方法对收集到的18批药材和10批水蛭(蚂蟥)粉进行特异性PCR鉴别。结果显示, 7批蚂蟥药材的凝胶电泳图谱中, 与水蛭(蚂蟥)对照药材凝胶电泳图谱相应的位置上, 在400~600 bp有单一DNA条带, 而其常见伪品菲牛蛭、东北小水蛭、黑条、小黑条及进口伪品的凝胶电泳图谱

中均无相应条带。对于10批水蛭(蚂蟥)粉样品, 结果显示9批水蛭(蚂蟥)粉供试品的凝胶电泳图谱中, 与水蛭(蚂蟥)对照药材凝胶电泳图谱相应的位置上, 在400~600 bp有单一DNA条带, PCR扩增结果与一代测序结果一致, 其中序号为3的水蛭(蚂蟥)粉末扩增出特异性条带; 为排除可能是粉碎粒度不够引起DNA模板浓度较低, 对该批水蛭粉进行超微粉碎后重新提取DNA, 动物通用引物CO I扩增, 在650 bp左右扩增出单一条带, 因此可排除粉碎粒度不够及粉末存放时间过长导致DNA降解严重等因素; 综上分析, 该批样品原料可能为蚂蟥混伪品。结果见表4、表5及图9、图10。

Whitmania pigra mitochondrion, complete genome

Sequence ID: [EU304459.1](#) Length: 14426 Number of Matches: 1

Range 1: 5892 to 6195 [GenBank](#) [Graphics](#)

▼ Next Match ▲ Prev

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
562 bits(304)	7e-156	304/304(100%)	0/304(0%)	Plus/Minus
Query 1	CCTACTACATAGTATTATTATCACAGATAAGACTATTAATAAACTGAAATGTATTTATG			60
Sbjct 6195	CCTACTACATAGTATTATTATCACAGATAAGACTATTAATAAACTGAAATGTATTTATG			6136
Query 61	AAACAACACTTAAATGTATAATGTATATATTTCTAGAACCACAATCTATTGGATTATTTA			120
Sbjct 6135	AAACAACACTTAAATGTATAATGTATATATTTCTAGAACCACAATCTATTGGATTATTTA			6076
Query 121	TCCTAACATTTCTACTCTATAGAGGTATCAatTTTTatttaccattttttatttattGTCG			180
Sbjct 6075	TCCTAACATTTCTACTCTATAGAGGTATCAATTTTTATTACATTTTTATTTTATTGTCG			6016
Query 181	ACTAGTTAAATATGAGTTTTAATGTCGAAATTTAAGTACCGGATTAGTCCTATCATTGAG			240
Sbjct 6015	ACTAGTTAAATATGAGTTTTAATGTCGAAATTTAAGTACCGGATTAGTCCTATCATTGAG			5956
Query 241	TCGAAATCAATAATGAATACTTGTATTTTAAAGAATGATCAGTATATAGTAAAAGA			300
Sbjct 5955	TCGAAATCAATAATGAATACTTGTATTTTAAAGAATGATCAGTATATAGTAAAAGA			5896
Query 301	AGTA 304			
Sbjct 5895	AGTA 5892			

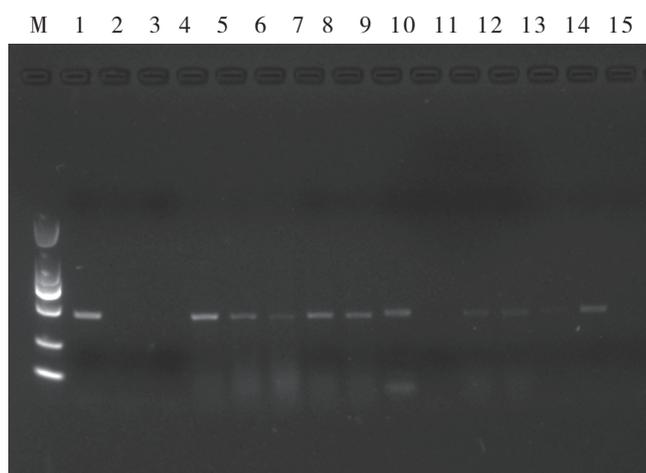
图 8 测序比对结果

表 4 药材测定结果

序号	基原或俗称	编号	是否扩增出特异性条带
1	蚂蟥（宽体金线蛭）	KT-01	是
2	蚂蟥（宽体金线蛭）	KT-02	是
3	蚂蟥（宽体金线蛭）	KT-03	是
4	蚂蟥（宽体金线蛭）	KT-04	是
5	蚂蟥（宽体金线蛭）	KT-05	是
6	蚂蟥（宽体金线蛭）	KT-06	是
7	蚂蟥（宽体金线蛭）	KT-07	是
8	水蛭（日本医蛭）	RY-01	否
9	水蛭（日本医蛭）	RY-02	否
10	水蛭（日本医蛭）	RY-03	否
11	水蛭（日本医蛭）	RY-03	否
12	菲牛蛭	FN-01	否
13	菲牛蛭	FN-02	否
14	菲牛蛭	FN-03	否
15	东北小水蛭	DBXSZ-01	否
16	小黑条	XHT-01	否
17	黑条	HT-01	否
18	水蛭伪品（进口）	SZWP-01	否

表5 粉末测定结果

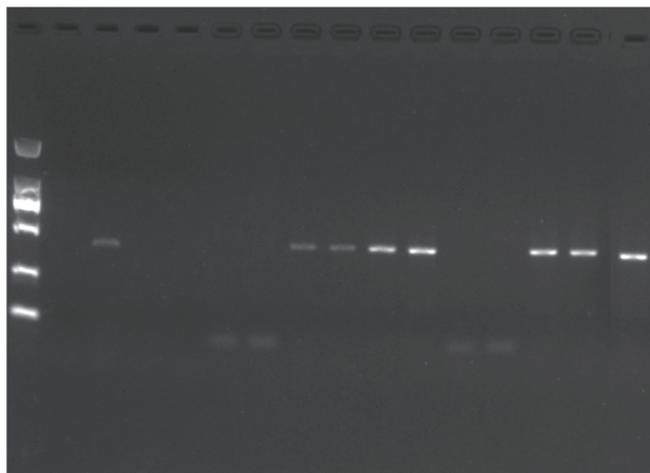
序号	名称	编号	是否扩增出特异性条带
1	水蛭（蚂蟥）粉	SZF-01	是
2	水蛭（蚂蟥）粉	SZF-02	是
3	水蛭（蚂蟥）粉	SZF-03	否
4	水蛭（蚂蟥）粉	SZF-04	是
5	水蛭（蚂蟥）粉	SZF-05	是
6	水蛭（蚂蟥）粉	SZF-06	是
7	水蛭（蚂蟥）粉	SZF-07	是
8	水蛭（蚂蟥）粉	SZF-08	是
9	水蛭（蚂蟥）粉	SZF-09	是
10	水蛭（蚂蟥）粉	SZF-10	是



1. 水蛭（蚂蟥）对照药材；2. DBXSZ-01；3. XHT-01；4~6. KT01~03；
7~9. SZF01~03；10. HT-01；11~14. SZF04~07；15. SZWP-01；M. 2000 DNA Marker。
（注：条带从下到上代表的分子量大小分别为100、250、500、750、1000、2000 bp）

图9 蚂蟥及常见混伪品典型电泳图谱（一）

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15



1. FN-01; 2. 水蛭(蚂蟥)对照药材; 3~6. RY01~04; 7~9. SZF08~10;
10. KT04; 11~12. FN02~03; 13~15. KT05~07; M. 2000 DNA Marker。

(注: 条带从下到上代表的分子量大小分别为100、250、500、750、1000、2000 bp)

图10 蚂蟥及常见混伪品典型电泳图谱(二)

6 讨论

6.1 国内外相关研究

水蛭药材药效学的发挥主要依据其化学成分水蛭素,临床疗效的发挥大多均基于水蛭素的活血、化瘀、通络等药理作用。水蛭传统鉴别方法以性状鉴别、薄层鉴别、高效液相色谱法为主^[7],鉴别结果易受遗传多样性^[8-12]、药材表型可塑性^[12]及人为因素的影响。目前常用鉴定水蛭药材的分子生物学技术包括简单重复序列间标记(Inter Simple Sequence Repeats, ISSR)、SRAP(Sequence-related Amplified Polymorphism)、随机扩增多态性DNA(Random Amplified Polymorphic DNA, RAPD)、简单重复序列分子标记(Simple Sequence Repeats, SSR)技术^[4]等。侯芳洁等^[13]将水蛭药材的微性状结合DNA条形码技术区分水蛭及其混淆品;徐云玲等^[14]通过DNA条形码技术找到水蛭与其常见混淆品的种间差异。Liu等^[15]通过ISSR和SRAP技术发现不同省份的蚂蟥群体间有较高的遗传分化。除上述文献外,还有通过特异性PCR染料法鉴别蚂蟥及其常见伪品。综合分析上述技术目前还存在灵敏度、重现性、准确性差,开发难度高及试验成本较高等^[4]问题;因此,易于操作、试验成本低、简单快速、安全准确的特异性PCR方法更适合鉴别蚂蟥及其粉末。

6.2 本研究创新点

DNA条形码技术可以在药材传统鉴别的基础上为物种鉴别提供种间差异,是药材鉴别和分类新的研究方法思路。2020年版《中华人民共和国药典》中药材DNA条形码分子鉴定法指导原则中动物类中药材采用CO I为主体序列,因CO I为线粒体基因组的蛋白质编码基因,由于该基因进化速率较快,常用于分析亲缘关系密切的种、亚种及地理种群之间的系统关系^[16-17]。蚂蟥的CO I序列保守位点相对较多,如30、36、141、162、288、308、315、441和513 bp^[18-19]。王文秀等^[20]设计的特异性PCR染料法引物上游包括了30 bp和36 bp位置处的变异位点,下游引物涵盖了162 bp位置处的变异位点,总长度149 bp,序列相对较短,可能影响结果的准确性。本研究为避免与其设计引物重复,选择其他保守位置设计引物,但是错配率较高,引物二聚体明显,特异性较差。为提高引物质量,保证其高特异性及高准确性,从NCBI数据库下载线粒体基因组,通过BioEdit软件对下载序列进行分析,在5893 bp位置至5913 bp位置处含2个变异位点,在6353 bp位置至6395 bp位置处含4个变异位点,因此,在5893 bp至5913 bp位置设计上游引物,6353 bp至6395 bp位置设计下游引物;上下游引物长度在18~20 bp,GC含量在30%~60%,退火温度为

50 ℃, 长度在400 bp左右, 长度适中。为保证引物设计的准确性和特异性, 将PCR扩增片段进行一代测序, 测序结果与传统鉴别及NCBI数据比对结果一致。

吸血水蛭以动物为宿主, 血液中携带宿主DNA, 如果直接提取DNA模板, 引物CO I进行扩增, 扩增片段有可能为宿主DNA片段, 出现聚类结果不准确等情况。本研究在DNA提取前用水浸泡, 剖开腹部, 除去内脏及残留的血液, 清洗干净, 取样时用刀片刮取背部肌肉组织, 保证了模板DNA纯度, 为后续试验结果的准确性奠定基础。本研究将特异性引物应用到不能明确药材基原的粉末中, 同时进行了灵敏度试验等方法学考察, 结果表明该方法同样适用于药材性状破坏的中药粉末。中药水蛭(蚂蟥)粉为蚂蟥直接粉碎入药, 成分较为复杂, 但是应用本研究设计的特异性引物均能将其鉴别, 说明本研究的引物特异性较高, 稳定性好。本试验只需凝胶成像系统及电泳系统, 成本较低, 简单易操作, 不使用有毒染料劳动安全性高, 适合广泛应用, 为临床用药和市场监管提供技术支持。

6.3 问题与展望

本研究设计的特异性引物以市场为导向, 主要针对蚂蟥药材及其粉末, 该引物可以鉴别蚂蟥及其常见混伪品, 但不适用于药典基原的另外2个种即水蛭和柳叶蚂蟥对其常见混伪品的区别, 这是本研究的不足点。因此, 将继续对药典基原的另外2个品种开展研究, 建立更为科学、通用性更好的分子生物学方法, 为市场监管服务。

参考文献:

- [1] 中华人民共和国药典: 一部[S]. 2020: 205.
- [2] 杨谋, 张选杰, 张娇, 等. 水蛭的药用价值和养殖现状[J]. 当代畜牧, 2018, 36(18): 58-60.
- [3] 余米, 周梦, 曹敏, 等. 药用水蛭研究进展[J]. 水产养殖, 2021, 42(6): 39-43.
- [4] 郑阳. 水蛭的DNA分子鉴定和蛋白质分析[D]. 镇江: 江苏大学, 2019.
- [5] 何昶昊, 陈晓莹, 张晓萌, 等. 宽体金线蛭作为药用水蛭基原的考证[J]. 中国医药导报, 2021, 18(24): 112-115.
- [6] 丁月珠, 段天璇, 单宇, 等. 宽体金线蛭与菲牛蛭抗凝血酶活性及抗凝机制比较研究[J]. 中国药师,

2016, 19(9): 1621-1624.

- [7] 崔丽娜, 杜鹤, 杜航, 等. 药用动物DNA鉴定技术的研究[J]. 吉林中医药, 2012, 32(5): 485-486.
- [8] 杜鹤, 崔丽娜, 张辉, 等. 鳖甲及其混伪品的DNA分子鉴定[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2011, 13(2): 429-434.
- [9] 崔丽娜, 杜鹤, 张辉, 等. 基于CO I条形码序列的金钱白花蛇及其混伪品的DNA分子鉴定[J]. 世界科学技术, 中医药现代化, 2011, 13(2): 424-428.
- [10] 肖凌. 水蛭DNA鉴定、活性多肽分离及其作用机制的研究[D]. 武汉: 湖北中医药大学, 2015.
- [11] 黄秋阳, 冷静, 甘奇超, 等. 水蛭及其制剂在心脑血管疾病中的应用[J]. 中成药, 2019, 41(8): 1915-1920.
- [12] 康晓龙, 冯登侦. DNA条形码及其在动物遗传多样性中的应用[J]. 畜牧与兽医, 2012, 44(6): 94-97.
- [13] 侯芳洁, 樊伟旭, 杨言言, 等. 基于微性状鉴别法的水蛭药理学研究[J]. 时珍国医国药, 2021, 32(12): 2930-2932.
- [14] 徐云玲, 聂晶, 肖凌. 6种水蛭的CO I、12S rRNA和16S rRNA基因及分子进化分析[J]. 生物学杂志, 2013, 30(6): 10-13.
- [15] Liu Xuan, Wang Caihui, Ding Xue, et al. A Novel Selective Inhibitor to Thrombin-induced Platelet Aggregation Purified from the Leech *Whitmania pigra*[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2016, 473(1): 349-354.
- [16] 刘飞. 蚂蟥生长繁殖习性及其遗传多样性分子标记研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2008.
- [17] 陈士林, 姚辉, 宋经元, 等. 基于DNA barcoding(条形码)技术的中药材鉴定[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2007(3): 7-12.
- [18] 杨谋, 张选杰, 张娇. 水蛭的药用价值和养殖现状[J]. 当代畜牧, 2018(18): 58-60.
- [19] 张香东, 刘庚, 常素慧, 等. 水蛭ISSR-PCR反应体系的建立及优化[J]. 中草药, 2013, 44(2): 215-218.
- [20] 王文秀, 高晗, 张环宇, 等. 宽体金线蛭的特异性PCR分子鉴定[J]. 天津中医药, 2020, 37(11): 1299-1303.

(收稿日期 2022年7月1日 编辑 郑丽娥)