

· 基础研究 ·

蛤蚧及其混伪品基于 12S rRNA 序列的
Bar-HRM 鉴定研究[△]

苏燕燕, 丁丹丹, 马婷玉, 向丽*

中国中医科学院 中药研究所 中药鉴定与安全性检测评估重点实验室, 北京 100700

[摘要] 目的: 为实现蛤蚧与其常见混伪品的高效鉴别和掺伪检测, 并建立蛤蚧中药材的 DNA 条形码-高分辨率熔解曲线(Bar-HRM)鉴别方法。方法: 本研究收集了 7 个物种 48 份动物样品和 10 份蛤蚧粉。基于 12S 核糖体核糖核酸(12S rRNA)序列对蛤蚧及其 6 种常见混伪品进行高分辨率熔解曲线(HRM)鉴定研究并测序验证。采用 HRM 方法进行灵敏度和掺伪检测分析, 并对市场蛤蚧粉进行检测验证。结果: 蛤蚧及其 6 种常见混伪品均可通过 12S rRNA-HRM 曲线分析进行鉴别; 可实现纳克级的准确检测, 最低掺伪检测限为 1%; 10 份市售蛤蚧粉中 6 份质量可疑。结论: 基于 12S rRNA 序列的 Bar-HRM 技术可实现蛤蚧与其常见混伪品的准确鉴别, 在掺伪检测中具有独特优势, 对市场药材的快速检测及质量评估有一定应用价值。

[关键词] 蛤蚧; 12S 核糖体核糖核酸基因; 高分辨率熔解曲线; 鉴别

[中图分类号] R282.74; R284; R282.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1673-4890(2019)09-1197-09
doi:10.13313/j.issn.1673-4890.20190325006

Identification of *Gekko gekko* and Its Adulterants Using High Resolution Melting Based on 12S rRNA Regions

SU Yan-yan, DING Dan-dan, MA Ting-yu, XIANG Li*

Key Laboratory of Beijing for Identification and Safety Evaluation of Chinese Medicine,

Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China

[Abstract] **Objective:** To develop the Bar-HRM method for identifying *Gekko gekko* and its adulteration efficiently. **Methods:** Forty-eight animal samples and ten samples of commercial *G. gekko* powder were collected from markets. All the samples were identified using HRM analysis combined with DNA barcode technique based on 12S rRNA region. Besides, sensitivity analysis and adulteration detection of HRM were analyzed in this study. **Results:** It was demonstrated that *G. gekko* and six common counterfeits could be clearly distinguished through Bar-HRM analysis based on 12S rRNA region. The sensitivity of 12S-HRM in adulteration detection was 1%. Six samples of commercial *G. gekko* powder were doubtful in quality. **Conclusion:** The Bar-HRM method based on 12S rRNA region is a powerful tool for the identification of *G. gekko* and its common adulterants.

[Keywords] *Gekko gekko*; 12S rRNA; high resolution melting; identification

蛤蚧为我国名贵动物中药材, 其基原为壁虎科 Gekkonidae 壁虎属动物蛤蚧(又名大壁虎) *Gekko gekko* Linnaeus, 以除去内脏的干燥全体入药, 具有止咳、平喘、保肝、降血糖、提高机体免疫力及激素样作用^[1-4], 为临床常用补虚药^[5-6]。因市场需求增大、人们大肆捕捉及生存环境的改变, 蛤蚧野生资源骤减, 现已列为国家二级保护动物和广西省一级保护动物, 市场上蛤蚧多为进口和养殖。由于蛤蚧、藏蛤蚧等形态相似, 导致同名异物、同物异名

的情况较为严重, 市场常见壁虎、藏蛤蚧、石龙子、蜥蜴等混伪品^[7-11]。近年来, 越来越多的蛤蚧粉、蛤蚧胶囊等未经检验的药材在电商平台出售, 严重威胁临床用药安全, 亟需一种准确高效的鉴别方法规范药材市场、保障药材安全。

高分辨率熔解曲线(High Resolution Melting, HRM)技术是指采用饱和荧光染料, 结合实时荧光定量 PCR 技术, 通过核酸熔解曲线分析, 进而实现基因检测、基因型分析的新型分子诊断技术^[12-14]。

[△] [基金项目] 公益性行业科研专项(201507002-4-1-3)

* [通信作者] 向丽, 副研究员, 研究方向: 中药资源和分子鉴定学; Tel: (010)64013996, E-mail: lxiang@icmm.ac.cn

因其具有灵敏度高、检测快速、闭管操作避免污染、可实现高通量检测、可选择性测序等优点,逐渐应用于基因突变扫描、基因型分析、单核苷酸多态性(SNP)分析等研究^[15-18]。此外,结合DNA barcoding的Bar-HRM技术逐渐形成,并成功应用于沙棘、蜂蜜等中药、食品的鉴定研究中,具有重要应用价值^[19-21]。

目前,蛤蚧相关的HRM鉴定研究未见报道,而动物通用条形码线粒体细胞色素c氧化酶亚基I基因(cytochrome c oxidase subunit I, COI)序列长度大于600 bp,相较之下,片段长度约400 bp且能实现蛤蚧与混伪品鉴别的12S核糖体核糖核酸(Ribosomal Ribonucleic Acid, rRNA)基因序列则更为适宜^[22-25]。因此,本研究以蛤蚧与其6种常见混伪品为研究对象^[11,26-27],基于12S rRNA序列对其进行HRM鉴别

研究,并对市售蛤蚧粉进行检测,以验证该方法的可行性,完善了中药蛤蚧的分子快速鉴定体系。

1 材料

1.1 实验样品

本研究所用动物样品共48份,其中,蛤蚧10批次30份;蛤蚧常见混伪品无蹼壁虎 *Gekko swinhonis*、疣尾蜥虎 *Hemidactylus frenatus*、喜山岩蜥 *Laudakia himalayana*、石龙子 *Eumeces chinensis*、东方蝾螈 *Cynops orientalis* 和红瘰疣螈 *Tylototriton shanjing* 各3份。此外,购买市售蛤蚧粉10份。动物样品均经中国科学院昆明动物研究所蒋珂助理研究员鉴定,凭证标本保存于中国中医科学院中药研究所。本研究共得48条12S rRNA序列,均已提交至NCBI核酸数据库(表1)。

表1 蛤蚧及其混伪品样品信息

物种	凭证标本号	GenBank号	来源
蛤蚧 <i>G. gecko</i>	DW001GJ02001	MH047706	中国食品药品检定研究院
	DW001GJ10001, DW001GJ10002, DW001GJ10003, DW001GJ10032, DW001GJ10033, DW001GJ10034	MH047707, MH047708, MH047709, MH047710, MH047711, MH047712	安徽亳州药市
	DW001GJ03001, DW001GJ03002, DW001GJ03003	MH047713, MH047714, MH047715	河北安国药市
	DW001GJ04003, DW001GJ04004, DW001GJ04005, DW001GJ05001, DW001GJ05003, DW001GJ05004	MH047716, MH047717, MH047718, MH047719, MH047720, MH047721	四川康定药市
	DW001GJ06001, DW001GJ06002, DW001GJ06003, DW001GJ06004	MH047722, MH047723, MH047724, MH047725	西藏
	DW001GJ07001, DW001GJ07002, DW001GJ07003, DW001GJ07004, DW001GJ08002, DW001GJ08003, DW001GJ08004	MH047726, MH047727, MH047728, MH047729, MH047730, MH047731, MH047732	新疆乌鲁木齐
	DW001GJ09001, DW001GJ09002, DW001GJ09003	MH047733, MH047734, MH047735	北京同仁堂
无蹼壁虎 <i>G. swinhonis</i>	DW002WP03002, DW002WP03003, DW002WP03004	MH047736, MH047737, MH047738	河北沧州任丘
疣尾蜥虎 <i>H. frenatus</i>	DW003YW01001, DW003YW01003, DW003YW01004	MH047739, MH047740, MH047741	四川康定药市
喜山岩蜥 <i>L. himalayana</i>	DW007XS02001, DW007XS02002, DW007XS02003	MH047742, MH047743, MH047744	四川
石龙子 <i>E. chinensis</i>	DW012SL01001, DW012SL01002, DW012SL01003	MH047703, MH047704, MH047705	河北安国药市
东方蝾螈 <i>C. orientalis</i>	DW014DF01001, DW014DF01002, DW014DF01003	MH047700, MH047701, MH047702	湖北黄冈
红瘰疣螈 <i>T. shanjing</i>	DW016HL01001, DW016HL01002, DW016HL01003	MH047745, MH047746, MH047747	西藏
蛤蚧粉	SY1		广西
	SY2, SY3		广西南宁
	SY4, SY5, SY6, SY7, SY9, SY10		安徽亳州
	SY8		辽宁本溪

1.2 仪器及试剂

Scientz-48 高通量组织研磨仪(宁波新芝生物科技股份有限公司); Qubit 3.0 荧光定量仪 [赛默飞世尔(美国)科技有限公司]; Rotor-Gene Q MDx 实时定量 PCR 仪 [凯杰(德国)生物技术有限公司]; 血液/组织/细胞基因组 DNA 提取试剂盒 [天根生化科技(北京)有限公司]; HRM 分析试剂盒 [天根生化科技(北京)有限公司]; T-A 克隆试剂盒 [宝生物工程(大连)有限公司]。

2 方法

2.1 DNA 提取

采用试剂盒法提取样品总 DNA^[26]。所有样品 DNA 均利用 Qubit 3.0 测定浓度, 并调整为 30 ~ 50 ng·μL⁻¹。采用微量紫外分光光度计测定样品 DNA 质量, OD_{260/280} 处于 1.8 ~ 2.0 的为优质; 保存于 -20 °C 冰箱备用。

2.2 蛤蚧 12S rRNA 序列扩增及数据分析

以 10 批次蛤蚧样品 DNA 为模板, 进行 12S rRNA 序列扩增^[24], 采用凝胶电泳法检测扩增结果, 送北京诺赛基因组研究中心有限公司双向测序。

通过软件 CodonCode Aligner V3.0 对 10 批次蛤蚧的 12S rRNA 序列峰图进行拼接剪切, 在 NCBI 比对验证后采用 MEGA 6.0 进行序列分析。

2.3 蛤蚧及其混伪品 HRM-PCR 扩增与 Bar-HRM 数据分析

以 10 批次蛤蚧的主要单倍型和 6 种常见混伪品的 DNA 为检测对象。

HRM-PCR 体系为 25 μL, 包含 2 × HRM PCR master mix 12.5 μL, 正反向引物 L1091/H1478 (2.5 μmol·L⁻¹) 各 1 μL, 以 1 μL DNA 为模板, 加 RNase-Free Water 补充至 25 μL。

HRM-PCR 反应条件为 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 1 min, 52 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 1 min, 循环 35 次; PCR 反应完成后进入扩增产物的 HRM 曲线分析程序: 熔解温度从 75 °C 逐渐升至 95 °C, 每变化 0.15 °C 收集一次荧光信号。蛤蚧及其混伪品的 HRM-PCR 产物均经测序验证。

2.4 蛤蚧及其混伪品 Bar-HRM 数据分析

实验中获得的高分辨率熔解曲线均通过 Rotor-Gene Q MDx version 2.3.1.49 (QIAGEN GmbH, Hilden,

Germany) 进行分析; 蛤蚧与其 6 种常见混伪品的 HRM-PCR 产物均经测序验证, 并采用 MEGA 6.0 进行序列分析。

2.5 灵敏度检测

任取 1 份蛤蚧 DNA, 将质量浓度调整为 50 ng·μL⁻¹, 并稀释为 25、10、5、1 ng·μL⁻¹ 的 DNA 溶液, 进行 HRM-PCR 实验, 研究 DNA 模板浓度与鉴定结果的关系。

2.6 蛤蚧掺伪检测

以 0%、1%、5%、10%、25%、50%、75%、100% 的比例将无蹼壁虎 DNA 与蛤蚧 DNA 混合, 以掺伪 DNA 为模板进行 HRM-PCR 扩增, 设蛤蚧为对照样品, 研究 DNA 掺伪比例与 HRM 曲线的关系。

2.7 市场蛤蚧粉鉴定

在市场购买 10 份蛤蚧粉, 取样约 45 mg, 以试剂盒法提取总 DNA。利用 HRM 技术对其进行检测: 每份设置 3 个物理重复, 以蛤蚧对照药材 DNA 为阳性对照, 并测序验证。针对出现套峰的样品进行 T-A 克隆检测。

3 结果

3.1 蛤蚧 12S 序列分析

10 批次 30 条蛤蚧 12S rRNA 序列, 长度均为 396 bp, 可分为 2 种单倍型(图 1), 其中, 单倍型 H1 有 21 条, 单倍型 H2 有 9 条; 共存在 5 个变异位点, 分别为 64 位点的 C-T 变异, 211 位点的 T-A 变异, 228 位点的 C-T 变异, 325 位点的 G-A 变异和 358 位点的 A-G 变异。表明序列较为保守。

3.2 蛤蚧及其混伪品 HRM 分析

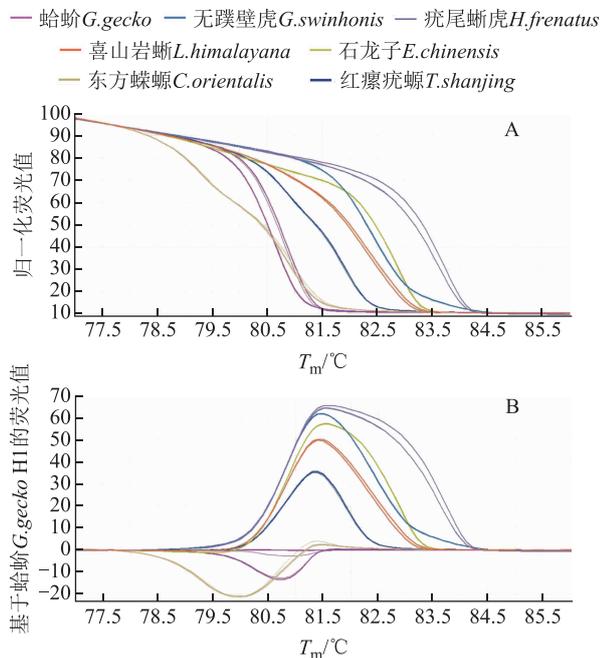
因 10 批次 30 份蛤蚧样品中仅存在 2 种单倍型, 因此, 每种单倍型任选 3 份 DNA 与 6 种混伪品共同进行 HRM 实验。根据图 2 可知, 蛤蚧与 6 种混伪品的 12S rRNA-HRM 曲线均具有不同的形状特点, 在归一化熔解曲线(图 2A) 和差异化熔解曲线(图 2B) 中, 蛤蚧的 2 种单倍型均可区分开, 但相对于无蹼壁虎、疣尾蜥虎、喜山岩蜥、石龙子、东方蝾螈和红瘰疣螈 6 种混伪品, 蛤蚧的 2 种 HRM 曲线聚在一起。无蹼壁虎、石龙子和红瘰疣螈的 HRM 曲线分别只有一种, 表明这 3 个物种分别只有一种单倍型。而 3 份疣尾蜥虎的 HRM 曲线呈现出相近的 2 种, 则

蛤蚧 <i>G. gecko</i> H1	GCCCAGACGT AAACCTTGAT AGAACCACAT CACAAATCTA TCCGCCAGGG GACTACTAGT AACCAACTTA AAACCTCAAG	[80]
蛤蚧 <i>G. gecko</i> H2T.....	[80]
蛤蚧 <i>G. gecko</i> H1	GACTTGACGG TGTTCCATAC CATCCTAGAG GAGCCTGTCC TATAACCGAT AATCCACGTT TTACCTCACC CTCTCTTGA	[160]
蛤蚧 <i>G. gecko</i> H2[160]	[160]
蛤蚧 <i>G. gecko</i> H1	ATTCCAGTCT ATATACCGCC GTCGCCAGTC TACCTTTTGA AAGCAAAAAT TAGTAGACAA AATAGTACCT TCACTAACAC	[240]
蛤蚧 <i>G. gecko</i> H2A.....T.....	[240]
蛤蚧 <i>G. gecko</i> H1	GTCAGGTCGA GGTGTAGCTA ACGAGAGGGA AGAGATGGGC TACATTGTCT TCATTAATAG ACCCCACCAT CAACTACATG	[320]
蛤蚧 <i>G. gecko</i> H2[320]	[320]
蛤蚧 <i>G. gecko</i> H1	AAATGATAGT TATAAGTCGG ATTTAGTAGT AAACCAAAGC AAGTCATGCC TGATTGAAGA ACGCTCTGGA ACGCGT	[396]
蛤蚧 <i>G. gecko</i> H2A.....G.....	[396]

注：H1 和 H2 表示不同单倍型。

图1 蛤蚧不同单倍型 12S rRNA 序列

该样品的 12S rRNA 序列有 2 种单倍型；3 份东方蝾螈和 3 份喜山岩蜥(藏蛤蚧)的 HRM 曲线均出现较小的差异，可能存在序列差异很小的不同单倍型，或者因实验操作中加样量不均一而导致曲线出现微小差异，需测序验证。总体而言，蛤蚧及其 6 种常见混伪品均可通过 HRM 曲线进行鉴别区分。



注：A. 归一化溶解曲线；B. 以蛤蚧为参考基因型的差异化溶解曲线。

图2 基于 12S rRNA 序列蛤蚧与常见混伪品的 HRM 曲线

3.3 蛤蚧及其混伪品 DNA barcoding 分析

所有 HRM-PCR 产物均经测序验证。实验共得 48 条 12S rRNA 序列，其中蛤蚧 30 条，混伪品 18 条，所有 12S rRNA 序列均在 NCBI 核酸数据库进行 BLAST 比对验证，比对到的最相近物种为自身物种，比值为 99% ~ 100%。序列特征见表 2。蛤蚧和 6 种常见混伪品的序列长度均小于 400 bp，其中，

无蹼壁虎的序列长度最长，为 399 bp；喜山岩蜥的最短，为 362 bp；蛤蚧的序列长度为 396 bp。7 个物种的平均 GC 碱基含量(鸟嘌呤 G 和胞嘧啶 C 在 DNA 4 种碱基中所占的比率)在 40% ~ 50%，其中，疣尾蜥虎的平均 GC 碱基含量最高，为 50.0%；东方蝾螈的最低，为 41.4%；蛤蚧的平均 GC 碱基含量为 43.5%。

在本研究的 7 个物种中，无蹼壁虎、石龙子、东方蝾螈和红瘰疣螈共 4 个物种的 12S rRNA 序列分别只有 1 种单倍型，种内无变异位点，序列较为保守；蛤蚧、疣尾蜥虎和喜山岩蜥分别有 2 种单倍型，其中，蛤蚧的 12S rRNA 序列含 5 个变异位点，喜山岩蜥有 1 个变异位点，疣尾蜥虎存在 18 个变异位点，种内差异较大；与 HRM 曲线分析结果相符。根据种内、种间遗传距离分析结果显示，7 个物种的种内最大遗传距离均小于其种间最小遗传距离，表明蛤蚧及其 6 种混伪品可通过遗传距离分析进行鉴别。此外，在 NJ 树图中(图 3)，蛤蚧和 6 种常见混伪品分别聚为一支，而且，自展支持率都高达 99%，表明，蛤蚧及 6 种常见混伪品可通过构建 NJ 树准确区分。

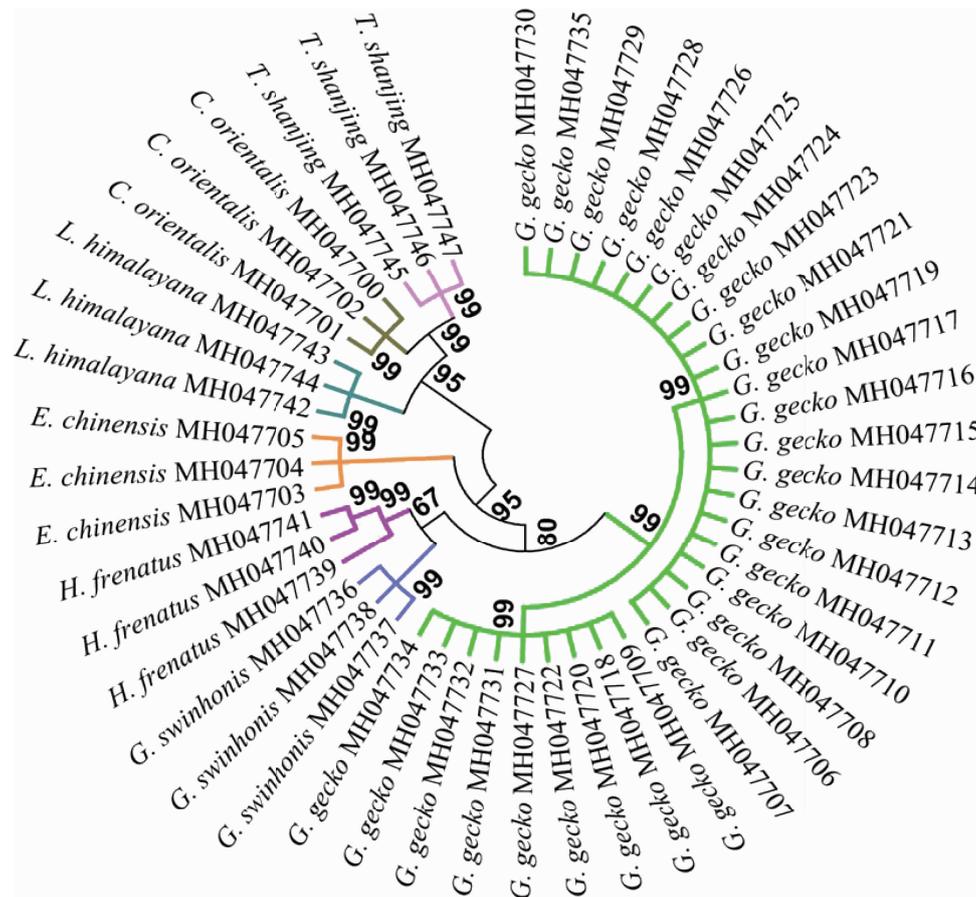
因此，经测序验证，基于 12S rRNA 序列的 DNA barcoding 分析，蛤蚧与其 6 种常见混伪品可准确鉴别，而且各物种间也能准确区分，与 HRM 曲线分析结果相符，表明基于 12S rRNA 序列的 HRM 技术可实现蛤蚧及其 6 种常见混伪品的准确区分。

3.4 灵敏度分析

为研究 DNA 浓度对鉴定效果的影响，将蛤蚧 DNA 浓度调整为 50、25、10、5、1 ng·μL⁻¹，以此系列浓度 DNA 为模板进行 HRM-PCR 扩增。图 4 显示不同浓度蛤蚧样品的 HRM 曲线聚在一起(图 4A)， T_m 值为(81.11 ± 0.03)°C(图 4B)，表明 DNA 浓度为 1 ~ 50 ng·μL⁻¹ 的蛤蚧样品均可通过 HRM-PCR 检出，且结果稳定。

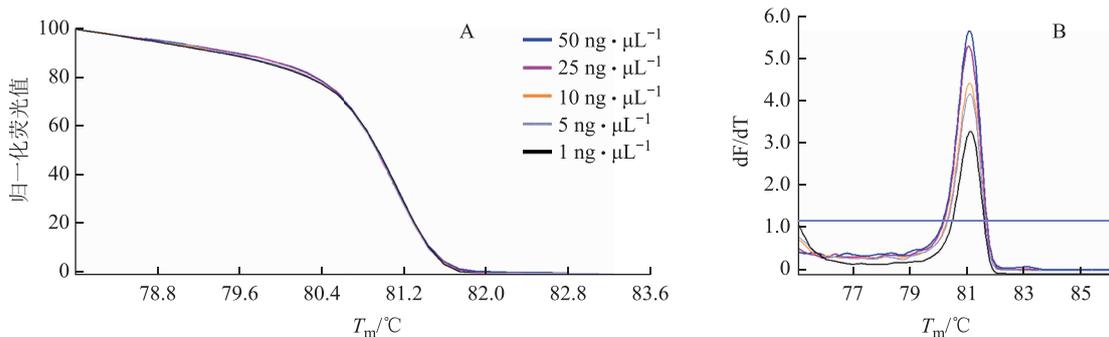
表2 蛤蚧及常见混伪品 12S rRNA 序列特征

样品	序列数目	单倍型数目	变异位点/个	序列长度/bp	平均 GC 碱基含量/%	种内最小遗传距离~种内最大遗传距离(平均)	种间最小遗传距离~种间最大遗传距离(平均)
蛤蚧	30	2	5	396	43.5	0~0.013(0.006)	0.291~0.491(0.371)
无蹼壁虎	3	1	0	399	48.9	0~0(0)	0.318~0.510(0.348)
疣尾蜥虎	3	2	18	389	50.0	0~0.048(0.032)	0.316~0.526(0.383)
喜山岩蜥	3	2	1	362	44.7	0~0.003(0.002)	0.357~0.526(0.470)
石龙子	3	1	0	384	47.4	0~0(0)	0.282~0.425(0.306)
东方蝾螈	3	1	0	370	41.4	0~0(0)	0.090~0.450(0.352)
红瘰疣螈	3	1	0	369	44.4	0~0(0)	0.090~0.454(0.357)



注: bootstrap 1000 次重复, 仅显示自展支持率 ≥ 50%。

图3 基于 12S rRNA 序列蛤蚧及其混伪品的系统进化 NJ 树



注: A. 归一化溶解曲线; B. DNA 溶解曲线。

图4 基于 12S rRNA 序列蛤蚧 HRM 曲线灵敏度检测

3.5 掺伪检测

设置 0%、1%、5%、10%、25%、50%、75%、100% 的 DNA 掺伪比例 (无蹼壁虎/蛤蚧), 研究 HRM 技术对物种的检出能力。不同掺伪比例得到的曲线不同 (图 5), 以蛤蚧的 HRM 曲线为基准, 曲线相似性随着掺伪比例的增大而降低, 当掺伪比例为 1% 时, 该 HRM 曲线的相似性为 99.07% (表 3)。结果表明, 基于 12S rRNA 序列的 HRM 曲线可实现蛤蚧的掺伪检测, 最低检测限可达 1%; 而且, 曲线相似性分析结果, 对推算掺伪比例具有一定指导意义。

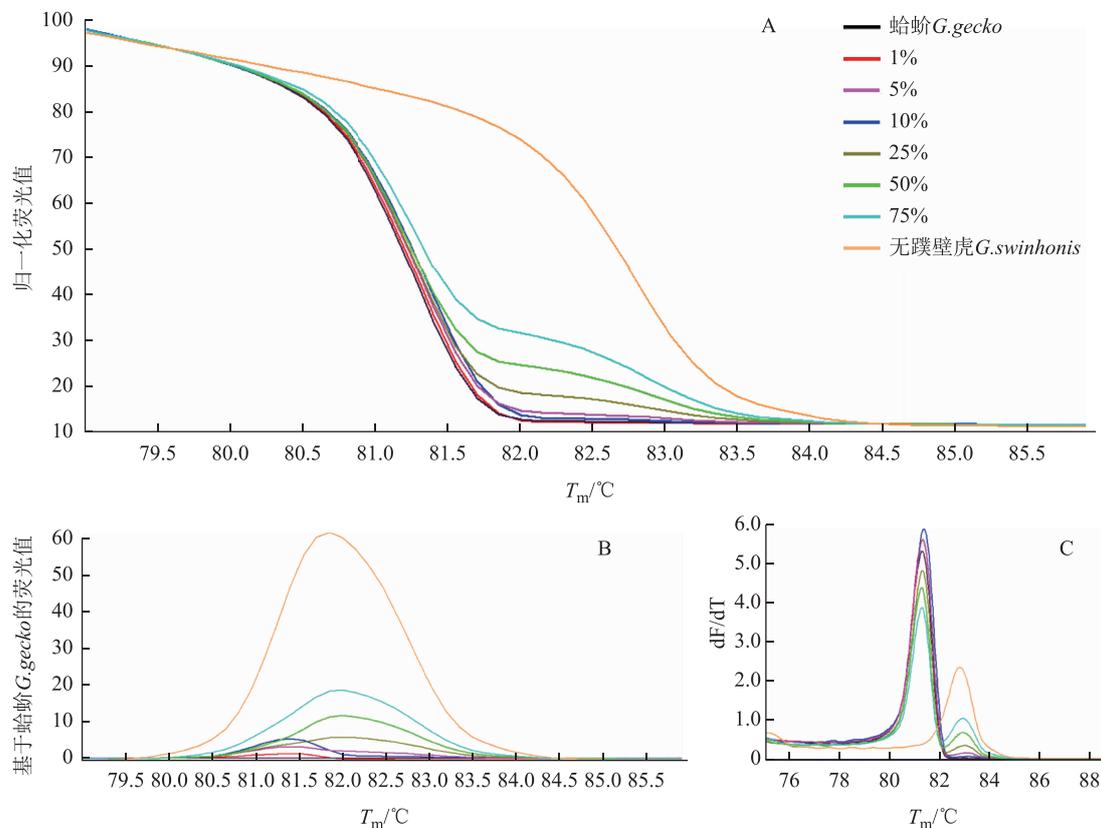
表 3 不同掺伪比例 HRM 曲线基因型置信百分比

掺伪率(无蹼壁虎/蛤蚧)	基因型置信百分比 %
0	100.00
1	99.07
5	92.72
10	87.03
25	74.33
50	35.22
75	5.92
100	0

3.6 市场蛤蚧粉鉴定

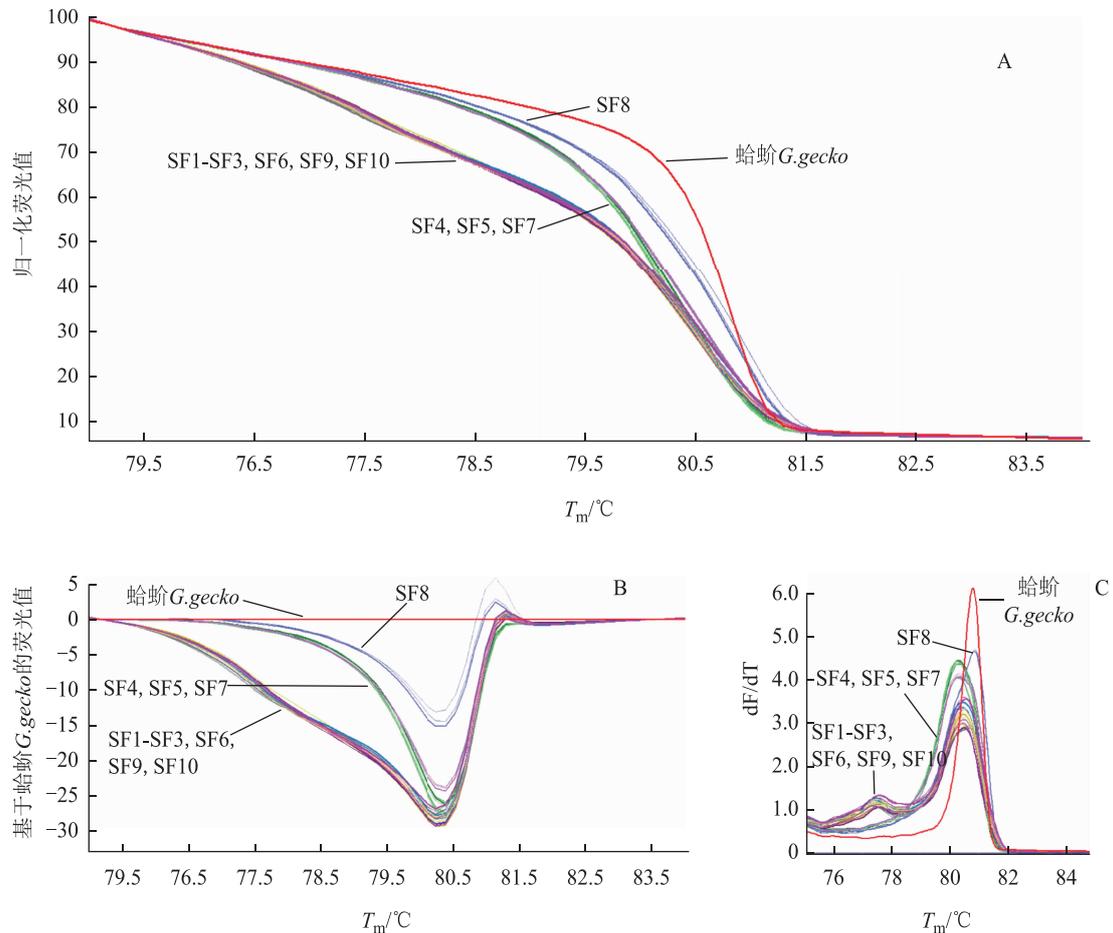
在市场购买了 10 份蛤蚧粉, 以基于 12S rRNA 序列的 HRM 技术其进行初步检测, 以鉴定其真伪。每份样品进行 3 个物理重复, 10 份蛤蚧粉得 30 条 HRM 曲线 (图 6)。其中, SY8 的 3 条曲线单独聚在一起, SY4、SY5、SY7 的 9 条曲线聚为一类, 其余 6 份样品的 18 条 HRM 曲线聚为另一类, 没有与已知蛤蚧 12S rRNA 序列完全相同的样品。推测曲线聚为一起的蛤蚧粉来源接近。经测序验证, 10 份蛤蚧粉的测序峰图均出现不同程度的套峰, 具体表现为部分位点出现套峰, 底峰较高。对出现套峰的样品进行 T-A 克隆检测, 10 份市场蛤蚧粉均检测到多种蛤蚧单倍型, 表明所购蛤蚧粉为混合样品。

此外, SY1、SY2、SY3、SY6、SY9、SY10 曲线呈现异常, 经 Qubit 3.0 测定 DNA 浓度低于 $1 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, 表明 DNA 降解严重, 其原因可能为: 炮制过程中温度过高或时间过久; 药材存放时间较久; 药材肌肉组织含量少, 如去尾后的蛤蚧。而且, 经多次 T-A 克隆检测, 比对到羽鳞属 *Proctophyllodes sp.* 物种和黑粪蚊。样品疑似不洁。结合价格分析, SY6 价格



注: A. 归一化溶解曲线; B. 以蛤蚧为参考基因型的差异化溶解曲线; C. DNA 溶解曲线。

图 5 基于 12S rRNA 序列蛤蚧掺伪检测 HRM 曲线



注: A. 归一化溶解曲线; B. 以蛤蚧为参考基因型的差异化曲线; C. DNA 溶解曲线。

图6 市售蛤蚧粉 HRM 曲线

最低, 为 0.39 元/g, 另外 5 份售价为 0.67 ~ 0.74 元/g; 而 SY4、SY5、SY7 和 SY8 的售价分别为 0.60、0.56、0.56、1.60 元/g, 检测结果无异常。推测 SY1、SY2、SY3、SY9、SY10 有以次充好的可能。

4 讨论

蛤蚧作为我国名贵动物中药材, 相关鉴定研究多有报道, 常用鉴定方法为形态鉴定、显微鉴定、理化鉴定等传统鉴定方法^[11,28-29]。形态鉴定和显微鉴定均需要长期从事中药鉴定工作的专家完成, 专业难度大, 不易掌握; 目前未发现蛤蚧的专属特征性成分, 《中华人民共和国药典》中也未记载相关成分的含量测定方法, 鉴定难度大。

目前, 以 DNA barcoding 和特异性 PCR 方法为代表的分子鉴别技术较为高效。张红印、GU 等^[26,30]均通过 COI 序列对蛤蚧及其 10 种易混物种和

伪品进行了 DNA barcoding 鉴定研究, 也有学者基于蛤蚧及其多种混伪品的 COI、16S rRNA、Cytb、12S rRNA 片段设计特异引物进行鉴别^[25,27,31-32]。但是, DNA barcoding 技术的精准鉴定主要依赖于 PCR 产物的测序, 若大宗中药材均采用测序检测, 一则检测周期延长, 二则测序成本高。而且, 存放较久的样品、炮制品以及深加工后的中成药, 因 DNA 降解, 很难经传统 PCR 扩增到较长的 DNA 片段, 如 700 bp 左右的 COI 序列。特异性 PCR 检测方法对于掺伪品则无法准确鉴别。

本研究以蛤蚧与其 6 种常见混伪品为研究对象, 采用 HRM 技术进行鉴定研究。HRM 技术灵敏度高, 理论上可实现单个碱基的差异分析, 且检测快速^[12,18,33]。结果显示, 蛤蚧、疣尾蜥虎和喜山岩蜥分别生成了 2 种峰型的溶解曲线, 推测存在不同的单倍型, 经测序验证, 与溶解曲线分析结果相符。因此, 通过 HRM 鉴别, 可实现同一个物种不同单倍

型的区分,检测灵敏度和特异性较强。而且,经 Barcoding 验证分析,蛤蚧与6种混伪品均能通过 BLAST 分析、遗传距离分析、NJ 树分析区分开,表明蛤蚧及其6种常见混伪品可通过基于12S rRNA 序列的 Bar-HRM 方法进行高效鉴别。

基于12S rRNA 序列,对蛤蚧和无蹼壁虎进行掺伪检测,根据曲线相似性分析,掺伪比例为1%时,曲线相似性为99%,表明掺伪最低检测限可达1%。而 Sakaridis 等^[34]针对驴肉的掺伪检测研究,显示出了更高的灵敏度,最低掺伪比例仅为0.1%。虽然不同物种、不同片段的扩增偏好性不同,但曲线相似性分析结果,对于评估药材是否掺伪及掺伪比例仍具有一定参考价值。经对10份市场蛤蚧粉检测发现,其中6份DNA浓度较低,且在后续T-A克隆检测中发现螨属和黑粪蚊物种,疑似存放不当,造成污染。

本研究基于12S rRNA 序列建立的蛤蚧的 Bar-HRM 鉴别方法,为蛤蚧的快速鉴别、蛤蚧药材的掺伪检测及其质量评价提供了一定的技术支持,但蛤蚧的12S rRNA 序列长度约为400 bp,对于深加工后的相关产品则很难检测,还需进一步开发片段进行研究。

参考文献

- [1] 朱华,王孝勋.蛤蚧的研究进展[J].中药材,2002,25(4):295-297.
- [2] 廖成成,臧宁,班建东,等.黑斑蛤蚧对哮喘模型小鼠的免疫调节的影响[J].中成药,2014,36(10):2037-2040.
- [3] 乔赞,周焯,叶晶,等.广西人工繁育蛤蚧药效学研究[J].中药药理与临床,2012,28(1):102-104.
- [4] 潘磊.中药蛤蚧对非酒精性脂肪肝内质网应激的影响分析[J].解放军医药杂志,2016,28(3):85-87.
- [5] 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,2015:343.
- [6] 中科院中国动物志编委会.中国动物志·爬行纲:第2卷[M].北京:科学出版社,1998:31-282.
- [7] 张继,彭继烽,徐纪民.蛤蚧本草考证议[J].首都医药,1999,6(1):46-47.
- [8] 黄宫绣.本草求真[M].上海:上海科学技术出版社,1959:213.
- [9] 陆善旦.广西灰斑蛤蚧市场销价步步登高探因[J].中国中医药信息杂志,2002,9(6):69.
- [10] 朱华,林冬杰,莫小玲,等.广西蛤蚧、泰国蛤蚧及其混伪品海蛤蚧(红瘰疣螈)的生药鉴定[J].广西中医药,1997,20(6):34-37.
- [11] 朱华,任仁安.18种商品蛤蚧原动物及性状的鉴别[J].广西中医药,1999,22(1):39-43.
- [12] WITTWER C T. High-resolution DNA melting analysis: advancements and limitations[J]. Hum Mutat,2009,30(6):857-859.
- [13] VIETINA M, AGRIMONTI C, MARMIROLI N. Detection of plant oil DNA using high resolution melting(HRM) post PCR analysis: a tool for disclosure of olive oil adulteration[J]. Food Chem,2013,141(4):3820-3826.
- [14] DRUML B, CICHNAMARKL M. High resolution melting (HRM) analysis of DNA-its role and potential in food analysis[J]. Food Chem,2014,158(9):245-254.
- [15] GANOPOULOS I, SAKARIDIS I, ARGIRIOU A, et al. A novel closed-tube method based on high resolution melting (HRM) analysis for authenticity testing and quantitative detection in Greek PDO Feta cheese[J]. Food Chem,2013,141(2):835-840.
- [16] HERRMANN M G, DURTSCHI J D, WITTWER C T, et al. Expanded instrument comparison of amplicon DNA melting analysis for mutation scanning and genotyping[J]. Clin Chem,2007,53(8):1544-1548.
- [17] REED G H, KENT J O, WITTWER C T. High-resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics[J]. Phcog,2007,8(6):597-608.
- [18] JILBERTO F, ARANEDA C, LARRAIN M A. High resolution melting analysis for identification of commercially-important *Mytilus* species [J]. Food Chem, 2017, 229: 716-720.
- [19] LIU Y, XIANG L, ZHANG Y, et al. DNA barcoding based identification of *Hippophae* species and authentication of commercial products by high resolution melting analysis[J]. Food Chem,2018,242:62-67.
- [20] SOARES S, GRAZINA L, COSTA J, et al. Botanical authentication of lavender (*Lavandula*, spp.) honey by a novel DNA-barcoding approach coupled to high resolution melting analysis[J]. Food Control,2017,86:367-373.
- [21] SIMKO I. High-resolution DNA melting analysis in plant research[J]. Trends Plant Sci,2016,21(6):528-537.
- [22] HEBERT P D N, RATNASINGHAM S, DEWAARD J R. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species[J]. P Biol Sci,2003,270(Suppl 1):S96-S99.
- [23] SUN W, LI J, XIONG C, et al. The potential power of Bar-HRM technology in herbal medicine identification[J]. Front

- Plant Sci,2016,7(e8613):367.
- [24] 张月云,莫新春,曾维铭,等. 从12S rRNA基因序列差异分析黑斑蛤蚧和红斑蛤蚧的进化关系[J]. 广西医学,2006,28(6):793-796.
- [25] 顾海丰,夏云,徐永莉,等. 中药材蛤蚧的特异性PCR鉴定[J]. 四川动物,2012,31(2):226-231.
- [26] 张红印,石林春,刘冬,等. 基于COI条形码序列的蛤蚧及其混伪品的DNA分子鉴定[J]. 世界科学技术—中医药现代化,2014,16(2):269-273.
- [27] 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.
- [28] SZYDL P P,MADEJ J P,MAZURKIEWICZ K M. Histology and ultrastructure of the integumental chromatophores in tokay gecko (*Gekko gecko*) (Linnaeus, 1758) skin [J]. Zoomorphology,2017,136(2):233-240.
- [29] 申琳,邹爱英,孟庆安. 蛤蚧的辨析[J]. 天津中医药,2010,27(6):518-519.
- [30] GU H F,XIA Y,PENGA R,et al. Authentication of Chinese crude drug gecko by DNA barcoding. [J]. Nat Prod Commun,2011,6(1):67-71.
- [31] 李力,顾海丰,夏云,等. 蛤蚧及其伪品微型DNA条形码的引物筛选[J]. 时珍国医国药,2011,22(1):202-205.
- [32] LIU Z,WANG Y,ZHOU K,et al. Authentication of Chinese crude drug, *Gecko*, by allele-specific diagnostic PCR [J]. Planta Med,2001,67(4):385-387.
- [33] REN X,FU Y,XU C,et al. High resolution melting(HRM) analysis as a new tool for rapid identification of *Salmonella enterica* serovar Gallinarum biovars Pullorum and Gallinarum[J]. Poultry Sci,2016,96(5):1088-1093.
- [34] SAKARIDIS I,GANOPOULOS I,ARGIRIOU A,et al. A fast and accurate method for controlling the correct labeling of products containing *buffalo* meat using high resolution melting(HRM) analysis[J]. Meat Sci,2013,94(1):84-88.

(收稿日期:2019-03-25 编辑:戴玮)

(上接第1196页)

- [2] WANG Z,LI M,MENG H,et al. Effects of antigliomatin from the scorpion venom of *Buthus martensii* Karsch on chloride channels on C6 glioma cells [J]. Neural Regen Res,2011,6(18):1365-1369.
- [3] MARTIN-EAUCLAIRE M F,ABBAS N,SAUZE N,et al. Involvement of endogenous opioid system in scorpion toxin-induced antinociception in mice[J]. Neurosci Lett,2010,482(1):45-50.
- [4] 吴福林,董庆海,王涵,等. 中药全蝎研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报,2018,20(12):108-111.
- [5] LI M,MENG H,WANG S,et al. Extract from *Buthus martensii* Karsch is associated with potassium channels on glioma cells[J]. Neural Regen Res,2011,6(15):1147-1150.
- [6] 葛贤秀,曹鹏,卢悟广,等. 重组东亚钳蝎镇痛抗肿瘤肽抑制人胆管癌细胞生长作用及其机制研究[J]. 医学研究生学报,2013,26(4):343-347.
- [7] 陈士林,庞晓慧,姚辉. 中药DNA条形码鉴定体系及研究方向[J]. 世界科学技术—中医药现代化,2011,13(5):747-754.
- [8] 张辉,姚辉,崔丽娜,等. 基于COI条形码序列的《中国药典》动物药材鉴定研究[J]. 世界科学技术—中医药现代化,2013,15(3):371-380.
- [9] 陈士林. 中国药典中药材DNA条形码标准序列[M]. 北京:科学出版社,2015:216.

(收稿日期:2019-03-25 编辑:王丽英)