

# 基于Cytb基因对药用昆虫地鳖虫炮制品的分子鉴别研究<sup>Δ</sup>

李娜<sup>1\*</sup>, 岳蓓蓓<sup>1</sup>, 张家贺<sup>2</sup>, 赵玥<sup>1</sup>, 宝特日根<sup>1</sup>, 贾景明<sup>1#</sup> (1. 沈阳药科大学中药学院, 沈阳 110016; 2. 吉林吉春制药股份有限公司, 吉林四平 136504)

中图分类号 R282.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)31-4354-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.31.12

**摘要** 目的: 建立基于线粒体DNA细胞色素氧化酶b(Cytb)基因分子标记技术对地鳖虫(地鳖、冀地鳖)及其混伪品炮制药材进行分子鉴定的方法。方法: 采用改良的饱和氯化钠法对地鳖虫及其混伪品炮制药材的总DNA进行提取。通过通用引物REVCB2H、REVCBJ对所有样品的Cytb基因进行聚合酶链反应(PCR)扩增; 用MEGA 5.1软件对所有样品的Cytb基因序列采用邻接(NJ)法构建系统发育树; 并利用DNAMAN软件对得到的所有样品的Cytb基因序列进行比对, 分析正品、混淆品间序列差异, 在差异较大区域设计特异性引物Esin-F和Esin-R进行分子鉴定。结果: 以提取的DNA为模板均能成功扩增出相应的Cytb基因片段; 构建的系统发育树与其亲缘关系一致; 设计的特异性引物Esin-F和Esin-R在同样的条件下, 只有地鳖虫得到了扩增条带。结论: 建立了地鳖虫及其混伪品药材炮制品的DNA提取方法; 设计的特异性引物对地鳖虫有高度的特异性, 能够有效鉴别地鳖虫及其混伪品。

**关键词** 地鳖虫; 炮制药材; Cytb基因; 分子鉴别; 系统发育树

## Molecular Identification of Processed Medicinal Insects *Chinese polyphaga* Based on Cytb Gene

LI Na<sup>1</sup>, YUE Bei-bei<sup>1</sup>, ZHANG Jia-he<sup>2</sup>, ZHAO Yue<sup>1</sup>, Baoterigen<sup>1</sup>, JIA Jing-ming<sup>1</sup> (1. School of TCM, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China; 2. Jilin Jichun Pharmaceutical Co., Ltd., Jilin Siping 136504, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To provide new identification method for processed medicinal material *Chinese polyphaga* (*Eupolyphaga sinensis*, *Steleophaga plancyi*) and their adulterants by establishing molecular identification method based on Cytb genes. METHODS: The total DNA of *Chinese polyphaga* and their adulterants was extracted using modified saturation sodium chloride method. The Cytb genes of all samples were amplified with PCR using general primers REVCB2H and REVCBJ. The phylogenetic tree of all samples was constructed with Neighbor-Joining (NJ) method using MEGA 5.1 software. The sequences of the Cytb gene of all sampled were compared by using DNAMAN software. The difference between genuine product and their adulterants were analyzed, and the specific primers Esin-F and Esin-R were designed for molecular identification in different regions. RESULTS: DNA extracted from processed medicinal insects was successful to amplify Cytb gene segments. The phylogenetic tree of all samples was consistent with their genetic relationship. A fragment was amplified only from genuine product but not from other adulterants with the designed specific primers Esin-F and Esin-R. CONCLUSIONS: DNA extraction method from processed *Chinese polyphaga* and their adulterants have been established. Designed specific primers are highly specific to genuine product *Chinese polyphaga*, and can be used for the identification of *Chinese polyphaga* and their adulterants.

**KEYWORDS** *Chinese polyphaga*; Processed medicine; Cytb gene; Molecular identification; Phylogenetic tree

地鳖虫又名土鳖虫、土元等,为鳖蠊科昆虫地鳖(*Eupolyphaga sinensis* Walker)或冀地鳖(*Steleophaga plancyi* Boleny)的雌虫干燥体,为2010年版《中国药典》(一部)中记载的正品药材<sup>[1]</sup>。地鳖虫(地鳖、冀地鳖)类中药使用历史悠久,中国汉代的药物著作《神农本草经》、东汉的《金匱要略》以及明代的《本草纲目》等均有记载,是传统的活血化瘀类动物药。现代药理实验也证明其具有溶解静脉血栓、抑制血小板聚集、抗凝血和

抗肿瘤等药效<sup>[2]</sup>。然而市场上常出现地鳖虫的混伪品,常见的伪品有金边土鳖(*Opisthoplatia orientalis* Bolivar)和东方潜龙虱(*Cybister tripunctatus orientalis* Gschwendtner)。通过对金边土鳖进行薄层色谱(TLC)分析发现,其氨基酸成分与正品药材差异很大,不可代用<sup>[3]</sup>。因此,需要科学准确地鉴别该类药材,以保证药用地鳖虫安全有效的应用。

近年来,随着分子标记技术的发展,运用DNA分子遗传标记技术鉴别中药材的真伪已被广泛认可<sup>[4-5]</sup>。由于DNA分子遗传标记技术不受环境因素的影响,也不受样品形态和材料部位的限制,故弥补了形态学分类方法的许多缺陷<sup>[6-9]</sup>。因此,为了建立一种准确、高效的昆虫药材的鉴别方法,本研究采用基于线粒体DNA细胞色素氧化酶b(Cytb)基因的分子标记技术

Δ 基金项目:辽宁省教育厅科学研究一般项目(No.L2013391);沈阳药科大学大学生创新创业训练计划项目

\* 讲师,博士。研究方向:中药生物技术。电话:024-23986501。E-mail: ln4311413@163.com

# 通信作者:教授,博士生导师。研究方向:中药生物技术和中药资源。电话:024-23986501。E-mail: jiajingming@163.com

对昆虫药材地鳖、冀地鳖进行分子鉴别。利用改良的饱和氯化钠法对地鳖、冀地鳖及其混伪品的炮制品进行DNA提取,对Cytb基因片段进行扩增和测序,并构建了系统发育树,探讨Cytb基因在分类学上鉴别地鳖和冀地鳖的可行性,以期为药典载的昆虫类中药材提供新的鉴别方法,并为昆虫类中药的临床使用提供鉴别依据与质量控制方法。

## 1 材料

### 1.1 仪器

LDZM-80KZS-11型高压蒸汽灭菌器(上海申安医疗器械厂);ME204E型电子天平(梅特勒-托利多仪器上海有限公司);SW-CJ-2D型超净工作台(上海树立仪器仪表有限公司);Hema 9600型梯度聚合酶链反应(PCR)扩增仪、TGL-16R/18R型高速冷冻离心机(珠海黑马医学仪器有限公司);EPS300型电泳仪、Tanon 2500型凝胶成像分析系统(上海天能科技有限公司)。

### 1.2 试剂

PCR试剂盒(南京诺唯赞生物科技有限公司,批号:302051);DNA Marker III(北京康为世纪生物科技有限公司,批号: CW2192);REVCB2H、REVCBJ引物(引物序列由北京鼎国昌盛生物技术有限公司合成,批号:150504A28、150504A29,纯度:均为PAGE级);琼脂糖(香港基因有限公司);溴化乙锭(上海生工生物工程有限公司);其余试剂均为国产分析纯。

### 1.3 药材

样品药材来源于6个地区药材市场所售的炮制品,均经沈阳药科大学贾明教授鉴定为真品。分别在每个地区的药材中选取40~60只形态完整的成虫(♀)用于试验。为便于统计,将每个地区的药材进行编码。样品种类及来源见表1。

表1 样品种类及来源

Table 1 Kind and source of samples

种名	代码	只数	来源地
地鳖 <i>Eupolyphaga sinensis</i>	Esin1	50	山东济宁
地鳖 <i>Eupolyphaga sinensis</i>	Esin2	60	山东临沂
地鳖 <i>Eupolyphaga sinensis</i>	Esin3	50	浙江嘉兴
地鳖 <i>Eupolyphaga sinensis</i>	Esin4	50	安徽亳州
冀地鳖 <i>Steleophaga plancyi</i>	Spla1	50	山东临沂
金边土鳖 <i>Opisthoplatia orientalis</i>	Oori1	40	广西玉林
金边土鳖 <i>Opisthoplatia orientalis</i>	Oori2	40	广西钦州
东方潜龙虱 <i>Cybister tripunctatus orientalis</i>	Ctri1	50	广西玉林
东方潜龙虱 <i>Cybister tripunctatus orientalis</i>	Ctri2	50	广西钦州

## 2 方法

### 2.1 样品总DNA的提取

以动物药材的足部及胸部肌肉为试验材料。预试验采用酚-氯仿法和饱和氯化钠等方法提取样品总DNA,但提取产物经凝胶电泳成像后观察不到相对完整的总DNA条带,进行PCR反应也得不到相应的条带。这表明地鳖虫及其混伪品的商品成虫的总DNA降解较为严重。在预试验的基础上,笔者以改良饱和氯化钠法进行总DNA的提取,具体步骤如下:(1)将样品在STE缓冲液中浸泡过夜,去离子水冲洗后剪取足部及胸部的肌肉组织;(2)取适量肌肉组织先加入DNA缓冲液

300 μl,用研杵研磨至澄清,再补足DNA缓冲液300 μl,室温放置15 min;(3)加入蛋白酶K(50 mg/ml)50 μl,60℃恒温水浴3 h;(4)加入饱和氯化钠(6 mol/L)200 μl,涡旋振荡20 s,以离心半径为12 cm(下同)、15 000 r/min离心15 min,移上清液至另一离心管,加入2倍体积无水乙醇(-20℃预冷),混匀,-20℃冰箱中冷藏20~30 min,15 000 r/min离心15 min,弃去上清液;(5)在留有沉淀的离心管中加入无水乙醇500 μl,10 000 r/min离心5~7 min,倾去乙醇,管底即为提取的DNA,将管倒置于干净的滤纸上干燥;(6)待DNA完全干燥后,依沉淀量的大小加入30~70 μl无菌三蒸水溶解,4℃贮藏,备用。

### 2.2 PCR扩增Cytb基因的部分序列

以提取的总DNA为模板,采用Simmons(2001)提供的通用引物REVCB2H(5'-TGAGGACAAATATCATTTTGAGGW-3')和REVCBJ(5'-ACTGGTCGAGCTCCAATTCATGT-3')扩增试验材料的Cytb基因的部分序列<sup>[10]</sup>。PCR反应体系30 μl,包括10×PCR缓冲液3.0 μl、dNTP(2.5 mmol/L)2.0 μl、10×牛血清蛋白3.0 μl、MgCl<sub>2</sub>(25 mmol/L)0.9 μl、引物(10 μmol/L)各0.25 μl、Taq DNA聚合酶(5 U/L)0.25 μl、DNA模板2.0 μl、无菌双蒸水18.35 μl。PCR反应条件:95℃预变性5 min;94℃变性30 s,48℃复性45 s,72℃延伸1 min,共35个循环;72℃延伸5 min。PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳检测,产物大小用DNA Marker确定。选择电泳检测条带整齐明亮、效果好的样品交由测序公司(北京康为世纪生物科技有限公司)测序。

### 2.3 系统发育树的构建及特异性分子鉴别

利用MEGA 5.1软件对所有试验样品的Cytb基因序列采用邻接(NJ)法构建系统发育树。外群采用的是东方蜚蠊 *Blattella orientalis* L.(代码为Bori),序列从GenBank中获得,序列号为EU253907。最后,利用DNAMAN软件对得到的序列进行比对,分析正品、混淆品间序列差异。在差异较大区域设计特异性引物Esin-F和Esin-R,参照“2.2”项下PCR反应体系及反应条件进行特异性PCR扩增。

## 3 结果

### 3.1 总DNA提取及PCR扩增结果

将样品在STE缓冲液中浸泡过夜后再以饱和氯化钠法能够成功提取地鳖虫及其混伪品的干燥炮制品的总DNA。由于线粒体DNA相对适于对降解后的DNA进行PCR扩增,试验采用Cytb基因的通用引物对提取的DNA样品进行目的片段的PCR扩增。结果表明,以该方法提取出的所有个体的DNA作为模板,均能成功扩增出相应的Cytb基因片段,每个样品经琼脂糖凝胶电泳检测均得到清晰的大小为430 bp的目的条带。PCR扩增图见图1。

### 3.2 系统发育树的构建

在系统发育树中,除去外群,不同地区的地鳖、冀地鳖和金边地鳖聚为一个群A,不同地区的东方潜龙虱聚为一个群B。在A群中,不同地区的地鳖和冀地鳖聚为一个亚群A1,不同地区的金边地鳖聚为一个亚群A2。在分类学上,地鳖和冀地鳖同属于昆虫纲蜚蠊目(*Blattodea*)蜚蠊科(*Corydiidea*)昆虫,金边地鳖属于昆虫纲蜚蠊目(*Blattodea*)姬蠊科(*Phyllo-*

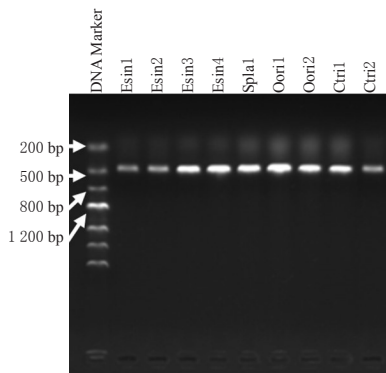


图1 通用引物扩增的PCR产物凝胶电泳图

Fig 1 Gel electrophoresis of PCR product using general primers

*dromiidae*昆虫,而东方潜龙虱属于昆虫纲鞘翅目(*Coleoptera*)龙虱科(*Dytiscidae*)昆虫。系统发育树的结果与这3种昆虫的亲缘关系一致,因此,应用Cytb基因鉴别地鳖和冀地鳖在分类学上是可行的。系统发育树见图2。

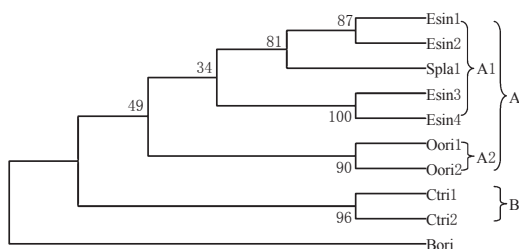


图2 NJ法构建的地鳖虫及其混伪品的系统发育树

Fig 2 Phylogenetic tree of *Chinese Polyphaga* and their adult-terants generated by NJ method

### 3.3 特异性分子鉴别

将获得的正品地鳖虫及其混伪品的Cytb基因序列比对后,设计了鉴别正品地鳖虫的特异性引物Esin-F和Esin-R,序列如下: Esin-F(5'-GGACGTATTACTAATTTATTATCAG-3'), Esin-R(5'-GGTGATTAATAATATAATTAATA-3')。以地鳖、冀地鳖、金边地鳖及东方潜龙虱的总DNA为模板,以上述序列为引物进行PCR扩增。结果,4个不同地区的地鳖及冀地鳖均有扩增条带,而其余样品均无扩增条带出现,说明这对特异性引物能够很好地对药典中记载的2种地鳖虫进行分子鉴别。特异性引物PCR扩增图见图3。

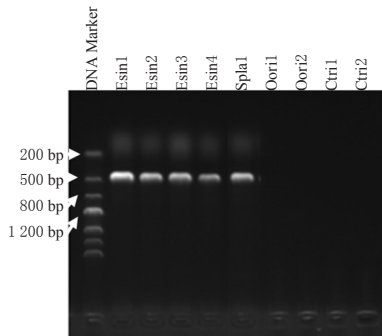


图3 特异性引物的PCR产物凝胶电泳图

Fig 3 Gel electrophoresis of PCR product using specific primer

## 4 讨论

药用昆虫通常都是经过一定的炮制程序处理后的干燥商品,如本文研究的地鳖类商品成虫,炮制处理和长久放置不但会导致肢体破碎,更会导致DNA的严重降解。因此,能否从这些炮制后的药用地鳖虫里提取出总DNA并扩增出基因序列片段,是实现该药材准确鉴别的重要环节。笔者在前期试验中比较了酚-氯仿法、饱和氯化钠法和DNA提取试剂盒等方法后,最终建立了一种昆虫药材炮制品DNA提取的方法,即先将样品在STE缓冲液中浸泡过夜,然后再以饱和氯化钠法来提取DNA。该方法易于操作、成本较低,且提取出的DNA能够满足后续研究的需要。

为了实现准确鉴别地鳖虫的目的,本研究收集了地鳖虫及其混伪品的商品药材进行了分子鉴别。结果表明,采用Cytb基因作为分子标记能够准确地鉴别地鳖虫及其混伪品。因此,笔者认为Cytb基因作为鉴别亲缘关系较近的物种具有一定的优越性,可以作为鉴别昆虫及动物药材的分子标记基因。本课题组也在进行药典记载的其他昆虫药材的分子鉴定研究,希望为药典记载的昆虫类中药材提供新的鉴别方法,为缺乏特征性理化成分及以器官组织入药的动物类药材的鉴定奠定基础,为完善动物药的质量标准提供重要依据。

### 参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 2010年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 18.
- [2] 韩雅莉, 李张伟. 地鳖虫纤溶成分的分离纯化和活性测定[J]. 中草药, 2006, 29(8): 765.
- [3] 向玉勇. 我国药用昆虫的研究应用进展[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(7): 3 014.
- [4] 李国华. 动物药鉴别研究进展[J]. 药物评价研究, 2010, 33(3): 241.
- [5] 阎婷, 李娜, 贾景明, 等. 高特异性聚合酶链反应法鉴别大、小黄鱼鱼鳔及其混淆品[J]. 中国药房, 2015, 26(4): 491.
- [6] 陈合格, 刘文彬, 李建中, 等. 三种鳖线粒体DNA细胞色素b基因序列的比较分析[J]. 水生生物学报, 2006, 30(4): 380.
- [7] Chen SL, Han JP, Liu C, *et al.* Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species[J]. *PLoS One*, 2010, 5(1): e8 613.
- [8] Gu HF, Xia Y, Peng R, *et al.* Authentication of Chinese crude drug gecko by DNA barcoding[J]. *Nat Prod Commun*, 2011, 6(1): 67.
- [9] 杜鹤, 崔丽娜, 孙佳明, 等. 基于COI序列的蛤壳及其混伪品的DNA分子鉴定[J]. 吉林中医药, 2012, 32(1): 55.
- [10] Simmons RB, Weller SJ. Utility and evolution of cytochrome b in insects[J]. *Mol Phylogenet Evol*, 2001, 20(2): 196.

(收稿日期: 2015-07-03 修回日期: 2015-08-08)

(编辑: 林 静)