

· 专题 ·

虻虫的 PCR-RFLP 鉴别研究[△]

蒋超, 李军德, 袁媛*, 金艳, 赵玉洋

(中国中医科学院 中药资源中心, 北京 100700)

[摘要] **目的:** 建立简单、准确的虻虫 DNA 分子标记鉴别方法。**方法:** 扩增并分析虻虫及 7 种常见伪品的细胞色素 C 氧化酶 I 亚基基因(CO I)序列, 根据差异片段设计聚合酶链反应-限制性内切酶酶切长度多态性(PCR-RFLP)引物, 使用限制性内切酶进行酶切鉴别。**结果:** 引物对 MengChong-Dig. F/MengChong-Dig. R 可扩增虻虫及其伪品 CO I 序列, 产生约 490 bp 条带, 限制性内切酶 *Dra* I 可以识别虻虫及其伪品的差异序列, 仅虻虫的 CO I 片段可被酶切形成两个片段, 从而特异性鉴别是否为虻虫。**结论:** 本实验建立的 PCR-RFLP 可以作为虻虫的 DNA 鉴定方法。

[关键词] 虻虫; 聚合酶链反应-限制性内切酶酶切长度多态性; 分子鉴定; CO I 序列

Molecular Identification of Medicinal Gadfly and Its Adulterants by PCR-RFLP Analysis

JIANG Chao, LI Junde, YUAN Yuan*, JIN Yan, ZHAO Yuyang

(National Resource Center for Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing, 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a convenient and effective DNA molecular identification method for medicinal gadfly. **Methods:** CO I sequences of gadfly and 7 adulterants were amplified and analyzed, PCR-RFLP primers were designed based on differential fragment, and restriction enzyme digest was further conducted to identify gadfly and the 7 adulterants. **Results:** Approximately 490 bp specific fragment bands from medicinal gadfly and its adulterants were amplified by MengChong-Dig. F/MengChong-Dig. R. *Dra* I restriction endonuclease could only digest the amplified fragment of medicinal gadfly into two smaller pieces, therefore identifying medicinal gadfly specifically. **Conclusion:** The methods of PCR-RFLP developed in this research is an accurate identification method for medicinal gadfly.

[Keywords] Medicinal gadfly; PCR-RFLP; molecular authentication; CO I sequence

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.2017.1.003

虻虫为虻科动物复带虻 *Tabanus bivittatus* Matsumura 等的雌虫体(2015 年版《中华人民共和国药典》四部), 始载于《神农本草经》, 具有调经破血、消癥软坚的功能。中医临床用于经闭、瘀血作痛、跌仆损伤等病症^[1]。虻虫雌虫吸食牛、马等动物血液, 亦吸食人类血液。虻虫为少常用中药, 随着经济的发展, 个体化动物养殖减少, 虻虫资源蕴藏量处于下降趋势。市场上虻虫类基源动物来源也日趋复杂, 除复带虻外, 同科虻属、黄虻属、麻虻属、瘤虻属多种虻虫也广泛应用。同时, 作者对玉林、安国、亳州等大型药材市场调查发现, 蜜蜂科昆虫中华蜜蜂 *Apis cerana* Fabricius、意大利蜜蜂

A. mellifera ligustica Spin., 熊蜂属(*Bombus*)昆虫, 胡蜂科(*Vespidae*)昆虫的各类成虫炮制后与虻虫形态相似, 常充伪虻虫出售, 甚至蝇科(*Muscidae*)家蝇 *Musca domestica* Linnaeus、麻蝇科(*Sarcophagidae*)麻蝇、丽蝇科(*Calliphoridae*)丽蝇等多种蝇类也常掺杂其中, 严重影响了药材质量。目前虻虫一般通过形态学和显微鉴定^[2-3], 对于缺头少尾的虻虫市售药材鉴定困难, 亟待客观化和标准化。

近 20 年来, DNA 分子标记技术已应用于中药的真伪鉴定与质量评价等相关研究^[4-6]。聚合酶链反应-限制性内切酶酶切长度多态性(Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism,

[△] [基金项目] 中医药行业科研专项(201407003)

* [通信作者] 袁媛, 研究员, 研究方向: 中药功能基因组研究及中药分子鉴定研究; Tel: (010)64014411-2956, E-mail: y_yuan0732@gmail.com

PCR-RFLP)将 PCR 与 DNA 序列分析相结合,通过 PCR 扩增获得目的片段,以合适的限制性内切酶对目的片段进行 RFLP 分析,从而产生特定酶切图谱。PCR-RFLP 及其变种已广泛用于动植物中药的真伪鉴别^[7-10],2015 版《中华人民共和国药典》收录的川贝母 PCR 分子鉴别方法也为本法。本研究将我国常见的 11 种虻虫与 7 种市场常见伪品进行 PCR-RFLP 鉴定,以期对中药虻虫药材的分子鉴定提供依据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

PCR 仪: Veriti™ 型 (Applied Biosystem 公司)、GeneAmp 9700 型 (Applied Biosystem 公司)、PTC-100 型 (Gene 公司); 5810 R 型高速冷冻离心机 (Eppendorf 公司); VORTEX-2 GENIE 漩涡震荡仪 (Scientific industries 公司); PowerPac™ 型电泳仪 (Bio-Rad 公司); HE99X-15-1.5 型电泳槽 (Hoefer 公司); SYNGENE 凝胶成像系统 (GENE 公司)。

1.2 材料

选取来自于不同产地的 12 种虻虫及 7 类伪品共 143 份材料进行 PCR-RFLP 鉴别研究。虻虫类样品由军事医学科学院许荣满研究员提供并鉴定,其余样品采自安徽亳州、广西玉林、成都荷花池等药材市场,凭证标本保存于中国中医科学院中药资源中心。见表 1。

表 1 实验材料详表

序号	材料名称	拉丁名	数量	鉴定人
1	复带虻	<i>Tabanus bivittatus</i>	4	许荣满, 李军德
2	广西虻	<i>T. kwangsiensis</i>	3	许荣满, 李军德
3	类柯虻	<i>T. subcordiger</i>	3	许荣满, 李军德
4	范氏斑虻	<i>Chrysops vanderwulpi</i>	5	许荣满, 李军德
5	短小瘤虻	<i>Hybomitra brevis</i>	1	许荣满, 李军德
6	中华斑虻	<i>C. sinensis</i>	3	许荣满, 李军德
7	浪沧江麻虻	<i>Haematopota langchiangjanis</i>	2	许荣满, 李军德
8	浙江虻	<i>T. chekiangensis</i>	3	许荣满, 李军德
9	原野虻	<i>T. amaenus</i>	3	许荣满, 李军德
10	杭州虻	<i>T. hongchouoides</i>	1	许荣满, 李军德
11	佛光虻	<i>T. budda</i>	1	许荣满, 李军德
12	虻虫(市售)	<i>Tabanus sp.</i>	73	-
13	中华蜜蜂	<i>Apis cerana</i>	10	蒋超
14	意大利蜜蜂	<i>A. mellifera</i>	11	蒋超
15	胡蜂	<i>Polistes sp.</i>	5	蒋超
16	熊蜂	<i>Bombus sp.</i>	4	蒋超
17	家蝇	<i>Musca domestica</i>	6	蒋超
18	麻蝇	<i>Sarcophagidae sp.</i>	3	蒋超
19	丽蝇	<i>Calliphoridae sp.</i>	2	蒋超

1.3 试剂

Wizard® SV Genomic DNA Purification System 试剂盒 (Promega 公司); Taq DNA 聚合酶: Ex Taq (Takara 公司)、SpeedStar HS Taq (Takara 公司)、Q5 TaqDNA 聚合酶 (NEB 公司); 琼脂糖 (Promega 公司); 10 000 × Genegreen 核酸染料 (TianGen 公司); DL2000 DNA Marker (Takara 公司); *Dra* I 限制性内切酶 (NEB 公司、Takara 公司、Thermo 公司); 其他试剂均为国产分析纯。

2 实验方法

2.1 引物设计

2.1.1 虻虫序列获得 从 NCBI 数据库 (National Center for Biotechnology Information) 中下载虻虫 (DQ983533.1、DQ631993.1) 及人 (JN034122.1)、猪 (JN850781.1)、牛 (JX218067.1)、羊 (KT750038.1) 等动物的 CO I 序列,使用 Clustal W 程序进行多重序列比对,选择虻虫特异性序列区域,使用 Premier Primer 5.0 (<http://www.premierbiosoft.com/primerdesign/>) 设计特异性 PCR 引物。PCR 产物长度为 500 ~ 700 bp, Tm 值为 55 ~ 65 °C。引物命名为 MengChong-1. F 和 MengChong-1. R, 由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,见表 2。使用虻虫特异性 PCR 引物扩增收集的虻虫及其伪品材料,阳性 PCR 产物使用 Sanger 测序法进行双向测序,序列经 CodonCode Aligner 5.1.2 拼接后用于酶切位点分析。

2.1.2 酶切位点分析 使用 Clustal W 程序对测序获得的虻虫序列和虻虫伪品序列进行多重序列比对,寻找其差异区域,使用在线软件 WatCut (http://watcut.uwaterloo.ca/template.php?act=snp_new) 分析正伪品间差异酶切位点,寻找正伪品间具有差异的单一酶切位点进行 PCR-RFLP 分析。PCR-RFLP 分析的扩增引物通过 Premier Primer 5.0 设计,调整上下游引物位置,使扩增产物位于 300 ~ 500 bp,引物命名为 MengChong-Dig. F 和 MengChong-Dig. R, 见表 2。

2.2 基因组总 DNA 的提取

取虻虫类样品,使用 Retsch MM 400 球磨粉碎至能过 80 目筛,取 10 mg 粉末,使用 Wizard® SV Genomic DNA Purification System 试剂盒按说明书进行 DNA 提取。

2.3 PCR-RFLP分析

2.3.1 PCR 扩增 使用引物 MengChong-Dig. F 和 MengChong-Dig. R 对虻虫及其混伪品进行 PCR 扩增, 在 200 μL 离心管中进行 PCR 反应。反应总体积为 25 μL, 包括 10 × PCR buffer 2.5 μL、dNTP(2.5 mmol · L⁻¹) 1.5 μL、Taq DNA 聚合酶

(5 U · L⁻¹) 0.4 μL 和 DNA 模板 1 μL, 上下游引物各 0.5 μL, 用无菌双蒸水补足反应体积。PCR 反应在 Veriti™ 型 PCR 扩增仪上进行。反应程序见表 2。取 PCR 反应产物 5 μL, 加入 2 μL 6 × Loading buffer (Takara 公司), 混匀后于 Genegreen 染色的 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测, SYNGENE 凝胶成像系统观察、成像。

表 2 引物及 PCR 反应条件

引物名	序列(5'-3')	反应条件
MengChong-1. F	TAGAAAATGGAGCTGGAAGCTGG	95 °C 预变性 5 min, 循环反应 35 次(95 °C 30 s,
MengChong-1. R	ATTCGGTTGGTACAGCAATA	55 °C 30 s, 72 °C 30 s), 72 °C 延伸 5 min, 4 °C 保温
MengChong-Dig. F	CGGTTGATTTAGCAATTTTTTC	95 °C 预变性 5 min, 循环反应 35 次(95 °C 30 s,
MengChong-Dig. R	AAATAAGCTCGTGTATCAACATCTA	55 °C 30 s, 72 °C 30 s), 72 °C 延伸 5 min, 4 °C 保温

2.3.2 RFLP 分析 另取虻虫及其混伪品 PCR 产物进行 RFLP 分析, 酶切反应体系为 20 μL, 包含 10 × Buffer 2 μL、PCR 产物 15 μL、*Dra* I 限制性内切酶 (10 U · μL⁻¹) 0.5 μL、dd H₂O 2.5 μL, 酶切反应在 37 °C 水浴反应 1 h。取 PCR 反应产物 5 μL, 加入 2 μL 6 × Loading buffer (Takara 公司), 混匀后于 Genegreen 染色的 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测、成像。

2.3.3 条件考察 引物 MengChong-Dig. F 和 MengChong-Dig. R 对虻虫及其混伪品进行 PCR 扩增, 使用 *Dra* I 限制性内切酶进行 RFLP 分析, 并分别考察退火温度、PCR 循环数、模板 DNA 浓度、变性和退火时间、Taq 种类、不同 PCR 仪、不同品牌 *Dra* I

限制性内切酶、酶切时间对 PCR 反应稳定性的影响。

3 结果与分析

3.1 虻虫 PCR-RFLP 引物的设计

使用引物 MengChong-1. F 和 MengChong-1. R 扩增虻虫及其伪品东方蜜蜂、西方蜜蜂、熊蜂、胡蜂、家蝇、麻蝇、丽蝇 CO I 序列, 序列比对后进行 SNP-RFLP 分析, 结果表明, 在序列 263-267 位存在 T/C、T/A、A/T 等 SNP 位点, 其中虻虫分别为 T、T、A, 此位点位于 *Dra* I 限制性内切酶识别序列 (5'-TTTAAA-3') 上, 使得虻虫可被切开, 混伪品无法切开, 并且此位点在 CO I 序列唯一, 见图 1。

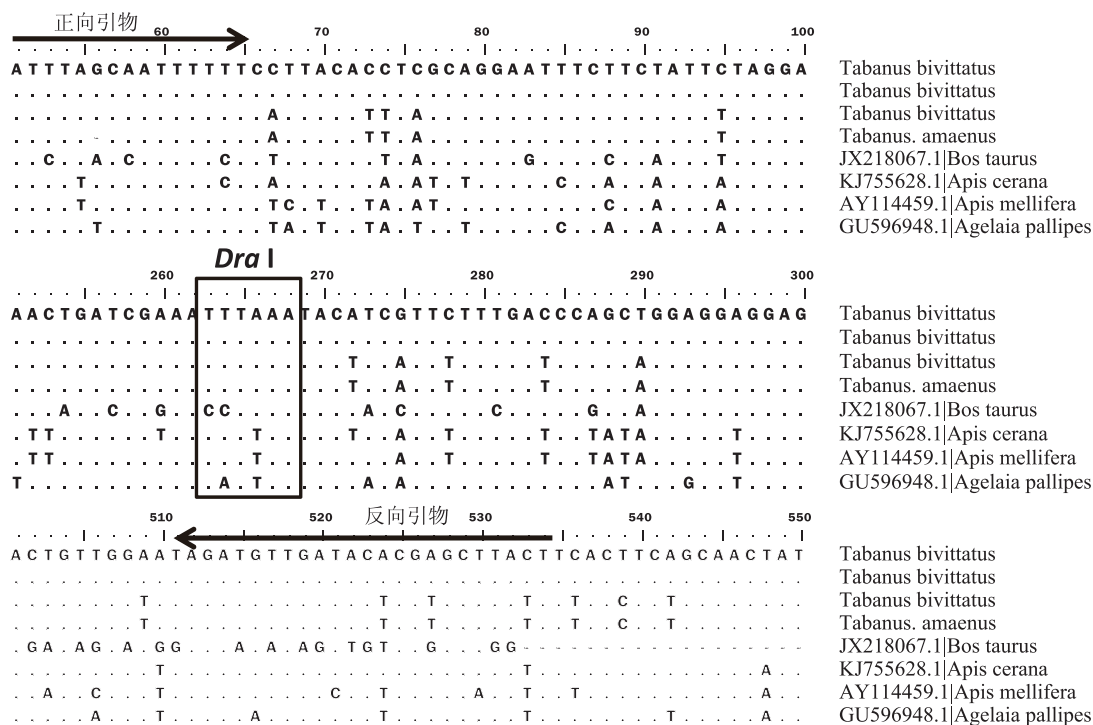


图 1 虻虫 PCR-RFLP 引物设计结果

3.2 虻虫 PCR-RFLP 分析

对12种虻虫及7类伪品使用虻虫鉴别引物进行扩增,正伪品均获得496 bp的扩增产物。利用限制性内切酶 *Dra* I 进行酶切,虻虫序列具TTTAAA酶切位点,而产生265 bp和231 bp的两条条带,伪品因存在SNP位点导致酶切位点丢失,酶切前后条带不变,见图2。



注: M. DL2000 Marker(条带大小自下而上依次为100、250、500、750、1000、2000 bp); 1~4. 复带虻; 5. 广西虻; 6. 类柯虻; 7. 范式斑虻; 8. 中华斑虻; 9. 浪沧江麻虻; 10. 浙江虻; 11. 佛光虻; 12. 原野虻; 13. 杭州虻; 14. 短小瘤虻; 15~16. 中华蜜蜂; 17~18. 意大利蜜蜂; 19. 胡蜂; 20. 熊峰; 21~22. 家蝇; 23. 麻蝇; 24. 丽蝇。

图2 使用PCR鉴别不同批次虻虫

3.3 条件考察

PCR扩增和限制性内切酶酶切均可能影响虻虫鉴别效果,本文对影响PCR扩增的关键因素退火温度、循环数、DNA浓度以及影响酶切结果的限制性内切酶时间等进行系统考察,同时考察筛选的条件对不同Taq DNA聚合酶、不同内切酶及不同PCR扩增仪的耐受性,结果表明,退火温度位于52~58℃,循环数30~40、DNA模板浓度8~200 ng·μL⁻¹、Taq酶用量在0.5~2 U时、酶切时间在15 min~4 h时均可准确鉴别虻虫及其常见伪品,见表3。在此条件下对不同保真度的Taq酶、不同型号PCR仪以及不同品牌*Dra* I限制性内切酶均具有稳健性;退火温度过高(>58℃)、循环数过少(<30)、模板浓度过低(<8 ng·μL⁻¹)易产生假阴性结果;而酶切时间过长则会产生星活性,导致假阳性结果,见表3。

表3 虻虫PCR-RFLP条件考察结果

参数	参数值	适宜范围	最优条件
退火温度/℃	52, 54, 56, 58, 60	52~58	55
PCR循环数	25, 30, 35, 40	30~40	35
模板浓度/ng·μL ⁻¹	1, 8, 40, 200	8~200	40
Taq酶用量/U	0.5, 1, 2	均可使用	2
引物用量/μL	0.1, 0.25, 0.5	0.25~0.5	0.5
Taq酶种类	SpeedStar, Ex Taq, Q5	均可使用	SpeedStar
PCR仪	9700, Veriti, PTC-100	均可使用	Veriti
不同内切酶	NEB, Takara, Thermo	均可使用	NEB
酶切时间/min	15, 30, 120, 240, 过夜	15~240	30

3.4 方法的适用性考察

采用上述确定的优化体系,对102批虻虫样品及41批伪品进行PCR扩增,不同种类、来源虻虫均可产生约490 bp条带,经*Dra* I酶切后,正品均产生大小约为230 bp和260 bp的两条条带,而虻虫伪品均无法酶切,表明该体系能稳定、准确地鉴别虻虫。

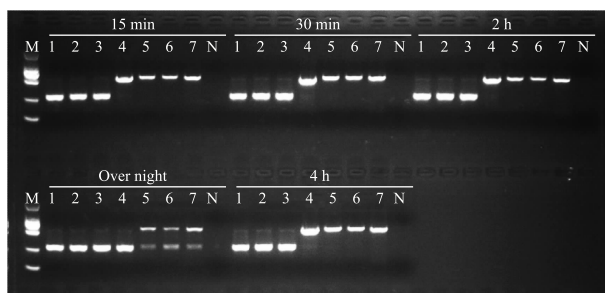
4 分析与讨论

虻虫为少常用药材,历来有多种来源,《中华人民共和国药典》规定的虻虫来源为复带虻等;《全国中草药汇编》规定为复带虻或鹿虻 *T. chrysurus* Loew;《中药大辞典》规定为虻科昆虫复带虻或其他同属昆虫;而《中华本草》则规定为华虻 *T. mandarinus* Schiner及其同属昆虫以及黄虻属双斑黄虻(复带虻)。说明虻虫为多来源性药材,多种虻虫均可入药。随着资源的稀缺,市场上虻虫主流药材基源不断流变,早期以华虻为主流,后发展为华虻、姚虻、复带虻^[3,11]。近期李军德等对全国多个省份商品药材样品鉴定表明,除云南、北京、辽宁、内蒙古约有2%~5%的复带虻 *T. bivittatus* 外,其余主要为汉斯虻、广西虻、杭州虻等^[12]。作者近期对全国几个大型中药市场调查发现,市场及临床使用不区分虻虫种类,伪品主要为中华蜜蜂、意大利蜜蜂、熊峰、麻蝇等形态类似的昆虫,这些昆虫不具有破血消癥的功能,需要与虻虫进行鉴别。为达到准确鉴定虻虫的目的,本研究收集了杭州虻、广西虻等12种市场常见虻虫品种及主要伪品进行DNA分子鉴定研究。

为建立DNA分子鉴别方法,首先需要进行分子标记的获得与筛选。由于虻虫为吸血性昆虫,常吸食牛、马等动物血液,直接使用CO I片段通用引物无法获得虻虫序列。本研究首先设计一对虻虫类特异性引物对虻虫及膜翅目、双翅目部分昆虫进行了CO I基因的扩增和测序,发现仅虻类昆虫含*Dra* I限制性内切酶识别序列,从而建立PCR-RFLP鉴别方法用于虻虫与混伪品的鉴别。为保证PCR-RFLP方法的稳定性,笔者对退火温度、PCR循环次数、DNA浓度、引物用量、DNA聚合酶用量、PCR仪和DNA聚合酶等进行考察,并同时考察了酶切结果的稳定性。结果表明,在长时间酶切的情况(4 h以上)下可能产生星活性,导致伪品出现部分的酶切,但不

会影响判别结果,见图3。使用该方法对市售的73批虻虫进行鉴别均能获得正确的酶切鉴别结果。

本实验将PCR-RFLP方法引入虻虫的真伪鉴别中,表明该技术具有准确、简便、重复性好等特点,能有效鉴别虻虫及其伪品。同时该方法对样品要求低,对炮制、仓储样品均具有良好的鉴别效果,有望成为商品虻虫的特异性鉴别方法。



注: M. DL2000 Marker(条带大小自下而上依次为100、250、500、300、400、500 bp); 1. 复带虻; 2. 广西虻; 3. 中华斑虻; 4. 中华蜜蜂; 5. 胡蜂; 6. 家蝇; 7. 麻蝇; N. 阴性对照(以 dd H₂O 为模板)。

图3 酶切时间对虻虫鉴别结果的影响

参考文献

- [1] 刘大有,徐莉,李莉,等. 虻虫的研究进展[J]. 中草药, 1997,28(7):440-441.
[2] 李军德,黄璐琦,冯学锋,等. 虻虫药材性状显微特征鉴

- 别研究[J]. 中国中药杂志,2010,35(16):2057-2060.
[3] 姜波,赵荣国,高士贤. 五种虻虫药材的性状鉴别[J]. 中药材,1992,15(3):21-24.
[4] 黄璐琦,袁媛,袁庆军,等. 中药分子鉴定发展中的若干问题探讨[J]. 中国中药杂志,2014,39(19):3663-3667.
[5] 黄璐琦,唐仕欢,李军德,等. 动物药材分子鉴定研究策略[J]. 中国中药杂志,2011,36(3):234-236.
[6] 王川易,郭宝林,肖培根. 中药分子鉴定方法评述[J]. 中国中药杂志,2011,36(3):237-242.
[7] 张婷,徐璐珊,王峥涛,等. 药用植物束花石斛、流苏石斛及其形态相似种的PCR-RFLP鉴别研究[J]. 药学学报, 2005,40(8):728-733.
[8] 蒋超,黄璐琦,袁媛,等. 酶切-溶解曲线分析:一种新的SNP分型方法及其在中药材鉴定中的应用[J]. 药学学报,2014,49(4):558-565.
[9] 张学维,马长华,白根本. 塔里木马鹿特异性PCR及PCR-RFLP鉴定[J]. 中华中医药杂志,2011,26(3):570-573.
[10] Jiang C, Yuan Y, Chen M, et al. Molecular authentication of multi-species honeysuckle tablets [J]. Genetic Mol Res, 2013,12(4):4827-4835.
[11] 来复根. 中药虻虫的鉴别[J]. 浙江药学,1986,3(4):13-15.
[12] 李军德,黄璐琦,陈敏,等. 中药虻虫研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(8):228-230.

(收稿日期 2016-08-14)

(上接第15页)

- [21] Sun X Q, Wei Y L, Qin M J, et al. Authentication of an Endangered Herb *Changium smyrnioides* from Different Producing Areas Based on rDNA ITS Sequences and Allele-Specific PCR[J]. Archives of Pharmacal Research,2012,35(4):701-708.
[22] 陈康,蒋超,袁媛,等. 快速PCR方法在蛇类药材真伪鉴别

- 中的应用[J]. 中国中药杂志,2014,39(19):3673-3677.
[23] Han B X, Yuan Y, Huang L Q, et al. Specific PCR identification between *Peucedanum praeruptorum* and *Angelica decursiva* and identification between them and adulterant using DNA barcode[J]. Pharmacognosy Magazine, in press.

(收稿日期 2016-09-02)