

快速分析

基于“遗传标志物”紫河车 DNA 指纹 - 试纸条分子
鉴定方法及试剂的研究*王艳双^{1,3}, 王艺潼², 母润红^{1**}, 张丽华⁴

(1. 北华大学 基础医学院, 吉林 132013; 2. 吉林大学第二医院, 长春 130000; 3. 北华大学吉林省中药 DNA 指纹检测技术科技创新中心, 吉林 132013; 4. 吉林雷宁食品药品检测技术服务有限公司, 吉林 132013)

摘要 目的: 建立中药材紫河车遗传标志物 DNA 指纹 - 免疫胶体金试纸条快速分子鉴定方法, 研发一体化质量控制基因检测试剂盒。方法: 自主研发紫河车模板 DNA 提取的方法及试剂, 根据人 mtDNA cytb 基因设计种属特异性引物, 引物的 5' 端分别用 FAM、Biotin 标记, 筛选 PCR 最佳退火温度及循环次数, 建立 DNA 指纹分子鉴定方法, 研发 PCR 基因检测试剂预混液, 采用分子克隆及基因测序技术制备对照药材 DNA 克隆液, 利用免疫胶体金试纸条进行结果检测, 开发出集“DNA 提取试剂、PCR 基因检测试剂预混液、对照药材 DNA 克隆液、空白对照液、试纸条”为一体的快速基因检测试剂盒, 并进行特异性、重现性、灵敏性、稳定性的评价。结果: 自主研发的 DNA 提取试剂提取的模板 DNA 质量浓度均在 $150 \sim 280 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, 纯度均在 1.8 ~ 1.9, 琼脂糖凝胶电泳无拖尾。紫河车特异性引物在退火温度 $59 \text{ }^\circ\text{C}$ 、循环 20 次时; 免疫胶体金试纸条显示: 紫河车对照药材及正品出现 2 条红色条带, 易混品及空白对照出现 1 条红色的条带。琼脂糖凝胶电泳验证正确。对照药材 DNA 测序结果与人 mtDNA cytb 基因同源性 100%。自主研发的一体化快速基因检测试剂盒的特异性强, 重现性好, 稳定性好, 灵敏度为 $0.1 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 。结论: DNA 指纹 - 免疫胶体金试纸条分子鉴定方法能够特异、准确、快速、可视化地对紫河车的真伪进行鉴定, 一体化快速基因检测试剂盒为紫河车质量控制提供规范化、标准化的检测方式, 更适合现场实地检测, 可普遍推广使用。

关键词: 紫河车; 遗传标志物; 线粒体细胞色素 b 基因; PCR 技术; DNA 指纹; 免疫胶体金试纸条; 一体化试剂盒

中图分类号: R 917 文献标识码: A 文章编号: 0254 - 1793(2024)07 - 1276 - 09

doi: 10.16155/j.0254 - 1793.2023 - 0435

Study on molecular identification methods and reagents “genetic
marker” - based DNA fingerprinting - test strips of human placentophagy*WANG Yan - shuang^{1,3}, WANG Yi - tong², MU Run - hong^{1**}, ZHANG Li - hua⁴

(1. Basic Medicine School, Beihua University, Jilin 132013, China; 2. Second Hospital, Jilin University, Changchun 130000, China;

3. Chinese Medicine DNA Fingerprint Detection Technology Technology Innovation Center, Beihua University, Jilin 132013, China;

4. Jilin Leining Food and Drug Testing Technology Service Co., Ltd., Jilin 132013, China)

Abstract Objective: To establish a rapid molecular identification method for DNA fingerprinting - immunocolloidal

* 吉林省科技发展计划项目(20210401109YY;20210204185YY;20210203054SF); 吉林省科技创新中心建设项目(20190902018TC)

** 通信作者 Tel:18604498352; E-mail:murunhong@126.com

第一作者 Tel:18604498326; E-mail:wangys5521@163.com

gold test strips of Chinese herbal medicine human placentophagy genetic markers and to develop an integrated quality control gene detection kit. **Methods:** Self-developed method and reagents could be for template DNA extraction from human placentophagy. Species-specific primers were designed according to the human mtDNA cytb gene, and the 5' ends of the primers were labeled with FAM and Biotin, respectively. The optimal annealing temperature and cycle number of PCR were screened to establish a DNA fingerprinting molecular identification method. To develop PCR gene detection reagent premixes, to prepare DNA clones of control herbs using molecular cloning and gene sequencing techniques and to utilize immunocolloidal gold test strips for result detection. Finally, a rapid gene detection kit integrating DNA extraction reagent, PCR gene detection reagent premixes, control herb DNA clone solution, blank control solution and test strips was developed, and evaluated for specificity, reproducibility, sensitivity and stability. **Results:** The template DNA extracted by self-developed DNA extraction reagents were all in the concentration of $150 - 280 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, the purities were all in the range of 1.8 - 1.9, and there were no trail in the agarose gel electrophoresis. And the immunocolloidal gold test strips showed two red bands for human placentophagy control herb and authentic product, and one red band for easy-mix product and blank control at annealing temperature of $59 \text{ }^\circ\text{C}$ and 20 cycles for human placentophagy specific primers. The agarose gel electrophoresis was verified to be correct. The DNA sequencing results of the control herbs were 100% homologous with human mtDNA cytb gene. The self-developed integrated rapid gene detection kit was specific, reproducible, stable and sensitive at $0.1 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$. **Conclusion:** The DNA fingerprinting-immunocolloidal gold test strip molecular identification method can specifically, accurately, rapidly and visually identify the authenticity of human placentophagy, and the integrated rapid gene detection kit provides a regulated and standardized testing method for quality control of human placentophagy. Therefore, it is more suitable for on-site field testing and universal promotion.

Keywords: Placenta Hominis; genetic marker; mitochondrial cytochrome b; PCR technique; DNA fingerprinting; immunocolloidal gold test strip; integrated reagent kit

紫河车,为健康产妇娩出之胎盘。具有温肾补精,益气养血的功效,用于虚劳羸瘦,阳痿遗精,久咳虚喘,面色萎黄,食少气短。由于紫河车来源紧张,价格不菲,因此市面上出现用羊胎盘、猪胎盘等充当紫河车的现象^[1],普通消费者很难从外观进行准确识别。而且临床一般使用紫河车粉入药,不仅给掺假提供了机会,同时也增加了检测方法的难度,严重影响临床用药的有效性。2010年版《中华人民共和国药典》(以下简称《中国药典》)一部仅记载了“性状”项,也许由于检测的标准太低,主观性强,专属性差,2015年版《中国药典》一部不再收载紫河车,目前没有国家质量标准。

中药质量控制是传统中医药得到现代化和全球化发展的前提。中药质量标志物(Q-marker)由2016年刘昌孝院士提出^[2]。随着分子生物学技术的发展,学者们逐渐认识到物种的差异归根结底是遗传物质DNA的差异,中药材的质量鉴定从最初通过

感官、显微、理化等方面,逐步走向分子鉴定方向。

DNA指纹多采用聚合酶链式反应(PCR)技术对多种生物样品进行人工合成不同的DNA片段,片段的大小和数量在不同生物间不相同,对每一个体的分析都是相对独特的^[3],近年来这种基于遗传标志物的技术在遗传分析、鉴定种质等方面得到广泛应用^[4]。2020年版《中国药典》一部收录了川贝母、蕲蛇、乌梢蛇以及金钱白花蛇^[5]的PCR分子鉴定方法,本团队已经建立了貂心、兔睾丸、鹿心、乳鹿、鹿茸、鹿胎、阿胶^[6-15]等PCR快速鉴定方法。但结果都是利用琼脂糖凝胶电泳来检测,费时费力费钱,需要贵重仪器的配合。而免疫胶体金试纸条是一种快速的免疫学测定方法,具有简单、快速,可视化,低成本等特点,不需要贵重仪器的配合,在中药材紫河车真伪鉴定中目前未见文献报道。本研究从DNA水平为紫河车的真伪鉴定提供一种特异灵敏的鉴定方法,为紫河车质量标准的制定提供理论基础,并研发一

体化快速检测试剂盒,适合普遍推广应用。

1 材料与仪器

1.1 材料

紫河车对照药材(批号 121567-201202),购自中国食品药品检定研究院;紫河车正品 1~5(20200026~20200030),由吉林市食品药品检验所提供;易混品鹿、猪、马、牛、羊、驴、狗胎盘,由吉林雷宁食品药品检测技术有限公司提供。

1.2 仪器

D3024R 高速冷冻离心机(SCILOGEX 公司);D1008E 掌上离心机(大龙创兴实验仪器有限公司);T100 PCR 仪(BIORAD 公司);JY300E 电泳仪、JY-SPCT 电泳槽(北京君意东方电泳设备有限公司);2020D 紫外凝胶成像分析仪(BIORAD 公司);6000+ 微量核酸蛋白分析仪(QUAWELL 公司);CP214 万分之一电子天平(奥豪斯仪器有限公司);ZKW-C 恒温水浴锅(上海树立仪器仪表有限公司)。

1.3 试剂

2 × Taq PCR Master Mix、λDNA/*Hind* III、DNA 凝胶回收试剂盒、pGM-T 载体连接试剂盒、DH5α 感受态细胞、质粒 DNA 小量提取试剂盒、Amp、X-Gal、IPTG、6 × DNA 上样缓冲液,北京天根生化科技有限公司;100 bp Marker I,北京鼎国生物技术有限公司;引物,上海生物工程技术有限公司合成。免疫胶体金试纸条,武汉君诺德生物技术有限公司。

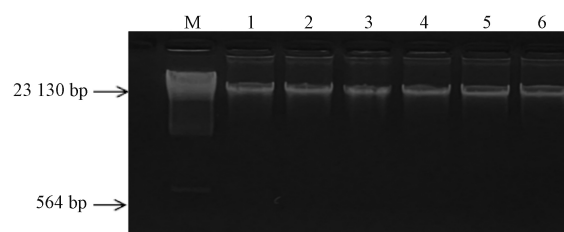
2 方法与结果

2.1 筛选模板 DNA 提取方法及试剂

2.1.1 自主研发的试剂提取模板 DNA 随机取各物种胎盘样品 5 g,研磨成粉末后各取 100 mg 置于 1.5 mL 离心管中。加入细胞裂解缓冲液 P1 [10% 十二烷基磺酸钠(SDS) 10 mL, 1 mol · L⁻¹ 三羟甲基氨基甲烷盐酸盐(Tris-HCl, pH 7.5) 1 mL, 0.5 mol · L⁻¹ 乙二胺四乙酸(EDTA, pH 8.0) 2 mL, 氯化钠(NaCl) 0.58 g, 20 mg · mL⁻¹ 蛋白酶 K(PK) 1 mL, RNA 酶(RNase) 5 μL, 加灭菌 ddH₂O 定容至 100 mL] 500 μL, 充分混匀, 55 °C 水浴 1 h。室温冷却后倒入 DNA 层析柱中, 10 000 r · min⁻¹ 离心 3 min, 弃去过滤液。层析柱放回, 加入漂洗缓冲液 P2 [5 mol · L⁻¹ 乙酸钾(KAc) 26 μL, 1 mol · L⁻¹ Tris-HCl (pH 7.5) 18 μL, 0.5 mol · L⁻¹ EDTA (pH 8.0) 3 μL, 无水乙醇 480 μL, 无菌 ddH₂O 73 μL] 600 μL, 10 000 r · min⁻¹ 离心 1 min, 弃去过滤液。重复漂洗 1 次, 弃去过滤液。层

析柱放回, 10 000 r · min⁻¹ 离心 2 min。将层析柱转入另一干净离心管中, 加入 100 μL 溶解液 P3 (无菌 ddH₂O), 室温放置 20 min 后, 10 000 r · min⁻¹ 离心 2 min; 离心液即各物种胎盘模板 DNA 溶液, 置 -20 °C 保存备用。另取紫河车对照药材 100 mg, 同法制成阳性对照药材模板 DNA 溶液。

2.1.2 模板 DNA 的完整性、纯度和浓度的鉴定 取各物种胎盘模板 DNA 溶液 1 μL, 利用微量核酸蛋白分析仪检测 260 和 280 nm 处的吸收度, 所有样品的 DNA 质量浓度均在 150~280 ng · μL⁻¹, 纯度均在 1.8~1.9, 满足 PCR 实验要求。取各物种胎盘模板 DNA 溶液 10 μL, 与 6 × DNA 上样缓冲液 2 μL 混匀后, 在 GelRed 染色的 0.8% 的琼脂糖凝胶中电泳, 结果显示, 模板 DNA 扩增条带更清晰明亮, 无拖尾, 完整性很好(见图 1)。表明自主研发的 DNA 提取试剂较好。



M. λDNA/*Hind* III Marker 1. 紫河车对照药材(Placenta Homini contrast medicinal materials) 2. 正品 1 (authentic product 1) 3. 正品 2 (authentic product 2) 4. 正品 3 (authentic product 3) 5. 正品 4 (authentic product 4) 6. 正品 5 (authentic product 5)

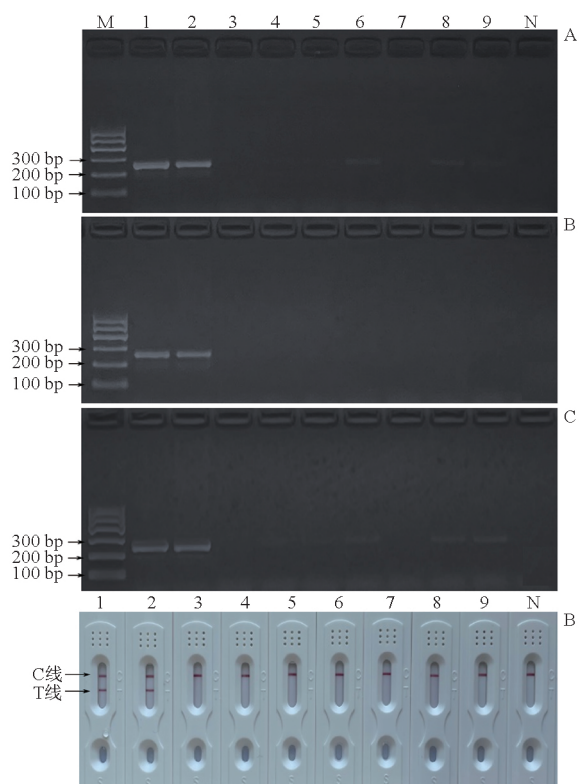
图 1 自主研发试剂提取的模板 DNA 图谱

Fig. 1 Template DNA map extracted with self-developed reagents

2.2 优化 DNA 指纹分子鉴定方法及基因检测试剂

2.2.1 PCR 特异性引物的设计与合成 在 NCBI 数据库中搜索人 mtDNA Cytb 基因序列(序列号: NC-012920.1), 设计特异性引物并进行标记。引物序列及标记物为 F: 5' (FAM) - GAATGATATTCCTAT-TCGC - 3'; R: 5' (Biotin) - TACTTGTCCAATGATGG-TAA - 3'。扩增片段长度为 249 bp。

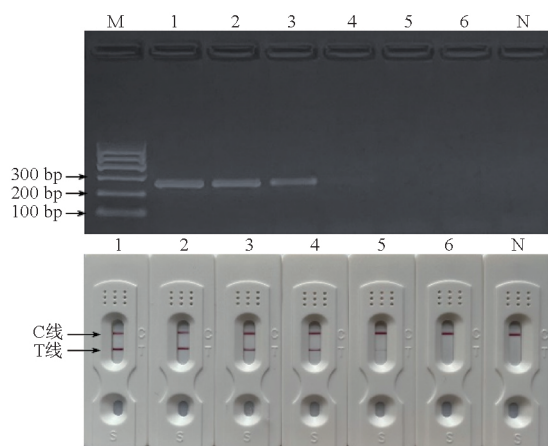
2.2.2 PCR 反应体系及反应条件优化 使用紫河车的特异性引物, 在退火温度为 59 °C, 循环次数为 20 次条件下对紫河车对照药材及正品进行 PCR 扩增, 琼脂糖凝胶电泳结果显示, 紫河车对照药材及正品均出现 1 条 249 bp 的特异性扩增条带, 而易混品及空白对照均未出现条带, 免疫胶体金试纸条结果显示, 紫河车对照药材及正品均出现 2 条红色条带, 而易混品及空白对照均出现 1 条红色条带(见图 2、3)。



M. 100 bp DNA Marker I 1. 紫河车对照药材 (Placenta Hominis contrast medicinal materials) 2. 紫河车正品 (Placenta Hominis Authentic product I) 3. 鹿胎盘 (Placental deer) 4. 猪胎盘 (Placental pig) 5. 马胎盘 (Placental horse) 6. 牛胎盘 (Placental cattle) 7. 羊胎盘 (Placental sheep) 8. 驴胎盘 (Placental donkey) 9. 狗胎盘 (Placental dog) N. 空白对照 (blank control)
A. 58 °C B. 59 °C C. 60 °C

图2 退火温度筛选图谱

Fig. 2 Maps of annealing temperature screening



M. 100 bp DNA Marker I 1. 30次循环 (30 cycles) 2. 25次循环 (25 cycles) 3. 20次循环 (20 cycles) 4. 15次循环 (15 cycles) 5. 10次循环 (10 cycles) 6. 5次循环 (5 cycles) N. 空白对照 (blank control)

图3 循环次数筛选图谱

Fig. 3 Maps of cycle times screening

因此,建立了紫河车 DNA 指纹分子鉴定方法,确定 PCR 最佳反应条件为 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 30 s, 59 °C 30 s, 72 °C 30 s 循环次数 20 次; 充分延伸 72 °C 5 min。确定最佳 PCR 基因检测试剂为 23 μL 预混液,包括 2 × Taq PCR Master Mix 12.5 μL,紫河车上下游引物 (10 μmol · L⁻¹) 各 1 μL,灭菌 ddH₂O 8.5 μL。

2.3 紫河车对照药材 DNA 的分子克隆及基因测序

取 PCR 扩增产物 50 μL 进行琼脂糖凝胶电泳,结束后紫外透射仪内切下 DNA 条带并称量,凝胶回收试剂盒回收目的基因;将目的基因与 pGM-T 载体连接,16 °C 水浴过夜,组成重组 DNA 分子;次日碎冰上将重组 DNA 分子转入 DH5α 感受态细胞中,37 °C 恒温箱中培养,增殖 4 h 后取菌液 30 μL 涂布于含 Amp、X-Gal 和 IPTG 的 LB 固体培养基上,37 °C 恒温箱中培养过夜,进行蓝-白斑筛选阳性重组 DNA 分子;次日挑选阳性白色菌落,接种到含 Amp 的 LB 液体培养基中 37 °C 恒温培养 12~16 h;次日提取质粒 DNA 进行 PCR 扩增验证为阳性重组体,送至上海生工进行基因测序。

分子克隆可见氨苄阳性平皿出现蓝-白菌落 (见图 4)。以白色菌落质粒 DNA 为模板,退火温度 59 °C、20 次循环进行 PCR 扩增,琼脂糖凝胶电泳显示在 249 bp 有 1 条特异性 DNA 条带 (见图 5)。序列比对结果显示扩增区域 DNA 序列与人 mtDNA Cytb 基因特异性指纹区段 DNA 序列完全一致,同源性为 100% (见图 6)。成功制备出紫河车对照药材 DNA 克隆液。

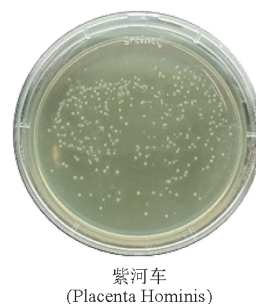
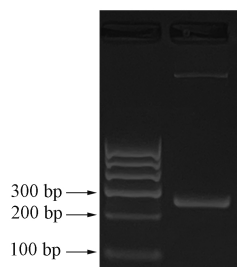


图4 分子克隆蓝-白斑筛选图谱

Fig. 4 Map of molecular cloning blue-white selection

2.4 紫河车 DNA 指纹-试纸条快速检测试剂盒的设计

试剂盒为 20 次用量,由 8 个部分组成,包括 DNA 提取试剂、PCR 基因检测试剂、对照药材 DNA 克隆液、空白对照液、结果检测试纸条 (见表 1)。



M. 100 bp DNA marker I 1. 紫河车阳性对照 (Placenta Hominis contrast medicinal materials)

图 5 质粒 DNA PCR 图谱

Fig. 5 PCR map of plasmid DNA

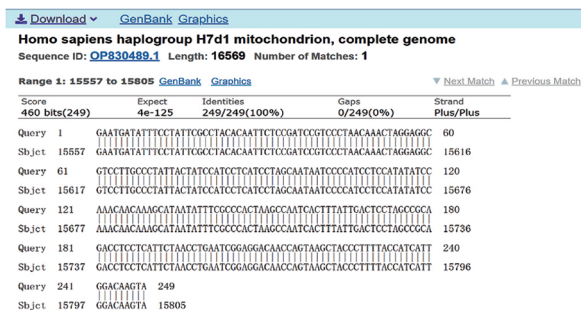


图 6 紫河车质粒 DNA 测序与人 mtDNA cytb 基因比对结果

Fig. 6 Comparison results of plasmid DNA sequencing of Placenta Hominis and mtDNA cytb gene of homo

表 1 自主研发紫河车 DNA 指纹 - 免疫胶体金试纸条检测试剂盒的组成及特征

Tab. 1 Composition and characteristics of self-developed Placenta Hominis DNA fingerprint - immunocolloidal gold test strip test kit

试剂 (reagent)	编号名称 (name)	数量 (quantity)	作用 (effect)	保存 (preserve)
DNA 提取试剂 (DNA extraction reagent)	P1 溶液 (P1 solution)	12 mL	释放 DNA (release DNA)	-20 °C
	P2 溶液 (P2 solution)	25 mL	分离 DNA (separate DNA)	-20 °C
	P3 溶液 (P3 solution)	5 mL	溶解 DNA (dissolve DNA)	-20 °C
	DNA 层析柱 (DNA chromatography column)	20 个 (20 pieces)	纯化 DNA (purify DNA)	室温 (room temperature)
PCR 检测试剂 (PCR detection reagent)	PCR 预混液 (PCR premix)	23 μL × 20 个 (23 μL × 20 pieces)	PCR 反应体系 (PCR reaction system)	-20 °C
阳性对照试剂 (positive control reagent)	对照品 DNA 克隆液 (reference substance DNA cloning solution)	40 μL	阳性对照 (positive control)	-20 °C
空白对照试剂 (blank control reagent)	空白对照液 (blank control solution)	40 μL	空白对照 (blank control)	-20 °C
结果检测试剂 (result detection reagent)	试纸条 (immunocolloidal gold test strip)	20 个 (20 pieces)	结果检测 (result detection)	室温 (room temperature)

2.5 试剂盒的评价

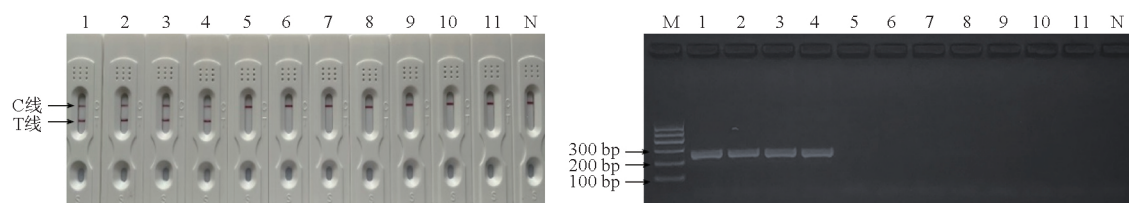
2.5.1 特异性 紫河车对照药材 DNA 克隆液、对照药材、正品及其易混品在 59 °C、20 个循环条件下进行 PCR 扩增, 试纸条检测结果显示, 紫河车对照药材 DNA 克隆液、对照药材、正品均出现 2 条红色条带, 阴性对照及空白对照均出现 1 条红色条带。琼脂糖凝胶电泳验证结果正确 (见图 7)。表明自主研发的试剂盒特异性强。

2.5.2 重现性 紫河车对照药材 DNA 克隆液、对照药材、正品及其易混品分别在 3 个实验室, 由 3 位技术人员在 59 °C、20 个循环条件下进行 PCR 扩增, 试纸条检测结果显示, 紫河车对照药材 DNA 克隆液、对照药材、正品均出现 2 条红色条带, 阴性对照及空白对照均出现 1 条红色条带。琼脂糖凝胶电泳验证结果正确 (见图 8)。表明自主研发的试剂盒重现性

良好。

2.5.3 稳定性 分别在试剂盒配制后第 3 个月、6 个月、9 个月和 12 个月对相同样品进行检测, 试纸条检测结果显示, 紫河车对照药材 DNA 克隆液、对照药材、正品出现 2 条红色条带, 空白对照出现 1 条红色条带。琼脂糖凝胶电泳验证结果正确 (见图 9)。表明自主研发的试剂盒稳定性良好。

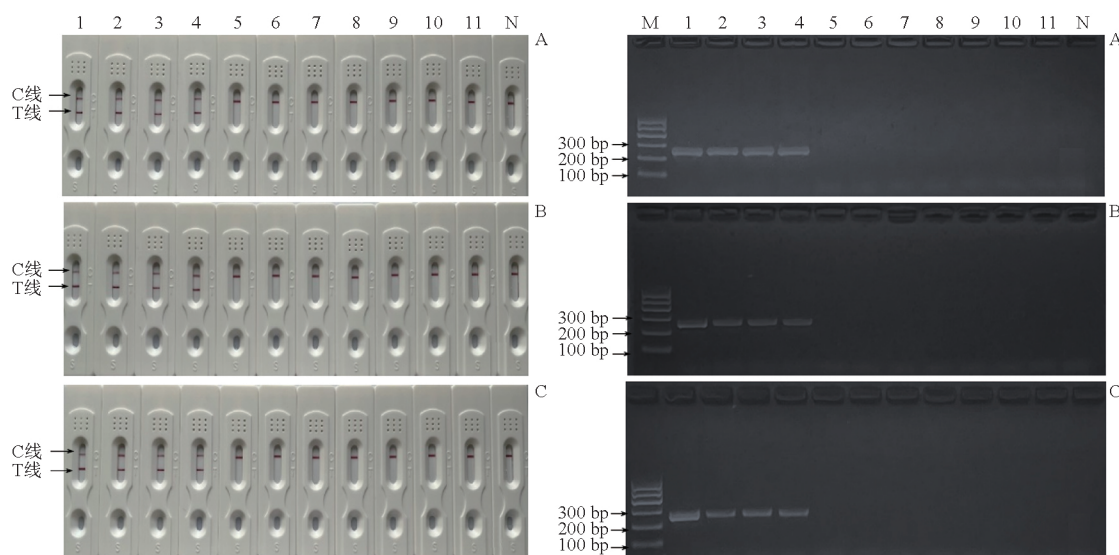
2.5.4 灵敏性 对紫河车对照药材模板 DNA 溶液 100 ng · μL⁻¹ 分别用灭菌 ddH₂O 进行 10 倍、100 倍、1 000 倍、10 000 倍稀释, PCR 扩增后, 试纸条结果显示, 模板 DNA 溶液 0.1 ng · μL⁻¹ 时, 仍可见 2 条红色条带。而琼脂糖凝胶电泳结果显示, 模板 DNA 溶液 1 ng · μL⁻¹ 时, 仍可见特异性扩增条带, 0.1 ng · μL⁻¹ 时, 无特异性扩增条带。表明核酸试纸条法的灵敏度比琼脂糖凝胶电泳法高 10 倍 (见图 10)。



M. 100 bp DNA Marker I 1. 紫河车对照药材 DNA 克隆液 (DNA cloning solution of Placenta Hominis contrast medicinal materials) 2. 紫河车对照药材 (Placenta Hominis contrast medicinal materials) 3. 紫河车正品 1 (Placenta Hominis Authentic product 1) 4. 紫河车正品 2 (Placenta Hominis Authentic product 2) 5. 鹿胎盘 (Placental deer) 6. 猪胎盘 (Placental pig) 7. 马胎盘 (Placental horse) 8. 牛胎盘 (Placental cattle) 9. 羊胎盘 (Placental sheep) 10. 驴胎盘 (Placental donkey) 11. 狗胎盘 (Placental dog) N. 空白对照 (blank control)

图 7 试剂盒特异性图谱

Fig. 7 Specificity maps of reagent kit



M. 100 bp DNA Marker I 1. 紫河车对照药材 DNA 克隆液 (DNA cloning solution of Placenta Hominis contrast medicinal materials) 2. 紫河车对照药材 (Placenta Hominis contrast medicinal materials) 3. 紫河车正品 1 (Placenta Hominis Authentic product 1) 4. 紫河车正品 2 (Placenta Hominis Authentic product 2) 5. 鹿胎盘 (Placental deer) 6. 猪胎盘 (Placental pig) 7. 马胎盘 (Placental horse) 8. 牛胎盘 (Placental cattle) 9. 羊胎盘 (Placental sheep) 10. 驴胎盘 (Placental donkey) 11. 狗胎盘 (Placental dog) N. 空白对照 (blank control)

A. 吉林雷宁食品药品检测技术服务有限公司 (Jilin Leining Food and Drug Testing Technology Service Co., Ltd.) B. 北华大学 DNA 指纹研发实验室 (DNA Fingerprint Research and Development Laboratory of Beihua University) C. 吉林省中药 DNA 指纹检测技术科技创新中心 (Jilin Province Traditional Chinese Medicine DNA Fingerprint Detection Technology Innovation Center)

图 8 试剂盒重现性图谱

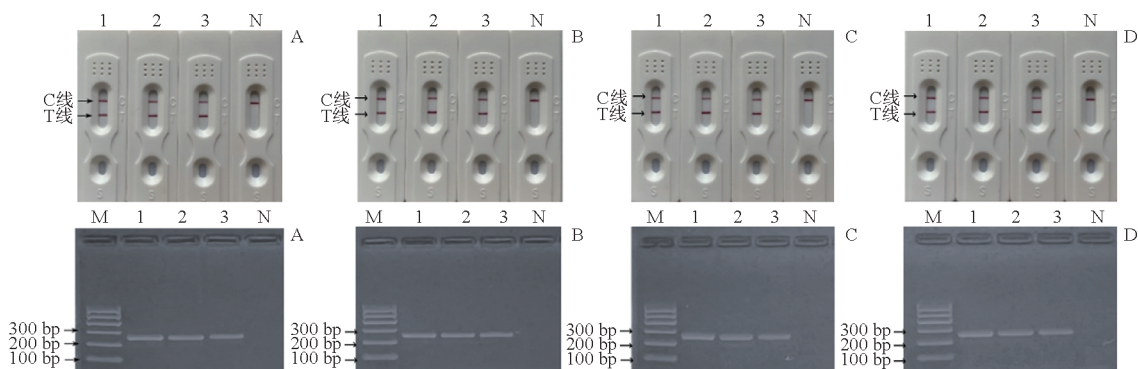
Fig. 8 Reproducibility maps of reagent kit

2.6 紫河车 PCR - 试纸条快速检测试剂盒对实际样品的检测

使用自主研发的试剂盒,对吉林雷宁食品药品检测技术服务有限公司提供的 9 个紫河车样品进行模板 DNA 的提取,59 °C、20 个循环条件下进行 PCR 扩增,试纸条检测结果显示,紫河车对照药材 DNA 克隆液、对照药材及各样品均出现 2 条红色条带,空白对照出现 1 条红色条带。琼脂糖凝胶电泳验证结果正确 (见图 11)。表明各样品均为正品。

3 讨论

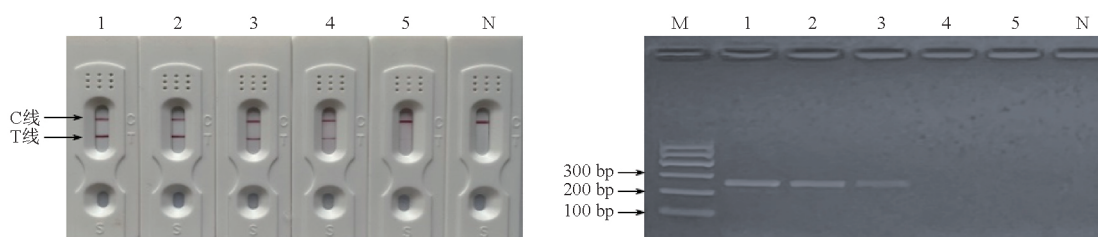
紫河车为较常用的中药材,始载于《本草拾遗》,为人出生时所脱掉的胎盘,经过加工干燥而成。中西方均有将紫河车作为保健养生用品的史料记载。目前,以紫河车为原料药的中成药有河车八味丸、河车大造丸、紫河车胶囊、胎产金丹等,并且,紫河车也是临床汤剂的常用药,疗效确切,但由于来源有限,因此以假乱真现象严重。现代研究表明,人胎盘中含有多种生物活性成分,激素类如人绒毛膜



M. 100 bp DNA Marker I 1. 紫河车对照药材 DNA 克隆液 (DNA cloning solution of Placenta Hominis contrast medicinal materials) 2. 紫河车对照药材 (Placenta Hominis contrast medicinal materials) 3. 紫河车正品 (Placenta Hominis Authentic product) N. 空白对照 (blank control)
A. 3 个月 (3 months) B. 6 个月 (6 months) C. 9 个月 (9 months) D. 12 个月 (12 months)

图 9 试剂盒稳定性图谱

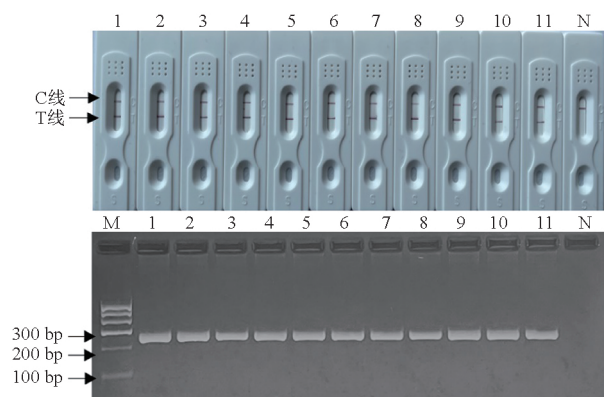
Fig. 9 Stability maps of reagent kit



M. 100 bp DNA Marker I 1. $100 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 2. $10 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 3. $1 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 4. $0.1 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 5. $0.01 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ N. 空白对照 (blank control)

图 10 试剂盒灵敏度图谱

Fig. 10 Sensitivity maps of reagent kit



M. 100 bp DNA Marker I 1. 紫河车对照药材 DNA 克隆液 (DNA cloning solution of Placenta Hominis contrast medicinal materials) 2. 紫河车对照药材 (Placenta Hominis contrast medicinal materials) 3~11. 紫河车样品 1~9 (Placenta Hominis sample 1~9) N. 空白对照 (blank control)

图 11 试剂盒对实际样品检测图谱

Fig. 11 Testing maps of actual samples by reagent kit

促性腺激素 (HCG)、促性腺激素释放激素 (GnRH) 等, 还有酶及酶抑制因子、糖蛋白等^[16], 牛、猪胎盘的

促绒毛膜性腺激素、雌激素、孕激素及促乳素等都与人的有一定差异^[17], 人胎盘中孕酮、HCG、人胎盘泌乳素 (HPL) 的含量分别为牛和猪胎盘的 10 倍、100 倍、300 倍左右^[18]。从上述基础化学物质的区别上看, 动物胎盘与紫河车的功效完全不同。迄今为止, 国内对紫河车真伪鉴别方法的报道较多, 主要有高效毛细管电泳法、聚丙烯酰胺凝胶电泳法、硫酸盐沉淀法等^[19-21], 但都在专属性、重现性或稳定性方面存在一定的缺陷, 而未能被广泛应用。因此, 建立专属性强, 重现性及稳定性均好, 简单快速的紫河车真伪鉴定方法, 才能确保临床用药的有效性及安全性。

DNA 是遗传信息的携带者, 不同种生物体种含有的 DNA 序列是不同的, 而同种生物体中, DNA 的多态性又使各个体存在差异, 因此从分子水平上检测遗传标记物 DNA, 不易受年龄、环境、采收、储存、加工方式等的影响, 最能从本质上反映中药材的自身特征, 使中药的鉴别结果更加准确可信。本研究基于遗传标志物建立的紫河车 DNA 指纹-免疫胶体金试纸条快速鉴定方法, 通过设计人的特异性引

物,利用 PCR 技术只能扩增出紫河车的特异性 DNA 片段,具有专属性强及灵敏度高的特点,PCR 扩增产物采用免疫胶体金试纸条进行检测,具有简单快速、稳定可靠、低成本、可视化优势。传统的试纸条检测是基于蛋白质水平,容易出现假阴性,本方法通过强特异、超灵敏的 PCR 技术,从遗传物质 DNA 水平鉴定紫河车的真伪,弥补了单一试纸条检测容易出现假阴性的缺点,从源头控制紫河车的质量,保证临床用药的有效性和安全性。

为了使鉴定方法能够规范地普遍应用,本研究研发了一体化基因质量控制试剂盒,从 DNA 提取、PCR 扩增、对照药材与产物检测 4 个模块进行优化和筛选,以保证在结果准确可靠的前提下,尽量操作简便、快速、规范、标准。一模块优化:提供了 DNA 提取的全部试剂,只需 3 步即可简便、快速提取出线粒体 DNA,并且质量高,与市售试剂盒相比较至少节省 2 h。二模块优化:制备了 PCR 基因检测试剂为 23 μL 的预混液,包括紫河车上下游引物(10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)各 1 μL , 2 \times Taq PCR Master Mix 12.5 μL , 灭菌 ddH₂O 8.5 μL 。操作者只需将提取的基因组 DNA 2 μL 加入 PCR 基因检测试剂预混液中,混匀后即可进行 PCR 扩增。并且经过反复试验,试剂的特异性、稳定性、重现性均非常好,灵敏度为琼脂糖凝胶电泳的 10 倍。并且解决了 PCR 扩增成败的关键即特异性引物的设计问题,PCR 基因检测预混液中含有最佳浓度、最佳退火温度、循环次数的特异性引物。扩增程序:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,59 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s 循环次数 20 次;充分延伸 72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min。节省了引物设计、订购合成、筛选反应条件的时间至少 1 周。三模块优化:制备了紫河车对照药材 DNA 克隆液,直接反映了紫河车独一无二 DNA 序列,并且以重组质粒的形式长期储存,取之不尽用之不竭,省时省力省钱省药材。四模块优化:采用免疫胶体金试纸条进行结果检测,不需要贵重仪器配合,2~3 min 即可出现可视化结果,快速灵敏,与琼脂糖凝胶电泳相比较,至少节省 2 h。本方法为单重 PCR-试纸条,一次只能鉴定紫河车的真伪,后续将开展多重 PCR-试纸条,实现紫河车的高通量掺假鉴定。

本研究具有 PCR 技术特异性高,灵敏度强的特点,具有免疫胶体金试纸条低成本,可视化优势,具有试剂盒规范化、标准化特征。在普通实验室、普通操作人员即可完成紫河车的真伪鉴定,从源头上控

制中药材紫河车的质量,对于保障临床用药的有效性、安全性,保障中药材、中成药的生产和中药产业的健康发展都具有重要意义。

参考文献

- [1] 刘玉芹,石俊英,吕鹏月. 紫河车及其混淆品的鉴别研究[J]. 中国药学杂志, 1998, 33(10): 585
LIU YQ, SHI JY, LÜ PY, *et al.* Studies on identification of Placenta Hominis and its adulterants[J]. Chin Pharm J, 1998, 33(10): 585
- [2] 刘昌孝,陈士林,肖小河,等. 中药质量标志物(Q-Marker): 中药产品质量控制的新概念[J]. 中草药, 2016, 47(9): 1443
LIU CX, CHEN SL, XIAO XH, *et al.* A new concept on quality marker of Chinese materia medica: quality control for Chinese medicinal products[J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2016, 47(9): 1443
- [3] JEFFREYS AJ, WILSON V, THEIN SL. Hypervariable minisatellite regions in human DNA[J]. Nature, 1985, 314(7): 67
- [4] 吴幼,赵秦,张晓瑜,等. DNA 指纹图谱技术应用于中药品质鉴定的研究进展[J]. 中兽医医药杂志, 2008, 27(1): 24
WU Y, ZHAO Q, ZHANG XY, *et al.* Advances in characterization of traditional Chinese medicines by DNA fingerprinting technology[J]. J Tradit Chin Vet Med, 2008, 27(1): 24
- [5] 中华人民共和国药典 2020 年版. 一部[S]. 2020: 38, 388, 80, 229
ChP 2020. Vol I [S]. 2020: 38, 388, 80, 229
- [6] WANG YS, YUAN GX, ZHANG LH, *et al.* Establishment of mink heart identification method based on mitochondrial cytochrome b gene and development of its detection kit[J]. Mitochondrial DNA A DNA Mapp Seq Anal, 2019, 30(2): 325
- [7] 王艳双,姜海瀛,李坦诚,等. 基于 mt DNA cytb 基因兔睾丸鉴定方法的建立及检测试剂盒的研制[J]. 药物分析杂志, 2020, 40(8): 1376
WANG YS, JIANG HY, LI TC, *et al.* Establishment of a rabbit testis identification method based on mt DNA cytb gene and the development of its detection kit[J]. Chin J Pharm Anal, 2020, 40(8): 1376
- [8] 王艳双,姜海瀛,刘美琳,等. 中药材鹿心分子鉴定方法及检测试剂研究[J]. 中草药, 2021, 52(2): 544
WANG YS, JIANG HY, LIU ML, *et al.* Study on molecular identification method and detection reagent of Chinese medicinal materials deer heart[J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2021, 52(2): 544
- [9] 王艳双,姜海瀛,苑广信,等. 乳鹿分子身份证快速鉴定方法及检测试剂的研究[J]. 中国药学杂志, 2020, 14(21): 1787
WANG YS, JIANG HY, YUAN GX, *et al.* Establishment of fast identification method for lactica cervi molecule ID and development of detection kit[J]. Chin Pharm J, 2020, 14(21): 1787
- [10] 高丽君,何程远,李盈诺,等. 基于双重 PCR 技术的鹿茸及

- 其伪品 DNA 指纹特征和鉴定[J]. 吉林大学学报(医学版), 2018, 44(4): 839
- GAO LJ, HE CY, LI YN, *et al.* Characteristics and identification of DNA fingerprint of velvetantler and its counterfeits based on duplex PCR technique[J]. *J Jilin Univ (Med Ed)*, 2018, 44(4): 839
- [11] 徐岩, 邵博宇, 高丽君, 等. 应用 PCR-RFLP 方法鉴定梅花鹿茸与马鹿茸[J]. 中国药学杂志, 2020, 55(24): 2021
- XU Y, SHAO BY, GAO LJ, *et al.* An experimental study on the identification of sika deer antler and cervus pilose antler by PCR-RFLP[J]. *Chin Pharm J*, 2020, 55(24): 2021
- [12] 徐岩, 翟英男, 高丽君, 等. 鹿茸 DNA 检测试剂盒的研制与评价[J]. 中国药学杂志, 2020, 55(11): 889
- XU Y, ZHAI YN, GAO LJ, *et al.* Development and evaluation of antler DNA detection kit[J]. *Chin Pharm J*, 2020, 55(11): 889
- [13] 艾金霞, 李明成, 夏薇, 等. 鹿胎 DNA 检测试剂盒的研制与评价[J]. 中国药学杂志, 2018, 53(4): 306
- AI JX, LI MC, XIA W, *et al.* Development and evaluation of DNA detection kit for fetus cervi[J]. *Chin Pharm J*, 2018, 53(4): 306
- [14] 陈思秀, 刘玟妍, 孙丽媛, 等. 驴源性 DNA 检测试剂盒的研制与评价[J]. 中国畜牧杂志, 2018, 54(8): 121
- CHEN SX, LIU WY, SUN LY, *et al.* Development and evaluation of donkey derived DNA detection kit[J]. *Chin J Anim Sci*, 2018, 54(8): 121
- [15] 陈思秀, 张鑫芳, 孙丽媛, 等. 阿胶中动物源性 DNA 提取方法的改进及驴源性成分鉴定[J]. 中国药学杂志, 2019, 54(22): 1840
- CHEN SX, ZHANG XF, SUN LY, *et al.* Improvement of extraction method of animal-derived DNA from Colla Corii Asini and identification of donkey-derived components[J]. *Chin Pharm J*, 2019, 54(22): 1840
- [16] 黄洁, 王钊, 李晓波. 胎盘生物活性物质和质量控制的研究进展[J]. 中药材, 2001, 24(11): 833
- HUANG J, WANG Z, LI XB. Research progress on placental bioactive substances and quality control[J]. *J Chin Med Mater*, 2001, 24(11): 833
- [17] 吴凌, 李金香, 王国良, 等. 人和动物胎盘药理作用和临床应用的研究进展[J]. 黑龙江八一农垦大学学报, 2001, 13(2): 68
- WU L, LI JX, WANG GL, *et al.* The evolution on pharmacological effect and clinic application of domestic animals and human placenta[J]. *J Heilongjiang Bayi Agric Univ*, 2001, 13(2): 68
- [18] 张立君, 乔传卓. 中药紫河车和几种动物胎盘及其加工品中孕酮、HCG、HPL 的含量比较[J]. 第二军医大学学报, 1994, 15(2): 187
- ZHANG LJ, QIAO CZ. Comparison of the contents of progesterone, HCG and HPL in human placentophagy, several animal placentas and their processed products[J]. *Acad J Second Mil Med Univ*, 1994, 15(2): 187
- [19] 古今, 刘萍, 李外. 紫河车及其伪品羊胎盘的高效毛细管电泳鉴别[J]. 军医进修学院学报, 2006, 27(1): 46
- GU J, LIU P, LI W. Study on identification of Placenta Hominis and pseudoplacenta with high performance capillary electrophoresis[J]. *Acad J PLA Postgrad Med School*, 2006, 27(1): 46
- [20] 李峰, 孙娟, 康廷国, 等. 紫河车的凝胶电泳鉴别研究[J]. 中草药, 2003, 34(6): 570
- LI F, SUN J, KANG TG, *et al.* Identification of Human placentophagy by gel electrophoresis[J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2003, 34(6): 570
- [21] 孟祥松, 简冬明, 蒋磊, 等. 市售紫河车商品的质量分析与鉴别[J]. 中外健康文摘, 2012, 9(17): 66
- MENG XS, JIAN DM, JIANG L, *et al.* Quality analysis and identification of commercial human placentophagy[J]. *World Health Digest*, 2012, 9(17): 66

(本文于 2024 年 5 月 30 日修改回)