

安全监测

土鳖虫(地鳖)配方颗粒的特异性 PCR 鉴别研究

刘闪闪, 谭斯尹, 宋叶, 洗乐尧, 范耀耀, 罗宇琴, 李国卫*

(广东一方制药有限公司 广东省中药配方颗粒企业重点实验室, 佛山 528244)

摘要 目的: 建立基于 SNP 位点的特异性 PCR 技术对土鳖虫(地鳖)配方颗粒及其混伪品的分子鉴定方法。方法: 通过分析土鳖虫与其常见伪品的细胞色素 C 氧化酶亚基 1(CO I) 序列, 寻找土鳖虫 SNP 变异位点, 设计出特异性引物 TBC - F(5' - TTCTTGTTGGCAAGCAGTATAAT - 3') 和 TBC - R(5' - AACTACTGCTCAAACAAATAATGGA - 3')。采用三步法进行聚合酶链式反应(PCR), 并通过方法优化, 确立最佳反应体系, 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: 在退火温度为 55 ~ 57 °C, 循环数为 37 次的扩增条件下, 21 批土鳖虫药材、20 批标准汤剂及其 19 批配方颗粒经 PCR 扩增及凝胶电泳检测后, 在 237 bp 处有单一明亮的特异性条带, 其伪品无条带, 试验结果与一代测序结果一致, 为地鳖。结论: 建立的特异性 PCR 鉴别方法可准确对土鳖虫药材、标准汤剂冻干粉、配方颗粒成品进行鉴别, 为土鳖虫的配方颗粒质量标准研究提供了参考依据。

关键词: 土鳖虫(地鳖); 配方颗粒; 细胞色素 C 氧化酶亚基 1 基因; 混伪品; 特异性聚合酶链式反应; 分子鉴别

中图分类号: R 917 文献标识码: A 文章编号: 0254 - 1793(2024)11 - 1951 - 07

doi: 10.16155/j.0254 - 1793.2024 - 0075

Identification of *Eupolyphaga Steleophaga* (*Eupolyphaga sinensis*) formula granules by specific PCR

LIU Shan - shan, TAN Si - yin, SONG Ye, XIAN Le - yao,

FAN Yao - yao, LUO Yu - qin, LI Guo - wei*

(Guangdong Yifang Pharmaceutical Co., Ltd., Guangdong Key Laboratory of TCM Formula Granule Enterprises, Foshan 528244, China)

Abstract Objective: To establish a specific polymerase chain reaction (PCR) method based on SNP loci for molecular identification of *Eupolyphaga Steleophaga* formula granules and its counterfeit. **Methods:** By analyzing the cytochrome oxidase I (CO I) sequences of *Eupolyphaga Steleophaga* and its common forgeries, the SNP mutation sites of *Eupolyphaga Steleophaga* were searched and specific primers were designed, which were TBC - F (5' - TTCTTGTTGGCAAGCAGTATAAT - 3') and TBC - R (5' - AACTACTGCTCAAACAAATAATGGA - 3'). Three - step method was used to amplify specific polymerase chain reaction (PCR) and the optimal PCR reaction system was determined by optimizing the PCR reaction procedure. 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 PCR method with the annealing temperature of 55 - 57 °C and 37 cycles produced a single band at 237 bp for 21 batches of *Eupolyphaga Steleophaga*, 20 batches of standard decoction and 19 batches of its dispensing granules,

* 通信作者 Tel:18851853737; E - mail:1744832706@qq.com

第一作者 Tel:15017592618; E - mail:452048107@qq.com

while it produced no band for the adulterant or the negative control. The experimental result was consistent with the result of Sanger sequencing, which was *Eupolyphaga sinensis*. **Conclusion:** The established specific PCR method can accurately identify the medicinal materials, and standard decoction freeze-dried powder of *Eupolyphaga Steleophaga*, as well as final products of dispensing granules. It provides a reference for research on the quality standards of *Eupolyphaga Steleophaga* dispensing granules.

Keywords: *Eupolyphaga Steleophaga* (*Eupolyphaga sinensis*); dispensing granules; CO I gene; adulterants; specific PCR; molecular identification

土鳖虫为鳖蠊科昆虫地鳖 *Eupolyphaga sinensis* Walker 或冀地鳖 *Steleophaga plancyi* (Bolney) 的雌虫干燥体^[1], 始载于《神农本草经》, 列为中品, 历代医书均有记载, 其入药可破血逐瘀、续筋接骨, 用于跌打损伤、筋伤骨折、血瘀经闭、产后瘀阻腹痛、癥瘕痞块^[2-4]。现代医学研究表明, 土鳖虫富含多种氨基酸、不饱和脂肪酸、黄酮和生物碱等活性物质, 具有抑制血管生成、抗肿瘤、抗凝血、抗血栓、抗氧化、促进骨骼愈合等功能^[5-9]。土鳖虫的资源有野生和家种, 以地鳖为主要来源, 国内虽然已有稳定的规范化养殖, 但随着土鳖虫药用需求量的日益增加^[10-11], 多种土鳖虫伪品如金边土鳖、美洲大蠊及金边龙虱等, 也逐渐充斥着市场。为保证临床用药的安全与有效, 需对土鳖虫的来源进行有效的鉴别^[12-14]。

目前, 对于土鳖虫的鉴别方法主要有性状鉴别^[15]、理化鉴别^[16]、显微鉴别^[17], 以及分子鉴别^[18-19]等方法, 但前3种鉴别方法易受到鉴别人员主观因素如从业经验等的干扰, 且从药材到配方颗粒, 经过煎煮与浓缩等一系列工艺, 早已失去原有性状和显微特征, 因而无法实现准确鉴别。分子鉴别具有不受主观因素干扰, 稳定性好, 高特异性等优势, 目前已有关于土鳖虫药材和中成药的分子鉴定研究。如: 李娜等^[18]基于 *Cybt* 基因设计了特异性引物, 可用于土鳖虫正品的炮制品、混伪品之间的分子鉴别; 刘晶晶等^[19]通过对土鳖虫及其伪品的细胞色素 C 氧化酶亚基 1 (CO I) 基因的比对分析, 建立了特异性 PCR 鉴别方法, 可用于鉴别 11 个中成药中土鳖虫的真伪。因此, 除土鳖虫的炮制品和中成药外, 还并未见关于土鳖虫配方颗粒的文献报道。

基于 SNP 位点的特异性 PCR 技术可以实现对物种的快速鉴别, 具有操作简便, 无需测序, 准确性高等特点, 已被应用于多个物种的中药配方颗粒的

鉴别, 如鳖甲^[20]、蜈蚣^[21]、全蝎^[22]等, 都是通过比对正品与伪品的常见基因序列, 设计特异性聚合酶链式反应 (PCR) 引物, 建立并优化 PCR 的最佳条件, 最终实现正品从药材到配方颗粒与伪品的鉴别。本研究通过筛选地鳖 (*Eupolyphaga Steleophaga*) 与其伪品的 SNP 位点, 成功设计出用于鉴别地鳖的药材、标准汤剂和配方颗粒的特异性引物, 并从 DNA 高度降解的样品中成功提取出作为 PCR 扩增的 DNA 模板, 可实现对土鳖虫配方颗粒的快速鉴别。

1 仪器与试药

1.1 试药 药材购于河南、山东、江苏、安徽等地, 共有 27 批, 经广东一方制药有限公司孙冬梅主任中药师鉴定, 其中地鳖 20 批, 美洲大蠊、金边土鳖、金边龙虱各 2 批, 具体信息见表 1, 标本保存于广东一方制药有限公司标本中心, 将其中地鳖药材制成 20 批标准汤剂冻干粉和 19 批配方颗粒。

MightyAMP DNA 聚合酶、TaKaRa rTaq DNA 聚合酶、TaKaRa Ex Taq DNA 聚合酶、SpeedSTAR DNA 聚合酶、DL1000 DNA Marker 均购自 TaKaRa 公司, 蛋白酶 K (天根生化科技 (北京) 有限公司), CTAB 提取液、TAE 缓冲液、SDS 提取液、琼脂糖 (上海源叶生物科技有限公司)、三氯甲烷、乙醇、异丙醇等均为分析纯, 水为实验室自制超纯水。

1.2 仪器 TU-100 恒温金属浴 (上海一恒科学仪器有限公司), 5424R 高速冷冻离心机 (艾本德公司), BioSpec-nano 紫外微量分光光度计 (岛津公司), OSE-MC8 微型离心机 (天根生化科技 (北京) 有限公司), T100 Thermal Cycler PCR 仪 (伯乐生命科技有限公司), StepOnePlus MiniAmpPlus PCR 仪 (赛默飞世尔科技公司), PowEase 300W PS0301 电泳仪 (美国伯乐生命科技有限公司), PowerPac Basic 水平电泳槽 (美国伯乐生命科技有限公司), Syngene NuGenius 凝胶成像仪 (Syngene 公司)。

表 1 实验药材信息

Tab. 1 Experimental medicinal material information

样品名称 (sample name)	基原 (origin)	来源 (source)	数量 (quantity)
土鳖虫对照药材(Eupolyphaga Steleophaga standard medicinal materials)	地鳖(<i>Eupolyphaga sinensis</i> Walker)	中国食品药品检定研究院(National Institutes for Food and Drug Control)	1
地鳖(Eupolyphaga Steleophaga)	地鳖(<i>Eupolyphaga sinensis</i> Walker)	河南(Henan)、江苏(Jiangsu)、山东(Shandong)、湖北(Hubei)	20
土鳖虫标准汤剂(Eupolyphaga Steleophaga standard decoction)	地鳖(<i>Eupolyphaga sinensis</i> Walker)	广东一方制药有限公司(Guangdong Yifang Pharmaceutical Co. Ltd.)	20
土鳖虫配方颗粒(Eupolyphaga Steleophaga dispensing granules)	地鳖(<i>Eupolyphaga sinensis</i> Walker)	广东一方制药有限公司(Guangdong Yifang Pharmaceutical Co. Ltd.)	19
美洲大蠊(<i>Periplaneta Americana</i>)	美洲大蠊(<i>Periplaneta americana</i> Linnaeus)	安徽(Anhui)	2
金边土鳖(<i>Opisthoplatia orientalis</i> Burm.)	金边土鳖(<i>Opisthoplatia orientalis</i> Burm.)	广东(Guangdong)、广西(Guangxi)	2
金边龙虱(<i>Cybister tripunctatus</i>)	金边龙虱(<i>Cybister tripunctatus</i>)	安徽(Anhui)	2

2 方法与结果

2.1 DNA 提取与质检 提取考察表明,土鳖虫药材和标准汤剂采用中国专利 CN101270357A^[23]的方法、配方颗粒采用两步 CTAB 法^[24]提取的 DNA 浓度较高,质量较好。2 种方法所获得的 DNA 样品经紫外分光光度计检测,饮片和标准汤剂提取的 DNA 浓度均值分别为 $543.74 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 和 $255.09 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, A_{260}/A_{280} 分别为 1.88 和 1.89;配方颗粒提取的 DNA 浓度均值为 $307.61 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, A_{260}/A_{280} 为 1.98,表明 2 种方法适用于土鳖虫饮片、标准汤剂和配方颗粒 DNA 的提取。

2.2 特异性引物设计 从 Genbank 中下载地鳖以及伪品的 CO I 序列,采用 Bioedit、MEGA 等软件进行 Clustal W 多重比对。序列对比发现,在 286 位地鳖位点为 C 而其他物种为 A/T,确定该 SNP 位点后,通过 Primer Premier 5 软件,设计鉴别引物 TBC - F: 5' - TTCTTGTTGGCAAGCAGTATAAT - 3' 和 TBC - R: 5' - AACTACTGCTCAAACAAATAATGGA - 3'。经特异性 PCR 扩增后,扩增产物长度为 237 bp。

2.3 PCR 条件建立与优化 反应体系为 $25 \mu\text{L}$,包括 $10 \times$ 缓冲液 $2.5 \mu\text{L}$, dNTP ($2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) $2.0 \mu\text{L}$, 鉴别引物 ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 各 $0.3 \mu\text{L}$, DNA 聚合酶 ($5 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) $0.2 \mu\text{L}$, DNA 模板[标准汤剂和颗粒 $2.0 \mu\text{L}$, 饮片 $1.0 \mu\text{L}$], 高压灭菌超纯水补足至 $25 \mu\text{L}$ 。PCR 参数: $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 预变性 5 min; 循环反应 39 次 ($95 \text{ }^\circ\text{C}$ 30 s, $55 \sim 59 \text{ }^\circ\text{C}$ 30 s, $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 30 s), $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 延伸 5 min。PCR 产物利用 2.5% 的琼脂糖凝胶加入核酸凝胶染色剂 GelRed, 通过电泳进行检测, 并利用凝

胶成像仪观察结果。

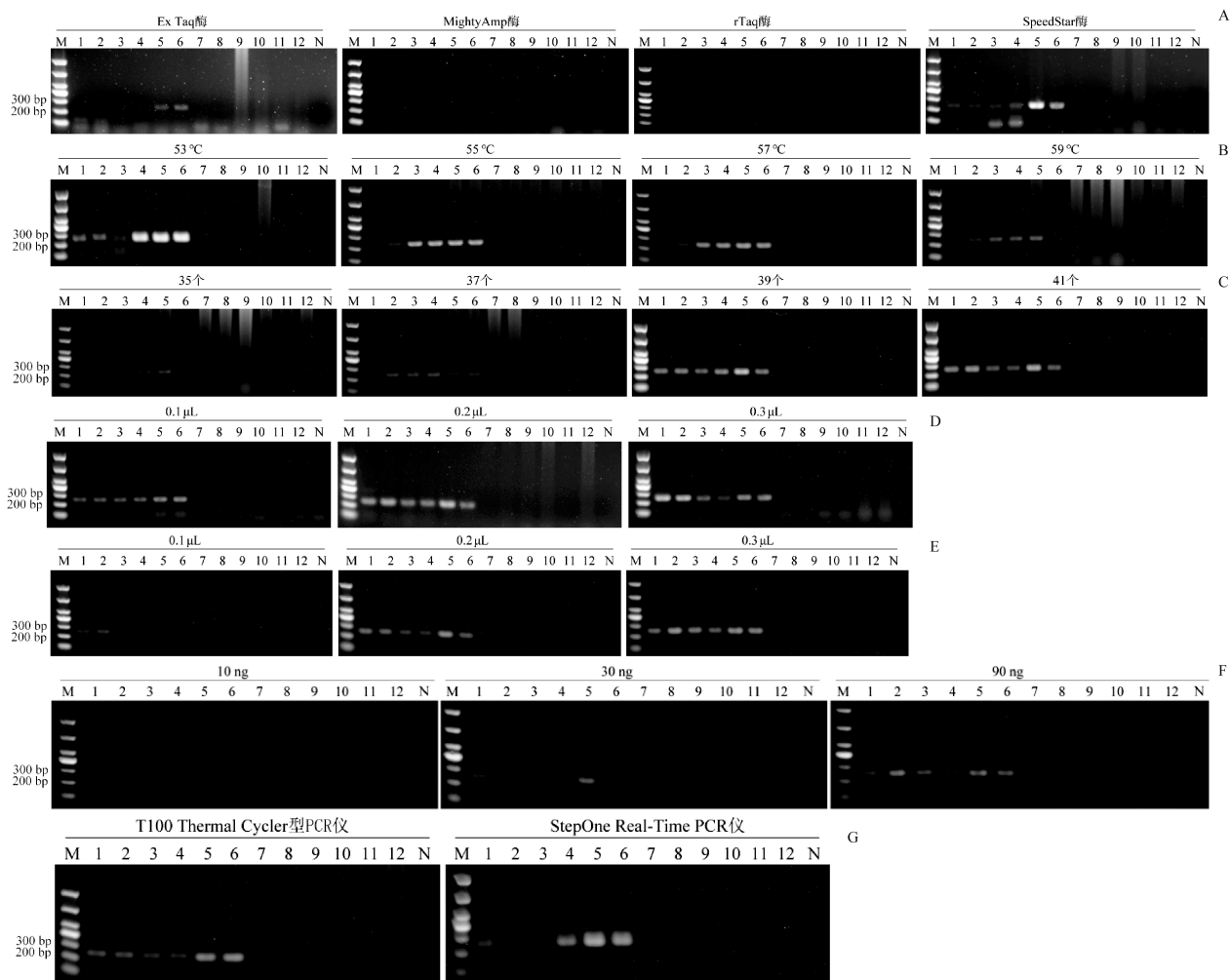
为探索 PCR 的最佳条件,本研究对聚合酶、退火温度、循环次数、聚合酶量、引物量以及不同仪器进行考察,结果如图 1 所示。

结果表明,用 SpeedStar 聚合酶,退火温度为 $55 \sim 57 \text{ }^\circ\text{C}$, 循环数为 37 个, DNA 模板量在 $10 \sim 90 \text{ ng}$ 内,聚合酶和引物量为 $0.2 \sim 0.3 \mu\text{L}$ 时,可获得土鳖虫全部 DNA 样品的最佳扩增条带,且伪品并未扩增,不同品牌 PCR 仪,PCR 扩增条带差异较小,且空白对照均无假阳性出现,说明该方法的耐用性较好。

2.4 检测限考察 考察土鳖虫配方颗粒特异性 PCR 法的灵敏度。选择土鳖虫配方颗粒 1 批,分别稀释 20、200、2 000、20 000、2 000 000 倍,测定 DNA 模板浓度,结果见表 2。按土鳖虫特异性 PCR 体系和扩增条件进行扩增,结果见图 2。

结果显示,土鳖虫配方颗粒 DNA 为 $1.5 \sim 15 \text{ ng}$ 时均可出现特异性条带,且空白对照均无假阳性出现,故土鳖虫配方颗粒特异性鉴别检测限 (LOD) 为 1.5 ng 。

2.5 适用性考察 选择土鳖虫药材 21 批、土鳖虫标准汤剂 21 批、土鳖虫配方颗粒 19 批、美洲大蠊药材及标准汤剂各 3 批、金边龙虱药材及标准汤剂各 2 批、金边土鳖药材及标准汤剂各 2 批,按照土鳖虫特异性 PCR 体系和扩增条件进行扩增,见图 3。结果显示,土鳖虫配方颗粒的鉴定率为 100%, 真阳性率为 100%, 真阴性率为 100%, 假阳性率为 0%, 假阴性率为 0%, 表明该方法能用于土鳖虫配方颗粒的特异性 PCR 鉴别。



M. DNA maker DL 1000 1,2. 土鳖虫颗粒 (Eupolyphaga Steleophaga dispensing granules) 3,4. 土鳖虫标准汤剂 (Eupolyphaga Steleophaga standard decoction) 5. 土鳖虫对照药材 (Eupolyphaga Steleophaga standard medicinal materials) 6. 土鳖虫药材 (Eupolyphaga Steleophaga medicinal materials) 7,8. 美洲大蠊 (*Periplaneta Americana*) 9,10. 金边龙虱 (*Cybister tripunctatus*) 11,12. 金边土鳖 (*Opisthoptatia orientalis* Burm.) N. 空白 (blank control)

A. 不同酶 (different enzyme) B. 不同退火温度 (different annealed temperatures) C. 不同循环数 (different number of cycles) D. 不同酶量 (different enzyme amounts) E. 不同引物量 (different primer amounts) F. 不同模板量 (different template quantities) G. 不同仪器 (different instruments)

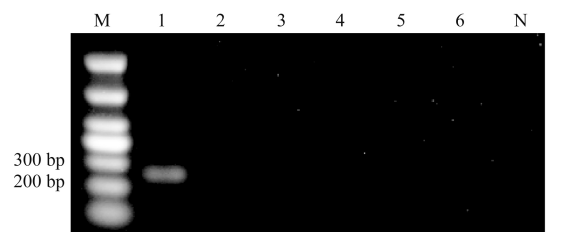
图1 土鳖虫不同影响因素考察结果

Fig. 1 Investigation results of different influencing factors on Eupolyphaga Steleophaga

表2 土鳖虫配方颗粒稀释浓度

Tab. 2 Dilution concentration of Eupolyphaga Steleophaga formula granules

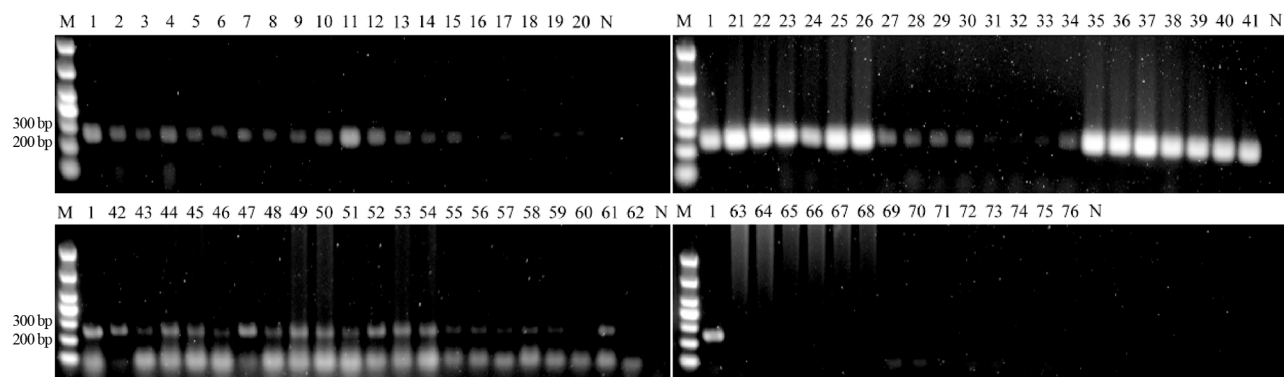
序号 (No.)	稀释倍数 (dilution rate)	DNA 浓度 (DNA concentration)/(ng · μL ⁻¹)
1	20	15
2	200	1.5
3	2 000	0.15
4	20 000	0.015
5	200 000	0.001 5
6	2 000 000	0.000 15



M. DNA maker DL 1000 N. 空白 (blank)
 稀释倍数 (dilution rate): 1. 20 2. 200 3. 2 000 4. 20 000
 5. 200 000 6. 2 000 000

图2 土鳖虫特异性 PCR LOD 考察结果

Fig. 2 Inspection results of LOD of Eupolyphaga Steleophaga specific PCR



M. DNA maker DL 1000 1. 土鳖虫对照药材 (Eupolyphaga Steleophaga standard medicinal materials) 2~20. 土鳖虫配方颗粒 (Eupolyphaga Steleophaga dispensing granules) 21~41. 土鳖虫饮片 (Eupolyphaga Steleophaga decoction pieces) 42~62. 土鳖虫标准汤剂 (Eupolyphaga Steleophaga standard decoction) 63~65. 美洲大蠊药材 (Periplaneta Americana medicinal materials) 66,67. 金边龙虱药材 (Cybister tripunctatus medicinal materials) 68,69. 金边土鳖药材 (Opisthoplatia orientalis Burm. medicinal materials) 70~72. 美洲大蠊标准汤剂 (Periplaneta Americana standard decoction) 73,74. 金边龙虱标准汤剂 (Cybister tripunctatus standard decoction) 75,76. 金边土鳖标准汤剂 (Opisthoplatia orientalis Burm. standard decoction) N. 空白 (blank)

图3 土鳖虫特异性 PCR 适用性结果

Fig. 3 Applicability results of Eupolyphaga Steleophaga specific PCR

2.6 测序验证 随机选取3批地鳖药材、标准汤剂和配方颗粒样品,使用优化的PCR条件进行扩增,将所得产物送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行Sanger测序,测序结果采用SeqMan软件进行拼接处理,并在NCBI(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)和全球药典基因组数据库(<http://www.gpgenome.com/>)上进行BLAST比对,结果见表3。9批样品的相似度在98.0%~100%,表明该特异性PCR方法可应用于土鳖虫药材、标准汤剂和配方颗粒的鉴别。

和全球药典基因组数据库(<http://www.gpgenome.com/>)上进行BLAST比对,结果见表3。9批样品的相似度在98.0%~100%,表明该特异性PCR方法可应用于土鳖虫药材、标准汤剂和配方颗粒的鉴别。

表3 土鳖虫样品测序验证结果

Tab. 3 Sequencing verification results of Eupolyphaga Steleophaga samples

样品果 (sample)	NCBI		GP Genome DB	
	比对结果 (BLAST result)	相似度 (similarity)/%	比对结果 (BLAST result)	相似度 (similarity)/%
YC01	地鳖 (<i>Eupolyphaga sinensis</i>)	98.86	地鳖 (<i>Eupolyphaga sinensis</i>)	99.10
YC02	地鳖 (<i>Eupolyphaga sinensis</i>)	98.88	地鳖 (<i>Eupolyphaga sinensis</i>)	99.03
YC03	地鳖 (<i>Eupolyphaga sinensis</i>)	98.85	地鳖 (<i>Eupolyphaga sinensis</i>)	99.12
BZTJ01	地鳖 (<i>Eupolyphaga sinensis</i>)	98.08	地鳖 (<i>Eupolyphaga sinensis</i>)	99.37
BZTJ02	地鳖 (<i>Eupolyphaga sinensis</i>)	98.91	地鳖 (<i>Eupolyphaga sinensis</i>)	100.00
BZTJ03	地鳖 (<i>Eupolyphaga sinensis</i>)	98.86	地鳖 (<i>Eupolyphaga sinensis</i>)	99.47
PFKLI01	地鳖 (<i>Eupolyphaga sinensis</i>)	98.82	地鳖 (<i>Eupolyphaga sinensis</i>)	99.38
PFKLI02	地鳖 (<i>Eupolyphaga sinensis</i>)	98.82	地鳖 (<i>Eupolyphaga sinensis</i>)	99.26
PFKLI03	地鳖 (<i>Eupolyphaga sinensis</i>)	98.85	地鳖 (<i>Eupolyphaga sinensis</i>)	99.75

3 讨论

中药配方颗粒是将传统中药饮片通过提取、分离、浓缩、干燥和制粒等一系列现代工艺制成的新型配方用药,具有方便服用,安全有效的特点,但是该剂型无法通过传统鉴别方法对原料实现准确的鉴别,因此无法保证配方颗粒的质量控制与用药安全。

DNA分子鉴别技术在快速发展的同时,也为解决中药配方颗粒的质量难题控制提供了快速有效的方法。

由于模板DNA的质量对于特异性PCR扩增成

功至关重要,本研究在试验中比较了专利 CN101270357A 方法、DNA 提取试剂盒法、CTAB 法与两步 CTAB 法。其中,专利 CN101270357A 的方法采用 0.5% SDS 及蛋白酶 K 消化后,使样品里的蛋白质大量降解,DNA 则会溶解在消化液中,适用于土鳖虫药材与标准汤剂及其伪品的 DNA 提取。而中药配方颗粒在生产过程中会加入蔗糖、麦芽糊精等多种糖分辅料,会严重影响样品 DNA 的提取,本研究在试验中发现,相较于常用的 CTAB 法,两步 CTAB 法增加了沉淀液的步骤,即通过降低盐浓度使 DNA 从溶液中沉淀下来,而大量糖分则溶解于溶液中,可使配方颗粒中的大部分糖分与 DNA 分离,实现纯净 DNA 的目的。根据确定的 2 种方法可以获得质量较高的 DNA 模板,满足后续研究需要。

中药配方颗粒在生产过程中需要保证产品质量的均一性,对于多基原的中药饮片,企业会有依据地选择其中一种基原进行生产。因此,本研究设计的特异性 PCR 引物主要针对以地鳖为原料的土鳖虫配方颗粒,该方法可以鉴别地鳖及其伪品,但对于药典规定的另一基原即冀地鳖,未做适用性考察,因此,将继续对冀地鳖基原展开研究,希望为完善动物药配方颗粒的分子鉴定提供重要的科学依据。

参考文献

- [1] 中华人民共和国药典 2020 年版. 一部[S]. 2020:19
ChP 2020. Vol I [S]. 2020:19
- [2] 尚志钧校注. 神农本草经[M]. 北京:学苑出版社, 2008
Annotated by SHANG ZJ. Shennong Bencao Jing [M]. Beijing: Xueyuan Publishing House, 2008
- [3] 苏敬. 新修本草[M]. 合肥:安徽科学技术出版社, 1981
SU J. Xinxu Bencao [M]. Hefei: Anhui Science and Technology Press, 1981
- [4] 陶弘景. 名医别录[M]. 北京:人民卫生出版社, 1986
TAO HJ. Mingyi Bie Lu [M]. Beijing: People's Health Publishing House, 1986
- [5] FU X, SHAO BH, WEI X, et al. Tubiechong: a review on ethnomedicinal uses, bioactive chemical constituents and pharmacological activities [J]. J Ethnopharmacol, 2022, 298: 115642
- [6] 苏倩榕, 桂雄斌, 韦旭日, 等. 中药土鳖虫药理活性成分及其临床应用的研究进展[J]. 基层中医药, 2023, 2(2): 119
SU QR, GUI XB, WEI XR, et al. Active pharmacological ingredients of Eupolyphaga Steleophaga and its clinical application: a review [J]. Basic Tradit Chin Med, 2023, 2(2): 119
- [7] 韩迪, 程永现, 晏永明. 土鳖虫药理作用研究进展[J]. 中国现代中药, 2022, 24(12):13
HAN D, CHENG YX, YAN YM. Pharmacological effects of *Eupolyphaga sinensis*: a review [J]. Mod Chin Med, 2023, 2(2): 119
- [8] 李贺赞, 邵蒙苏, 张莉莉. 土鳖虫的临床应用及其用量探究 [J]. 长春中医药大学学报, 2022, 38(12): 1324
LI HY, SHAO MS, ZHANG LL. Clinical application and dosage of ground beetles [J]. J Changchun Univ Chin Med, 2022, 38(12): 1324
- [9] 马家宝, 杨正腾. 全蝎、蜈蚣、蟾酥和土鳖虫抗肿瘤作用研究进展[J]. 中医药导报, 2021, 27(5):65
MA JB, YANG ZT. Research progress on anti-tumor effects of Quianxie (scorpion), Wugong (centipede), Chansu (toad venom) and Tubiechong (ground beetle) [J]. Guid J Tradit Chin Med Pharm, 2021, 27(5):65
- [10] 王钰龙. 土元养殖正当时[J]. 农业知识, 2009, 60(27): 35
WANG YL. It is right time to breed Tuyuan [J]. Agric Know, 2009, 60(27): 35
- [11] 张来平, 孙传逊, 徐学兵. 养“金虫子”走致富路——记金湖县金虫子土元养殖专业合作社理事长韩俊豪[J]. 中国农民合作社, 2011, 3(12): 29
ZHANG LP, SUN ZX, XU XB. Raising 'golden bugs' to achieve wealth - a record of Han Junhao, chairman of the golden bug tuyuan breeding professional cooperative in Jinhu county [J]. China Farmers Coop, 2011, 3(12): 29
- [12] 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): 3014
XIANG YY. Progress on the studies and application of officinal insects in China [J]. J Anhui Agric Sci, 2009, 37(7): 3014
- [13] 谢宗万. 中药品种理论与应用[M]. 北京:人民卫生出版社, 2008: 655
XIE ZW. Theory and Application of Traditional Chinese Medicine Varieties [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2008: 655
- [14] 胡玉伟. 中华真地鳖体型大小地理变异及相关免疫反应研究 [D]. 武汉:华中农业大学, 2011
HU YW. Geographic Variation of Body Size and Immunoreaction Related in *Eupolyphaga sinensis* [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2011
- [15] 张叶. 土鳖虫及其伪品的鉴别[J]. 中国临床研究, 2011, 24(6): 529
ZHANG Y. Identification of Eupolyphaga Steleophaga and its counterfeits [J]. Chin J Clin Res, 2011, 24(6): 529
- [16] 鞠康, 张雪艳, 胡云飞, 等. 土鳖虫与其混淆品的微性状鉴别研究[J]. 天然产物研究与开发, 2019, 31(9): 1608
JU K, ZHANG XY, HU YF, et al. Study on the identification of the microcharacters of the Eupolyphaga Steleophaga and its adulterants [J]. Nat Prod Res Dev, 2019, 31(9): 1608

- [17] 冯丽娟, 王毅. 土鳖虫中几种掺伪品的鉴别[J]. 时珍国医国药, 2004, 15(4): 228
FENG LJ, WANG Y. Identification of several adulterants in ground beetle *sinensis*[J]. *Lishizhen Med Mater Med Res*, 2004, 15(4): 228
- [18] 李娜, 岳蓓蓓, 张家贺, 等. 基于 *Cytb* 基因对药用昆虫地鳖虫炮制制品的分子鉴别研究[J]. 中国药房, 2015, 26(31): 4354
LI N, YUE BB, ZHANG JH, *et al.* Molecular identification of processed medicinal insects *Chinese polyphaga* based on *Cytb* gene [J]. *China Pharm*, 2015, 26(31): 4354
- [19] 刘晶晶, 杨晶凡, 姚令文, 等. 基于 *CO I* 基因对中成药中土鳖虫的分子鉴别研究[J]. 药物分析杂志, 2023, 43(5): 880
LIU JJ, YANG JF, YAO LW, *et al.* Molecular identification of *Eupolyphaga Steleophaga* in Chinese patent medicine based on *CO I* gene[J]. *Chin J Pharm Anal*, 2023, 43(5): 880
- [20] 谭斯尹, 宋叶, 范耀耀, 等. 鳖甲配方颗粒的位点特异性 PCR 鉴别研究[J]. 中药材, 2023, 46(9): 2160
TAN SY, SONG Y, FAN YY, *et al.* Identification of *Trionycis carapax* formula granule by allele-specific PCR[J]. *J Chin Med Mater*, 2023, (9): 2160
- [21] 许源升, 胡力, 蒋超, 等. 蜈蚣配方颗粒的位点特异性 PCR 鉴别[J]. 中国实验方剂学杂志, 2024, 30(4): 48
XU YS, HU L, JIANG C, *et al.* Identification of *Scolopendra* dispensing granules by allele-specific PCR[J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*, 2024, 30(4): 48
- [22] 段宝丽, 陈天韵, 施丹丹, 等. 全蝎分子鉴定及其配方颗粒的位点特异性 PCR 鉴别[J]. 中国中药杂志, 2024, 49(4): 942
DUAN BL, CHEN TY, SHI DD, *et al.* Site-specific PCR identification of animal species and formulaparticles of *scorpio* [J]. *China J Chin Mater Med*, 2024, 49(4): 942
- [23] 周祥山, 张元兴, 吕品, 等. 一种从深度加工型中药或中药材中提取 DNA 的方法: 中国, CN200810034447.5 [P]. 2008-09-24
ZHOU XS, ZHANG YX, LÜ P, *et al.* A Method for Extracting DNA from Highly Processed Traditional Chinese Medicine or Medicinal Herbs: China, CN200810034447.5 [P]. 2008-09-24
- [24] 李岩, 于海琳, 马晓彤, 等. 对 CTAB 法提取菠菜基因组 DNA 实验的优化设计[J]. 化工管理, 2023, 36(14): 15
LI Y, YU HL, MA XT, *et al.* Conditions research on CTAB extraction of spinach genome DNA [J]. *Chem Enterp Manage*, 2023, 36(14): 15

(本文于 2024 年 2 月 1 日收到)