

基于便携式和CFX96实时荧光PCR仪的冬虫夏草及其混伪品鉴定研究

贲凯祎^{1,2}, 向丽³, 王晓玥^{1,2}, 刘杨^{1,2}, 姚辉^{1,2}, 宋经元^{1,2*}

(1. 中国医学科学院、北京协和医学院药用植物研究所, 国家中医药管理局中药资源保护重点研究室, 北京 100193; 2. 中药资源教育部工程研究中心, 北京 100193; 3. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700)

摘要: 采用 TaqMan 探针实时荧光 PCR 方法对冬虫夏草及其混伪品进行分子鉴定研究。从 100 份冬虫夏草及其混伪品中提取总 DNA, 依据核糖体 (rDNA) 内部转录间隔区 (internal transcribed spacer, ITS) 序列, 利用 MEGA 7.0 软件进行比较分析, 找出冬虫夏草及其混伪品的变异位点, 通过 Primer Premier 6.0 软件设计一对特异性引物和 TaqMan 探针, 分别在两种实时荧光 PCR 仪 (Genesig q16 和 Bio-Rad CFX96) 上进行灵敏度和特异性鉴定研究。灵敏度研究表明, 在 Bio-Rad CFX96 系统中, 该方法对冬虫夏草 DNA 模板的检测下限为 $0.016 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$; 在 Genesig q16 系统中, 该方法对冬虫夏草 DNA 模板的检测下限为 $15.527 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 。特异性鉴定研究表明, 在 Genesig q16 和 Bio-Rad CFX96 系统上, 该方法对冬虫夏草均具有良好的特异性, 能与混伪品下垂虫草、古尼虫草、蛹虫草、蝉花、凉山虫草、新疆虫草明显区分。TaqMan 探针实时荧光 PCR 方法可实现对冬虫夏草及其混伪品的准确鉴定, 为药材市场的管理提供技术支撑, 对名贵中药材的鉴别具有较好应用前景。

关键词: 冬虫夏草; TaqMan 探针; 实时荧光 PCR; 分子鉴定

中图分类号: R931 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2019)04-0746-07

Identification of *Ophiocordyceps sinensis* and its adulterants based on portable and CFX96 real-time fluorescent PCR systems

YUN Kai-yi^{1,2}, XIANG Li³, WANG Xiao-yue^{1,2}, LIU Yang^{1,2}, YAO Hui^{1,2}, SONG Jing-yuan^{1,2*}

(1. Key Lab of Chinese Medicine Resources Conservation, State Administration of Traditional Chinese Medicine of the People's Republic of China, Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100193, China; 2. Engineering Research Center of Chinese Medicine Resources, Ministry of Education, Beijing 100193, China; 3. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

Abstract: The molecular identification of *Ophiocordyceps sinensis* and its adulterants was carried out by real-time fluorescent PCR with TaqMan probe. Genomic DNA was extracted from 100 samples of *Ophiocordyceps sinensis* and its adulterants. MEGA 7.0 software was used for comparative analysis to define the variable sites between *Ophiocordyceps sinensis* and its adulterants according to the internal transcribed spacer (ITS) region of ribosomal DNA (rDNA). A set of specific primers and TaqMan probe were designed using Primer Premier 6.0 software, and sensitivity and specificity studies were performed on two different real-time fluorescent PCR systems (Genesig q16 and Bio-Rad CFX96). The sensitivity study showed that the detectable DNA template concentration of *Ophiocordyceps sinensis* for the real-time fluorescent PCR was $0.016 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ in the Bio-Rad CFX96

收稿日期: 2019-01-28; 修回日期: 2019-02-22.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81874339); 四川省重点研发项目 (2018SZ0061).

*通讯作者 Tel: 86-10-57833199, E-mail: jysong@implad.ac.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2019-0078

system and $15.527 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ in the Genesig q16 system, respectively. Meanwhile, this method had good specificity for *Ophiocordyceps sinensis* on Genesig q16 and Bio-Rad CFX96 systems, so *Ophiocordyceps sinensis* could be clearly distinguished from *Ophiocordyceps nutans*, *Cordyceps gunnii*, *Cordyceps militaris*, *Cordyceps cicadae*, *Cordyceps liangshanensis*, *Cordyceps gracilis*. Our results indicate that real-time fluorescent PCR with TaqMan probe can be used to accurately identify *Ophiocordyceps sinensis* from its adulterants. This provides a technical method that has wide applications for market management and quality control of Chinese materia medica.

Key words: *Ophiocordyceps sinensis*; TaqMan probe; real-time fluorescent PCR; molecular identification

冬虫夏草是麦角菌科真菌冬虫夏草菌 (*Ophiocordyceps sinensis* (BerK.) Sacc.) 侵染蝙蝠蛾科昆虫幼虫而形成的幼虫尸体与真菌子座的复合体^[1], 在我国是一种传统的名贵中药材, 具有较高的药用价值。其性平, 味甘, 归肺、肾经, 具有补肾益肺、止血化痰的功效, 主治肾虚精亏、阳痿遗精、腰膝酸痛、久咳虚喘、劳嗽咯血^[1]。目前发现其分布在中国的西藏、青海、云南、四川和甘肃五省(区), 以及不丹、印度、尼泊尔的喜马拉雅山南麓的部分地区^[2,3]。近年来, 冬虫夏草分布区生态环境破坏严重, 市场的巨大需求导致过度开发, 使得野生资源萎缩, 价格不断飙升^[4,5]。因此, 市场上常出现下垂虫草 *Ophiocordyceps nutans*、古尼虫草 *Cordyceps gunnii*、凉山虫草 *Cordyceps liangshanensis*、蛹虫草 *Cordyceps militaris*、新疆虫草 *Cordyceps gracilis*、蝉花 *Cordyceps cicadae* 等^[6]混伪品假冒冬虫夏草的现象, 极大地损害了消费者的利益。所以, 有必要开展冬虫夏草真伪鉴定研究。

冬虫夏草及其混伪品的鉴定主要依赖于传统的生药学方法, 此法主要从样品的虫体色泽、环纹数、子座表面结构、子座着生位置、腹足、长短以及气味等特征进行观察比较^[7-11], 需要丰富的鉴定经验, 且常见混伪品经加工修饰与冬虫夏草形态高度相似, 区分难度大, 一般需要结合其他分析鉴定技术进行鉴别。化学方法如高效液相色谱以及液质联用技术, 耗费材料多, 且需要大型仪器支持^[12-15], 推广难度大。DNA 条形码技术是指利用基因组中一段公认的、相对较短的 DNA 片段作为物种标记而建立的一种分子鉴定方法, 能准确进行物种鉴别, 已成为近年来生物分类和鉴定的研究热点, 其标准操作流程包含 DNA 提取、PCR 扩增、电泳、测序、数据分析及结果判定等^[16-18], 尚未能实现对待检样品的即时监测, 因此, 仍需开发更加便捷、快速的检测方法以满足药材市场监管需求。

实时荧光 PCR 技术以其特异灵敏、快速准确、操作简便等优点在基因表达分析、食品检测、环境监测、医学检测和诊断等方面得到广泛应用^[19]。TaqMan 探针法是具有高度特异性的荧光 PCR 技术, 工作原理是在 PCR 反应体系中引入一对引物和探针, 探针的 5'端

标记有荧光基团, 3'端标记有淬灭基团, 利用 Taq 酶的 3'→5'外切核酸酶活性切断位于两条引物之间仅与模板特异性结合的探针, 导致荧光基团荧光能量不能被淬灭基团吸收, 产生荧光信号, 仪器通过收集信号进行结果判定, 结果准确、分辨率高^[20]。本研究利用 TaqMan 探针技术, 建立了一种快速、准确鉴定冬虫夏草的实时荧光 PCR 方法, 为中药材市场的管理和中药生产企业的原料监管提供技术支持。

材料与方 法

药材 本研究通过采集和市场购买两种方式共收集 40 份冬虫夏草和 60 份混伪样品, 其中下垂虫草、古尼虫草、蛹虫草、蝉花、凉山虫草、新疆虫草各 10 份, 来自青海、西藏、四川、江苏、安徽、北京等地, 研究样本经中国中医科学院中药研究所向丽副研究员鉴定, 详细信息见表 1。另外, 184 条来自文献的冬虫夏草及其混伪品 ITS 序列被用于 TaqMan 探针和特异性引物设计^[18,21-24]。

实验仪器 Genesig q16 便携式快速分子鉴定系统(北京科奥明公司)、CFX96 实时荧光 PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司)、MM400 组织研磨仪(德国 Retsch 公司)、AL204-IC 分析天平(瑞士 Mettler Toledo 公司)、5424R 小型高速离心机(德国 Eppendorf 公司)、基因扩增仪(德国 Analytik Jena 公司)、NanoDrop2000 紫外分光光度计(美国 Thermo Scientific 公司)、数显恒温水浴锅(北京陆希公司)、ABI 3730 XL 测序仪(美国 Applied Biosystems 公司)。

试剂 DP305-03 植物基因组 DNA 提取试剂盒(北京天根生化公司)、2×Taq PCR Mix(北京艾德莱公司)、2×MasterMix(英国 Primer design 公司)、琼脂糖(西班牙 Biowest 公司)、通用扩增引物 ITS5F: 5'-GGAA GTAAAAGTCGTAACAAGG-3'; ITS4R: 5'-TCCTCC GCTTATTGATATGC-3'(苏州金唯智公司)^[21]、灭菌超纯水。

DNA 提取 用 75% 酒精棉球将冬虫夏草及其混伪品下垂虫草、古尼虫草、蛹虫草、蝉花、凉山虫草和新疆虫草表面擦拭干净, 晾干, 称取子座部分 30 mg 左

Table 1 Information for the samples of *Ophiocordyceps sinensis* and its adulterants

Latin name	Voucher no.	Sample no.	Locality
<i>Ophiocordyceps sinensis</i>	DX1-4	4	Yushu, Qinghai, China
	DX5-10	6	Beijing, China (market)
	DX11-16	6	Yushu, Qinghai, China
	DX17-20	4	Golog, Qinghai, China
	DX21-30	10	Beijing, China (market)
	DX31-35	5	Nakchu, Tibet, China
	DX36-37	2	Kangting, Sichuan, China
	DX38-40	3	Litang, Sichuan, China
<i>Ophiocordyceps nutans</i>	XC1-10	10	Changbai Mountain Nature Reserve, Jilin, China
<i>Cordyceps cicadae</i>	CH1-3	3	Hengduan Mountains, Sichuan, China
	CH4-7	4	Nanjing, Jiangsu, China (market)
	CH8-10	3	Bozhou, Anhui, China (market)
<i>Cordyceps gracilis</i>	NJ1-4	4	Ili, Xinjiang, China (market)
	NJ5-10	6	Urumqi, Xinjiang, China (market)
<i>Cordyceps gunnii</i>	GN1-3	3	Suizhou, Hubei, China (market)
	GN4	1	Tibet, China (market)
	GN5-10	6	Chengtu, Sichuan, China (market)
<i>Cordyceps liangshanensis</i>	LS1-10	10	Daliang Mountain, Sichuan, China
<i>Cordyceps militaris</i>	YC1-4	4	Beijing, China (market)
	YC5-10	6	Beijing, China (market)

右,用组织研磨仪研磨2 min (30次/s)后,按照植物基因组DNA提取试剂盒说明书提取总DNA^[6]。

DNA浓度及纯度检测 分别将提取的DNA使用微量分光光度计NanoDrop 2000检测,用灭菌超纯水作空白对照,记录DNA的浓度、OD₂₆₀/280比值及OD₂₆₀/230比值。

PCR扩增及测序 PCR反应体系25 μL: 2×Taq PCR Mix为12.5 μL,通用扩增引物ITS5F/ITS4R (2.5 μmol·L⁻¹)各1 μL, DNA模板2 μL,最后用灭菌超纯水补足至25 μL。PCR扩增程序: 预变性94 °C 5 min; 94 °C 1 min, 50 °C 1 min, 72 °C 1.5 min+3 s/cycle, 30个循环; 最后延伸72 °C 7 min^[21]。琼脂糖凝胶电泳: 使用1%琼脂糖凝胶进行电泳,电压140 V,约30 min。PCR反应产物经纯化后,使用ABI 3730 XL测序仪进行双向测序。

数据处理 对双向测序峰图采用CodonCode Aligner 7.1.24 (CodonCode Co., USA)进行序列拼接和图谱分析,去除引物区,将获得的序列在中药材DNA条形码鉴定系统 (<http://www.tcmbarcode.cn>)进行结果判定,结果中相似性最高的序列对应物种为查询序列最接近的物种^[25]。

TaqMan探针和引物设计 根据冬虫夏草及其混伪品ITS序列,利用MEGA 7.0软件对上述序列进行比

较及一致性分析,找出冬虫夏草及其混伪品的变异位点。用Primer Premier 6.0软件分析设计引物和探针,筛选得到针对冬虫夏草的特异性引物探针(表2)。引物和探针由上海生工生物工程股份有限公司合成,探针5'端标记荧光基团FAM,探针3'端标记淬灭基团BHQ1。

实时荧光PCR反应 PCR反应体系为20 μL: 2×MasterMix为10 μL,正反向引物DXF/DXR (10 μmol·L⁻¹)各0.5 μL,探针DXP (10 μmol·L⁻¹) 0.5 μL, DNA模板1 μL,灭菌超纯水补足体积至20 μL。Genesig q16实时荧光PCR反应条件: 95 °C预变性2 min; 95 °C 10 s~60 °C 1 min收集荧光信号,40个循环。Bio-Rad CFX96实时荧光PCR反应条件: 95 °C预变性2 min; 95 °C 10 s~60 °C 1 min收集荧光信号,30或50个循环。

实时荧光PCR的灵敏度研究 随机选取1个冬虫夏草基因组DNA用灭菌超纯水10倍稀释成6个梯度,每个浓度梯度各取1 μL作为模板,按照实时荧光PCR反应的方法进行灵敏度检测。

实时荧光PCR的特异性研究 以冬虫夏草及其混伪品样本基因组DNA为模板,包括下垂虫草、古尼虫草、蛹虫草、蝉花、凉山虫草和新疆虫草,以冬虫夏草基因组DNA作为阳性对照,进行实时荧光PCR反应,

Table 2 Primers and TaqMan probe for the real-time fluorescent PCR

Name	Sequences (5'→3')	Length/bp	Amplified length/bp
DXF	TCGAGTTACCACTCCCAAACCC	22	
DXR	GAGATGCCACTGCGACAGGA	20	130
DXP	CTGCGAACACCACAGCAGTTGCCTCGGC	28	

分析该方法的特异性。

结果

1 样品DNA质量

从100份冬虫夏草及其6种混伪品中成功提取DNA。分光光度法结果显示,冬虫夏草光密度比OD260/280处于1.83~2.13范围,OD260/230处于1.88~2.30之间,浓度大多在1 156.1~7 473.1 ng·μL⁻¹之间,仅有一个样品浓度为730.9 ng·μL⁻¹,符合后续PCR扩增要求。6种混伪品(包括下垂虫草、古尼虫草、蛹虫草、蝉花、凉山虫草、新疆虫草)光密度比OD260/280处于1.85~2.11之间,OD260/230处于1.72~2.26之间,DNA浓度在678.8~2 963.3 ng·μL⁻¹之间,比正品冬虫夏草浓度低。PCR产物凝胶电泳显示,每个样品都有单一明亮的条带,片段大约在550 bp。测序数据经处理后,在中药材DNA条形码鉴定系统进行BLAST比对,结果显示,ITS序列能够成功鉴定所有样品,且与形态学鉴定结果一致。

2 实时荧光PCR鉴定的灵敏度研究

将选取的1个冬虫夏草基因组DNA(质量浓度为1 552.7 ng·μL⁻¹)10倍稀释得到6个梯度浓度,分别为1552.7、155.27、15.527、1.553、0.155、0.016 ng·μL⁻¹,进行灵敏度研究。图1A结果显示:在Genesig q16鉴定系统中,当模板DNA质量浓度为1 552.7~15.527 ng·μL⁻¹时,3个梯度浓度都出现S型扩增曲线,获得较强荧光信号,Ct(cycles, Ct)值分别是20、26、32;而当质量浓度为1.553~0.016 ng·μL⁻¹时,未出现典型扩增曲线。图1B及表3结果表明:在Bio-Rad CFX96鉴定系统中,TaqMan探针实时荧光PCR方法具有较好的线性检测范围,当DNA质量浓度为0.016 ng·μL⁻¹时,仍能产生良好的特异性荧光扩增曲线,Ct值最大为38。可见,该鉴定方法具有较高的灵敏度,并且Bio-Rad CFX96系统的灵敏度高于Genesig q16系统1 000倍。

3 实时荧光PCR特异性鉴定研究

图2鉴定结果显示,TaqMan探针实时荧光PCR方法鉴定冬虫夏草呈典型的阳性反应,Ct值分别在

Table 3 Concentration and corresponding cycles in Bio-Rad CFX96 system

Concentration/ng·μL ⁻¹	Cycles
1552.7	18
155.27	23
15.527	26
1.553	30
0.155	35
0.016	38

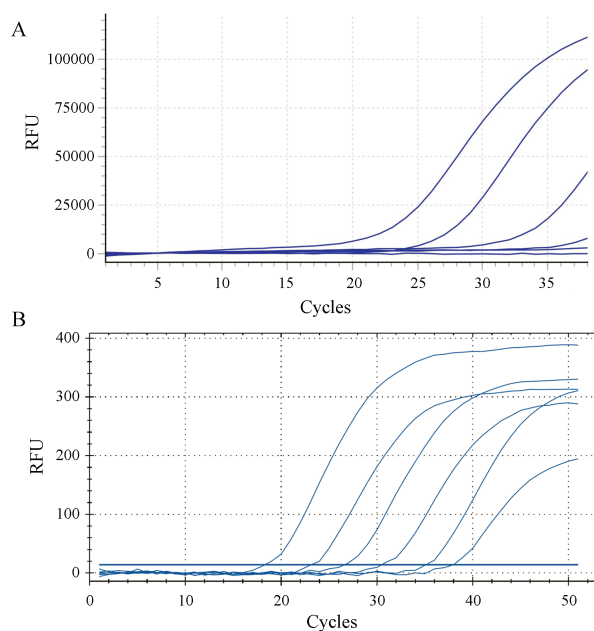


Figure 1 The sensitive of the real-time fluorescent PCR with TaqMan probe. A: Genesig q16 system; B: Bio-Rad CFX96 system. Amplification curve: 1 552.7 ng·μL⁻¹ to 0.016 ng·μL⁻¹ from left to right. RFU: Relative fluorescence unit

14~20(图2A)、17~20(图2B)、13~15(图2C)、11~14之间(图2D,只有一个样品Ct值为19),呈特异性S型荧光扩增曲线;鉴定下垂虫草、古尼虫草、蛹虫草、蝉花、凉山虫草和新疆虫草6种伪品均为典型的阴性反应,未见特异性荧光扩增曲线,均未检测到荧光信号增加。两种仪器Genesig q16和Bio-Rad CFX96鉴定结果表明,本研究所用的引物(DXF/DXR)及探针(DXP)直接针对冬虫夏草检测,所建立的冬虫夏草TaqMan探针实时荧光PCR方法具有很强的特异性。

4 TaqMan探针实时荧光PCR法快速鉴别冬虫夏草标准流程

根据以上研究,确定TaqMan探针实时荧光PCR法快速鉴别冬虫夏草的标准流程(图3),主要包括待测样品采集、样品基因组DNA提取、TaqMan探针实时荧光PCR反应等步骤,供其他科研人员和实验人员参考。其中,Bio-Rad CFX96实时荧光PCR仪应用于实验室进行基础科学研究,而Genesig q16便携式快速分子鉴定系统应用于市场快速鉴定研究。

讨论

TaqMan探针实时荧光PCR法由于其灵敏、特异等特点,自推出以来得到了迅速发展和广泛应用,现已成为核酸分子检测的核心技术^[26],但在中药材检测领域应用较少,目前尚无冬虫夏草及其混伪品下垂虫草、

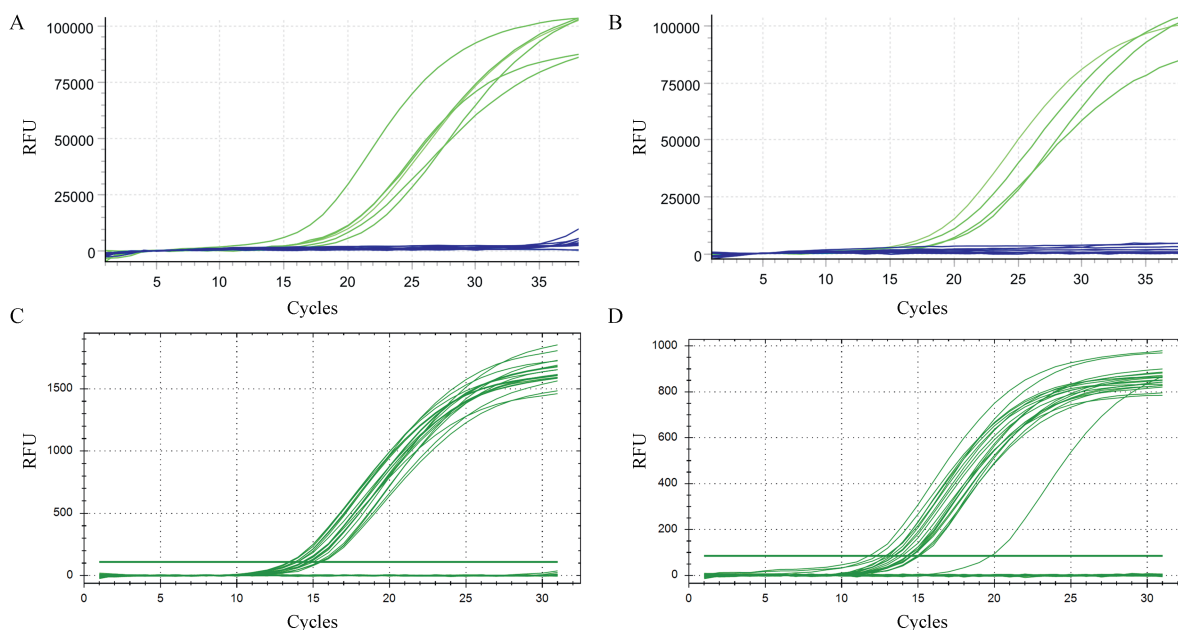


Figure 2 The specificity of the real-time fluorescent PCR with TaqMan probe. A, B: Genesis q16 system; C, D: Bio-Rad CFX96 system. A: Six samples of *Ophiocordyceps sinensis* (green) and ten samples of *Cordyceps militaris* (blue); B: Four samples of *Ophiocordyceps sinensis* (green) and 12 samples of its adulterants [two samples per species (blue)]. C: 20 samples of *Ophiocordyceps sinensis* and total 30 samples of *Cordyceps militaris*, *Ophiocordyceps nutans*, *Cordyceps gunnii*; D: 20 samples of *Ophiocordyceps sinensis* and total 30 samples of *Cordyceps cicadae*, *Cordyceps liangshanensis*, *Cordyceps gracilis*

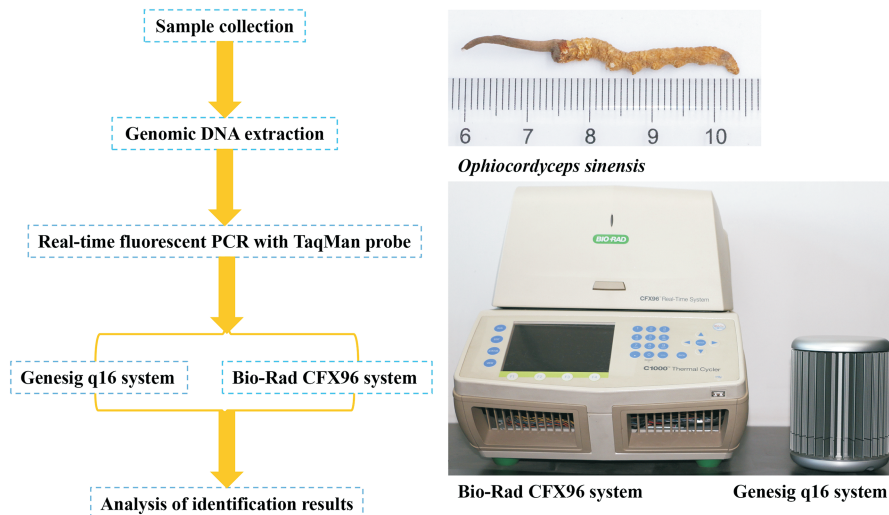


Figure 3 The standard identification process of *Ophiocordyceps sinensis* and its adulterants using the real-time fluorescent PCR with TaqMan probe

古尼虫草、蛹虫草、蝉花、凉山虫草和新疆虫草鉴定研究相关报道。He等^[27]针对雨燕属、金丝燕属和其他物种细胞色素b基因的序列进行分析,设计一对特异靶向雨燕属和金丝燕属物种细胞色素b基因的引物探针,实现了对燕窝的鉴定,并指出生物体内线粒体DNA的含量和稳定性高于细胞核DNA,在使用TaqMan探针法进行物种鉴别时,可以选择线粒体DNA作

为靶标。Wu等^[28]采用该技术以常见掺伪动物猪、牛、羊的特异性基因作为引物,准确鉴别了紫河车及猪、牛、羊物种掺伪样品,并且3个物种间无交叉反应,最小检出浓度分别为3.313、3.375、3.281 ng·μL⁻¹。

本研究针对100份冬虫夏草及其混伪品下垂虫草、古尼虫草、蛹虫草、蝉花、凉山虫草和新疆虫草样品,在特异性引物DXF/DXR、探针DXP及反应条件均

相同的情况下,在Genesig q16和Bio-Rad CFX96两种鉴定系统中,采用TaqMan探针实时荧光PCR方法进行灵敏度和特异性分子鉴定研究。灵敏度研究结果显示,两种鉴定系统对冬虫夏草DNA模板的浓度响应不同,Genesig q16系统对冬虫夏草DNA模板的检测下限是 $15.527 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$,而Bio-Rad CFX96系统的检测下限是 $0.016 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$,比Genesig q16系统灵敏度高1 000倍,因此Bio-Rad CFX96实时荧光PCR仪在实验室进行基础性科学研究过程中推荐使用。特异性分子鉴定结果表明,本研究所设计的冬虫夏草特异性引物DXF/DXR和TaqMan探针DXP分子标记序列,均只能与正品冬虫夏草样本产生专一性反应,出现典型S型荧光扩增曲线;而不与其混伪品下垂虫草、古尼虫草、蛹虫草、蝉花、凉山虫草和新疆虫草产生交叉反应,由此,可以将冬虫夏草与其混伪品明显区分,具有很强的特异性。另外,鉴于Genesig q16便携式快速分子鉴定系统尺寸小巧,操作简单,升降温速度快实验时间短,可轻松携带,能够随时随地进行实验,所以,在市场需进行快速鉴定研究时推荐使用。

冬虫夏草因资源稀缺,已成为研究热点。DNA条形码技术基于不同物种遗传信息载体DNA差异性来进行物种鉴别,具有稳定性高、重复性好的特点,作为一种物种鉴定的新兴技术,在多个领域具有重要作用和研究价值^[29-32]。ITS是核糖体RNA基因的非转录区,进化速率较快,一般用于研究属间、种间甚至居群间等较低分类等级的系统关系,有研究人员分析该DNA区域同样适用于虫草属的种间鉴别。Xiang等^[18]对冬虫夏草、罗伯茨虫草、下垂虫草、蝉花、蛹虫草、古尼虫草等多种混伪虫草进行了DNA条形码分析,表明它们之间在ITS序列上存在很大差异,准确鉴定了131份冬虫夏草及其常见近缘伪品样本。Zhang等^[2]采用通用引物ITS5F/ITS4R对冬虫夏草及其近缘种提取DNA进行扩增测序后发现,冬虫夏草ITS1序列种内差异不大,而与虫草属其他种种间差异较大,最大种内距离0.039远小于与种间距离0.154;在系统进化树中,冬虫夏草聚为一支,可与其他虫草明确区分,Bootstrap值为100%,达到借助ITS1序列鉴定冬虫夏草及其同属混伪品的目的。Ma等^[33]采用在菌物条形码中应用较多的ITS、18S两种核酸序列对冬虫夏草和新疆虫草进行鉴定研究,对20个样品提取DNA后进行PCR扩增,发现ITS序列作为冬虫夏草和新疆虫草的条形码较18S序列更为适合,ITS序列的扩增与测序成功率为100%,能够从种属水平上将青海冬虫夏草和新疆虫草成功鉴别。虽然ITS和ITS1序列可以鉴别冬虫夏草及其混伪品虫草,但该技术基于DNA序列分析需测序仪

等大型仪器,实验投入大,周期较长,且对NCBI等数据库依赖性强。

此外,基于PCR的分子鉴定技术也被用于冬虫夏草及其混伪品鉴定研究,通过设计高特异性的引物,序列经PCR扩增后,通过琼脂糖凝胶电泳法检测扩增片段的有无,从而实现鉴别物种的目的。Zhang等^[34]根据rDNA中ITS1区序列设计一对特异性引物,通过PCR反应对虫草样品进行扩增,并通过琼脂糖凝胶电泳进行检测,结果冬虫夏草和部分市售虫草样品能扩增出255 bp大小的目的片段,而蛹虫草、人工伪制虫草等样品无扩增条带。Liang等^[35]以冬虫夏草及其伪品的ITS区作为研究对象,设计冬虫夏草的特异性引物,并从DNA提取方法、提取部位、PCR扩增条件等方面进行了考察研究,建立了冬虫夏草真伪鉴别的PCR检测体系,该方法只对冬虫夏草样品在162 bp处有单一的扩增条带,而伪品在相应位置无扩增条带。基于PCR的分子鉴定技术特异性强,省去了测序分析步骤,但电泳图谱分辨率和灵敏度都不高,并且需使用电泳仪及凝胶成像仪等仪器,推广应用有一定的难度,仍需要继续研究和改良。

本研究设计了一对针对冬虫夏草的特异性引物DXF/DXR和TaqMan探针DXP,可以扩增冬虫夏草ITS区独特的130 bp序列,成功用于冬虫夏草及其混伪品下垂虫草、古尼虫草、蛹虫草、蝉花、凉山虫草、新疆虫草的分子鉴定研究,精度高、特异性强。因此,本研究为中药材市场冬虫夏草真伪鉴别提供了一种快速简便、准确有效的技术方法,使冬虫夏草的现场鉴定成为可能。

References

- [1] Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China: Vol I (中华人民共和国药典:一部) [S]. Beijing: China Medical Science Press, 2015: 115.
- [2] Zhang WJ, Wei F, Ma SC, et al. Application of ITS1 barcode sequence for the identification of *Cordyceps sinensis* from its counterfeit species [J]. Chin J Pharm Anal (药物分析杂志), 2015, 35: 1716-1720.
- [3] Winkler D. Yartsa Gunbu (*Cordyceps sinensis*) and the fungal commodification of Tibet's rural economy [J]. Econ Bot, 2008, 62: 291-305.
- [4] Xia EH, Yang DR, Jiang JJ, et al. The caterpillar fungus, *Ophiocordyceps sinensis*, genome provides insights into highland adaptation of fungal pathogenicity [J]. Sci Rep, 2017, 7: 1806.
- [5] Zhang S, Zhang YJ. Molecular evolution of three protein-coding genes in the Chinese caterpillar fungus *Ophiocordyceps sinensis* [J]. Microbiol China (微生物学通报), 2015, 42: 1549-1560.

- [6] Liu Y, Wang XY, Gao ZT, et al. Detection of *Ophiocordyceps sinensis* and its common adulterates using species-specific primers [J]. Front Microbiol, 2017, 8: 1179.
- [7] Xu H, Dong TX, Zhao KJ, et al. Study on identification of *Cordyceps*-a Chinese traditional medicine [J]. Chin Pharm J (中国药学杂志), 2014, 49: 283-286.
- [8] Yang YQ, Duan JH. Discrimination of *Cordyceps Sinensis* from the counterfeit [J]. World J Integr Tradit West Med (世界中西医结合杂志), 2012, 7: 31-33.
- [9] Chen XQ, Liu BL, Zhao ZZ, et al. Studies on macroscopic and microscopic identification of *Cordyceps sinensis* and its counterfeits [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2011, 36: 1141-1144.
- [10] Kang S, Zhang J, Lin RC. Macroscopic and microscopic characteristics of Chinese Caterpillar Fungus [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2013, 48: 428-434.
- [11] Liu HJ, Hu HB, Chu C, et al. Morphological and microscopic identification studies of *Cordyceps* and its counterfeits [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2011, 46: 189-195.
- [12] Hu HK, Xiao L, Zheng BG, et al. Identification of chemical markers in *Cordyceps sinensis* by HPLC-MS/MS [J]. Anal Bioanal Chem, 2015, 407: 8059-8066.
- [13] Zhang JK, Wang P, Wei X, et al. A metabolomics approach for authentication of *Ophiocordyceps sinensis* by liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight mass spectrometry [J]. Food Res Int, 2015, 76: 489-497.
- [14] Zhang WW, Gong T, Han DH. Comparative research on HPLC characteristic fingerprint of cultured *Cordyceps Militarise* and *Cordyceps Sinensis* [J]. Chin J Inf Tradit Chin Med (中国中医药信息杂志), 2015, 22: 92-96.
- [15] Qian ZM, Sun PP, Li WQ, et al. HPLC characteristics of *Ophiocordyceps sinensis* [J]. Mod Tradit Chin Med Mater Med-World Sci Technol (世界科学技术—中医药现代化), 2014, 16: 279-283.
- [16] Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, et al. Biological identifications through DNA barcodes [J]. Proc R Soc Lond B, 2003, 270: 313-321.
- [17] Wang W, Wang LL, Xiong LL, et al. ITS sequences as a DNA barcode in the identification and phylogenetics of *Cordyceps* [J]. Jiangsu J Agric Sci (江苏农业学报), 2012, 28: 680-682.
- [18] Xiang L, Song JY, Xin TY, et al. DNA barcoding the commercial Chinese caterpillar fungus [J]. FEMS Microbiol Lett, 2013, 347: 156-162.
- [19] Wang YQ, Xue XH. Progress and application of real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction [J]. Bull Biol (生物学通报), 2016, 51: 1-6.
- [20] An GL. The principle and application of real-time fluorescent quantitative PCR [J]. Chin Mod Educ Equip (中国现代教育装备), 2018, 301: 19-21.
- [21] Liu ZY, Yao YJ, Liang ZQ, et al. Molecular evidence for the anamorph-teleomorph connection in *Cordyceps sinensis* [J]. Mycol Res, 2001, 105: 827-832.
- [22] Chen YQ, Ning W, Qu LH, et al. Determination of the anamorph of *Cordyceps sinensis* inferred from the analysis of the ribosomal DNA internal transcribed spacers and 5.8S rDNA [J]. Biochem Syst Ecol, 2001, 29: 597-607.
- [23] Zhang YJ, Xu LL, Zhang S, et al. Genetic diversity of *Ophiocordyceps sinensis*, a medicinal fungus endemic to the Tibetan Plateau: implications for its evolution and conservation [J]. BMC Evol Biol, 2009, 9: 290.
- [24] Chen YQ, Hu B, Xu F, et al. Genetic variation of *Cordyceps sinensis*, a fruit-body-producing entomopathogenic species from different geographical regions in China [J]. FEMS Microbiol Lett, 2004, 230: 153-158.
- [25] Chen SL, Yao H, Han JP, et al. Principles for molecular identification of traditional Chinese materia medica using DNA barcoding [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2013, 38: 141-148.
- [26] Jiang WC, Yue SW, Jiang H, et al. Application and research progress of TaqMan probe real time PCR [J]. Clin Lab J (临床检验杂志), 2015, 4: 797-805.
- [27] He GL, Chen N, Liu P, et al. Identification of Bird's Nest using TaqMan real-time quantitative PCR [J]. Lett Biotechnol (生物技术通讯), 2015, 26: 111-115.
- [28] Wu D, Guo Q. Detection of other animal species in *Placenta Hominis* by using TaqMan real time PCR [J]. J Chin Med Mater (中药材), 2017, 40: 38-41.
- [29] Chen SL, Pang XH, Song JY, et al. A renaissance in herbal medicine identification: from morphology to DNA [J]. Biotechnol Adv, 2014, 32: 1237-1244.
- [30] Li XW, Yang Y, Henry RJ, et al. Plant DNA barcoding: from gene to genome [J]. Biol Rev, 2015, 90: 157-166.
- [31] Chen XC, Liao BS, Song JY, et al. A fast SNP identification and analysis of intraspecific variation in the medicinal *Panax* species based on DNA barcoding [J]. Gene, 2013, 530: 39-43.
- [32] Hou DY, Song JY, Yao H, et al. Molecular identification of Corni Fructus and its adulterants by ITS/ITS2 sequences [J]. Chin J Nat Med, 2013, 11: 121-127.
- [33] Ma HM, Yu J, Dai M, et al. Study on DNA barcoding technology of Qinghai *Cordyceps sinensis* and Xinjiang *Cordyceps grsacilis* for identification [J]. Mod Tradit Chin Med Mater Med-World Sci Technol (世界科学技术—中医药现代化), 2016, 18: 826-832.
- [34] Zhang XK, Liu TH. Studies on identification method by PCR of specificity of aweto [J]. Chin Med Pharm (中国医药科学), 2015, 5: 55-57.
- [35] Liang HX, Wang W, Duan QZ, et al. A new method based on PCR for identification of *Cordyceps sinensis* [J]. J Chin Med Mater (中药材), 2018, 41: 554-558.