

美洲大蠊 TaqMan 探针实时荧光 PCR 方法的建立及应用

刘丽¹, 解盈盈², 孙仟², 林林², 谭乐俊², 陈娟¹, 赵淑秀¹, 林永强^{2*}, 汪冰^{2*} (1. 山东中医药大学, 济南 250355; 2. 山东省食品药品检验研究院, 国家药监局胶类产品质量评价重点实验室, 山东省中药标准创新与质量评价工程实验室, 济南 250101)

摘要:目的 本研究旨在建立一种具有高特异性的 TaqMan 探针实时荧光聚合酶链式反应(PCR)方法,用于美洲大蠊药材以及中药饮片美洲大蠊粉的鉴别。方法 依据美洲大蠊基因组序列的特点,设计出适用于实时荧光 PCR 检测的特异性引物和探针,并对探针浓度、循环数和退火温度进行优化,建立能够快速鉴别美洲大蠊的 TaqMan 探针实时荧光 PCR 最佳方法,进一步验证该方法的特异性和灵敏度。结果 研究表明特异性引物和探针仅对美洲大蠊药材以及美洲大蠊粉有特异性扩增,对杜比亚蟑螂、土鳖虫、德国小蠊和九香虫均未扩增出荧光曲线。结论 所建立的 TaqMan 探针实时荧光 PCR 法能够准确、快速对美洲大蠊及常见混伪品进行鉴别,为美洲大蠊的鉴别提供一种专属性更强的技术手段参考。

关键词:美洲大蠊;实时荧光聚合酶链式反应;TaqMan 探针;中药饮片

doi:10.11669/cpj.2024.05.005 中图分类号:R917 文献标志码:A 文章编号:1001-2494(2024)05-0409-07

Establishment and Application of TaqMan Real-Time PCR Method for *Periplaneta americana*

LIU Li¹, XIE Yingying², SUN Qian², LIN Lin², TAN Lejun², CHEN Juan¹, ZHAO Shuxiu¹, LIN Yongqiang^{2*}, WANG Bing^{2*} (1. Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China; 2. NMPA Key Laboratory for Quality Evaluation of Gelatin Products, Shandong Engineering Laboratory for Standard Innovation and Quality Evaluation of TCM, Shandong Institute for Food and Drug Control, Jinan 250101, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a highly specific TaqMan real-time PCR method for the identification of *Periplaneta americana* medicinal materials and *Periplaneta americana* powder. **METHODS** According to the characteristics of genome sequence of *Periplaneta americana*, specific primers and probes suitable for real-time PCR detection were designed, and the probe concentration, cycle times and annealing temperature were optimized to establish the best TaqMan real-time PCR method of *Periplaneta americana*. **RESULTS** The specific primers and probes were only specifically amplified from *Periplaneta americana* medicinal materials and *Periplaneta americana* powder, and no fluorescence curves were amplified from *Blaptica dubia*, *Eupolyphaga Sinensis* W. *Blattella germanica* and *Aspongopus chinensis* Dallas. **CONCLUSION** The established TaqMan real-time PCR method can accurately and rapidly identify *Periplaneta americana* and common counterfeit products, providing a more specific technical reference for the identification of *Periplaneta americana*.

KEY WORDS: *Periplaneta americana*; real-time PCR; TaqMan probe; herbal decoction piece

美洲大蠊(*Periplaneta americana*)为昆虫纲有翅亚纲蜚蠊目(Blattaria)蜚蠊科(Blattidae)大蠊属(*Periplaneta*)昆虫,俗名“蟑螂”。作为传统中药材,美洲大蠊已具有上千年用药历史,最早记载于《神农本草经》^[1]。现代研究表明具有抗炎、抗肿瘤、增强机体免疫能力^[2]等功效,虽暂时未被录入2020年版《中国药典》,但已被湖南、云南、四川等多省中药材标准单独收录。美洲大蠊常以干燥虫体为中药原料,其制剂也逐渐应用于临床^[3],市场

上有不少与美洲大蠊形态特征近似的品种,如德国小蠊(*Blattella germanica*)、土鳖虫(*Eupolyphaga Sinensis* W.)及杜比亚蟑螂(*Blaptica dubia*)等,容易出现用药掺假现象,药材的质量均一性和稳定性难以得到保障。美洲大蠊粉为美洲大蠊干燥虫体经炮制而成的中药饮片,能够健脾消痞,活血通脉,利水消肿,敛疮生肌。因美洲大蠊常以粉末形式入药,通过外观形状特征难以辨别其真伪,而药材的真伪优劣会直接影响到用药的安全性和治疗

基金项目:山东省重点研发计划(重大科技创新工程)项目资助(2021CXGC010511);泉城产业领军人才支持计划创新团队项目资助(MRJT2105)

作者简介:刘丽,女,硕士研究生 研究方向:药物分析研究 * 通讯作者:林永强,男,博士,主任药师 研究方向:药品质量控制
Tel:(0531)81216521;汪冰,女,硕士,主任药师 研究方向:中药质量控制与产业化 Tel:(0531)81216521

的有效性,因此,需要提升与完善美洲大蠊质量控制。

现在已研究的美洲大蠊鉴别方法有性状鉴别、显微鉴别、光谱鉴别、色谱鉴别^[4]和 DNA 条形码分子鉴别^[5]等。但对美洲大蠊鉴别方法、质量评价方式、质量控制标准没有统一规定,各省中药材标准对美洲大蠊的鉴别,多集中于美洲大蠊中丙氨酸的薄层色谱法鉴别,鉴别方式专属性不强。

随着分子生物学技术的不断发展,分子鉴定技术在中药材鉴定领域得到了广泛应用,如 DNA 条形码、聚合酶链式反应(PCR)、PCR-RFLP 等技术都在药用植物中有所应用^[6]。实时荧光 PCR 鉴别方法是基于特异性单核苷酸多态性(SNP)位点差异,设计特异性引物及探针,因不同物种间 DNA 具有高度保守的特性,该方法具有专属性较强、结果准确、耐用性好等特点^[7]。

本研究采用 TaqMan 探针实时荧光 PCR 技术,基于物种特异性核 DNA 片段序列,设计具有高特异性的引物和探针,在实际样品检测中主要用于美洲大蠊的定性检测。该方法不仅能够鉴别美洲大蠊成分,还可区分市场中流通的美洲大蠊混伪品。同时该方法也可用于中药饮片美洲大蠊粉的鉴别,增强美洲大蠊粉质量标准的可控性,实现了美洲大蠊及常见混伪品的快速鉴别,同时为完善美洲大蠊的质量评价体系提供技术参考。

1 材料与方法

1.1 样品

蜚蠊对照药材(批号:121696-201401,中国食品药品检定研究院);美洲大蠊药材、中药饮片美洲大蠊粉、杜比亚蟑螂药材(济南三源药业有限公司);土鳖虫、德国小蠊、九香虫(安徽亳州中药材市场)。

1.2 仪器与试剂

Applied Biosystems 实时荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司);P330 超微量紫外分光光度计(德国 IM-PLLEN 公司);CP225D 电子分析天平(德国 Sartorius 公司);5424 离心机(德国 Eppendorf 公司)。

血液/细胞/组织基因组 DNA 提取试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司,DP304-03];BestarT-MqPCR Master Mix(美国 DBI 公司,P-2025259),引物和探针(上海生工生物工程有限公司);无水乙醇、三氯甲烷均为分析纯。

1.3 引物、探针的设计

GenBank 数据库中下载美洲大蠊以及常见混伪品的 COI 序列,与测序获得的序列共同使用 BioEdit 软件进行同源对齐。寻找发现 520,571,634 bp 等多个差异性 SNP 位点(图 1),如美洲大蠊在 520 bp 处为 C,其他物种为 T,且种内高度保守。在种内保守、种间差异区域设计引物和探针,其中探针 5'端标记荧光素基团 FAM,3'端标记淬灭基团 BHQ1,通过 Primer Premier 5.0 软件设计美洲大蠊特异性鉴别引物和 TaqMan 探针(表 1),引物和探针位置见图 1,引物和探针委托上海生工生物工程有限公司合成。

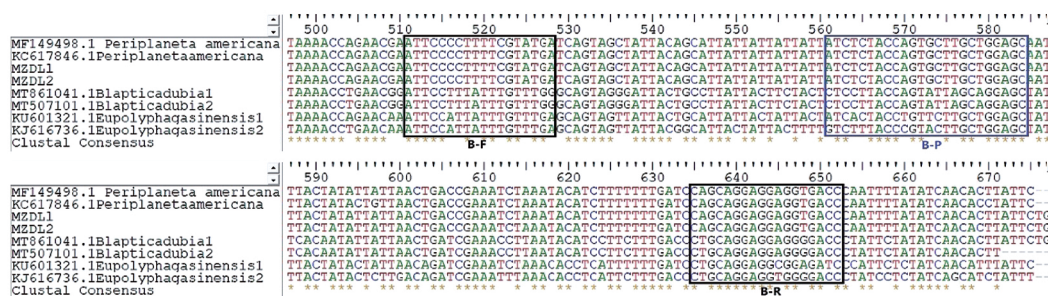


图 1 美洲大蠊、杜比亚蟑螂等 DNA 序列比对图

Fig. 1 Comparison of DNA sequences of *Periplaneta americana* and *Blaptica dubia*

表 1 美洲大蠊特异性引物和探针序列

Tab. 1 The specific primers and probe sequences of *Periplaneta americana*

Primers and probes	Sequence (5'-3')
B-F	5'- ATCCCTTTTCGTTATGA-3'
B-R	5'- GGTCACCTCCTCTGCTG-3'
B-P	5'- FAM- ATCTCTACCAGTCTGCTGGAGC -3'-BHQ1

1.4 样品 DNA 提取

分别取美洲大蠊和杜比亚蟑螂等药材,用体积分数 75% 乙醇擦拭干净,晾干,置乳钵中研磨成极细粉。取样品粉末约 40 mg,置 1.5 mL 离心管中,按照血液/细胞/组织基因组 DNA 提取试剂盒使用说明提取 DNA,用超微量紫外分光光度计测定 DNA

的浓度,吸光度在 0.01 ~ 1.5 之间,测量结果可靠, DNA 的 A260/A280 比值在 1.8 ~ 2.0 之间,表明提取纯度较高,没有蛋白质或 RNA 的干扰,后置于一 20 °C 冰箱备用。取蜚蠊对照药材研磨成极细粉,同方法制备成阳性对照溶液。

1.5 荧光 PCR 方法的建立

PCR 反应体系:总体积为 20 μL ,包括 Bestar TMq PCR Master Mix 10 μL ,探针 1 μL ,上下游引物各 1 μL ,模板 DNA 溶液 0.5 μL ,灭菌超纯水 6.5 μL 。平行设 3 个重复,Ct 值取 3 个重复的平均值作为最终结果。

实时荧光 PCR 反应程序:95 °C 预变性 3 min; 95 °C 变性 10 s,60 °C 退火 34 s,40 个循环。

实验应同时满足以下要求:空白对照无荧光对数增长,相应的 Ct 值 >40.0 或无法确定;阳性对照有荧光对数增长,且相应的 Ct 值小于 30.0。

在符合以上要求的情况下,结果判定:无荧光对数增长,或样品与阳性对照的 Ct 值之差 (ΔCt) 绝对值 >4.0,可判定结果为阴性,即未检出美洲大蠊;有荧光对数增长,且 ΔCt 绝对值 ≤ 4.0 ,可判定结果为阳性,即检出美洲大蠊。

1.6 特异性试验

将“1.4”项下提取的美洲大蠊样品和其他样品的 DNA 作为模板。按照“1.5”项反应体系和条件进行扩增,以水作为空白对照,验证引物和探针对美洲大蠊样品扩增的特异性。

1.7 灵敏度检测

选取美洲大蠊 DNA 样本,用灭菌超纯水进行逐级 5 倍梯度稀释,共稀释成 6 个浓度梯度,每个梯度设 3 个平行实验,按照“1.5”项中反应体系和条件扩增,测试该方法的灵敏度。

1.8 检测限

Ct 值比较法是实时荧光 PCR 的一种相对定量方法,通过标准品和样品的 Ct 值之差(即 ΔCt)来计算相对量。PCR 呈指数扩增,Ct 值是到达设定的阈值荧光信号时所经历的循环数,样品中的目的 DNA 所占比例用 T 表示(公式 1)。

$$T\% = 2^{-\Delta\text{Ct绝对值}} \times 100\% \quad \text{公式(1)}$$

在杜比亚蟑螂中掺入不同比例的蜚蠊对照药材,蜚蠊掺入比例分别为 3%、5%、10%、30%、50%。利用优化后的 PCR 扩增条件进行扩增,并根据 Ct 值比较法进行相对定量测定。

1.9 实际样品检测

采用建立的方法和条件对收集到的样品进行实

时荧光 PCR 反应,以验证该方法在实际检测工作中的使用价值。

2 结果

2.1 引物和探针特异性

引物和探针的选择是本实验的关键步骤,将测序获得美洲大蠊的 COI 序列在 NCBI 数据库进行 BLAST 同源性比对分析,测序结果与美洲大蠊 (*Periplaneta americana*, GenBank 序列号 MF149498.1) 相似度达到 100%,同源性分析表明测序结果准确可靠,能够鉴别美洲大蠊。利用本研究设计的引物探针对蜚蠊对照药材、美洲大蠊以及杜比亚蟑螂等不同药材的 DNA 进行实时荧光 PCR 检测,结果表明引物和探针仅对蜚蠊对照药材和美洲大蠊药材有 S 型荧光扩增曲线,杜比亚蟑螂、土鳖虫等药材均无 S 型荧光扩增曲线,说明本研究设计的引物和探针用于美洲大蠊检测具有良好的特异性和有效性,可以用于下一步实验,见图 2。

2.2 荧光 PCR 方法优化

为提高扩增效率,保证 PCR 反应完全,分别对探针浓度(2.5 和 5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)、循环数(35 和 40 个循环)和退火温度(60 和 65 °C)进行优化。

当探针浓度为 5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,实时荧光扩增曲线强度较高;增加循环数,实时荧光扩增效率及 PCR 反应完成度明显提高;退火温度是指引物和模板结合时候的温度,当退火温度为 65 °C 时,荧光曲线出现折线形且无荧光对数增长,分析原因可能因为 65 °C 与当前引物中 GC 含量差异较大,不能成功扩增,结果见图 3。

通过考察影响实时荧光 PCR 反应的关键因素,最终确定美洲大蠊实时荧光 PCR 反应体系:总体积为 20 μL , Bestar TMq PCR Master Mix 10 μL ,探针(5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 1 μL ,上下游引物(2.5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 各 1 μL ,模板 DNA 溶液 0.5 μL ,灭菌超纯水 6.5 μL 。

2.3 方法灵敏度

用灭菌超纯水将提取的美洲大蠊 DNA(初始浓度为 168 $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) 5 倍梯度稀释成 6 个系列梯度,稀释后浓度分别为 0.053 76 ~ 168 $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$,取 0.5 μL 作为模板用于灵敏度检测,结果表明 DNA 原液及稀释液样品均得到典型的扩增曲线。以扩增曲线的 Ct 值为纵坐标,相应浓度的 log 值为横坐标,绘制标准曲线(图 4)。所得线性方程为 $y = -3.5856x + 31.011$,标准曲线相关系数为

0.997 8,具有良好的线性关系,扩增效率为 90.06%, 表明该方法具有较高灵敏度和有效性。

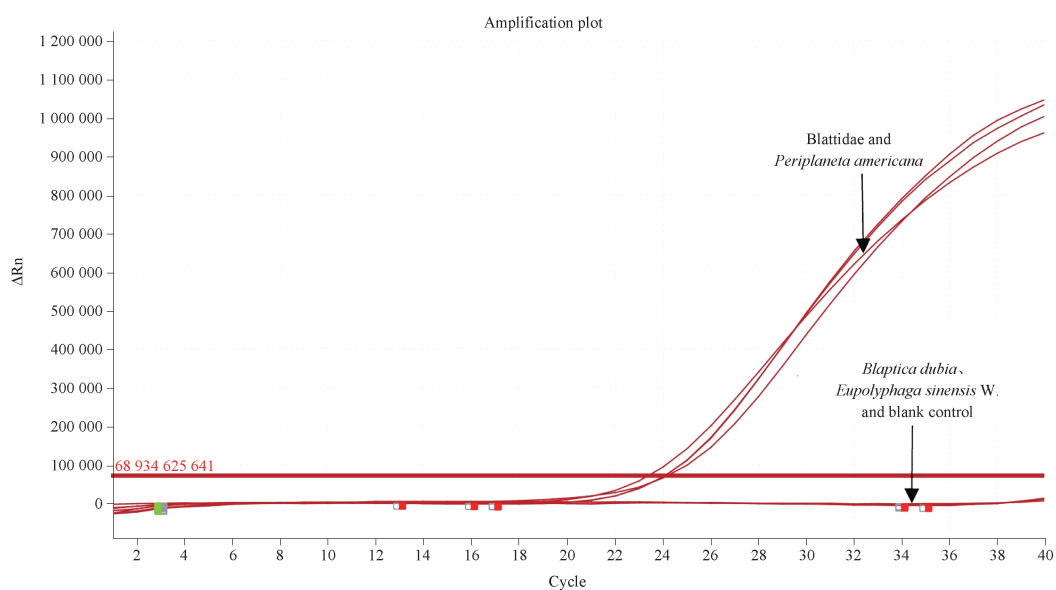
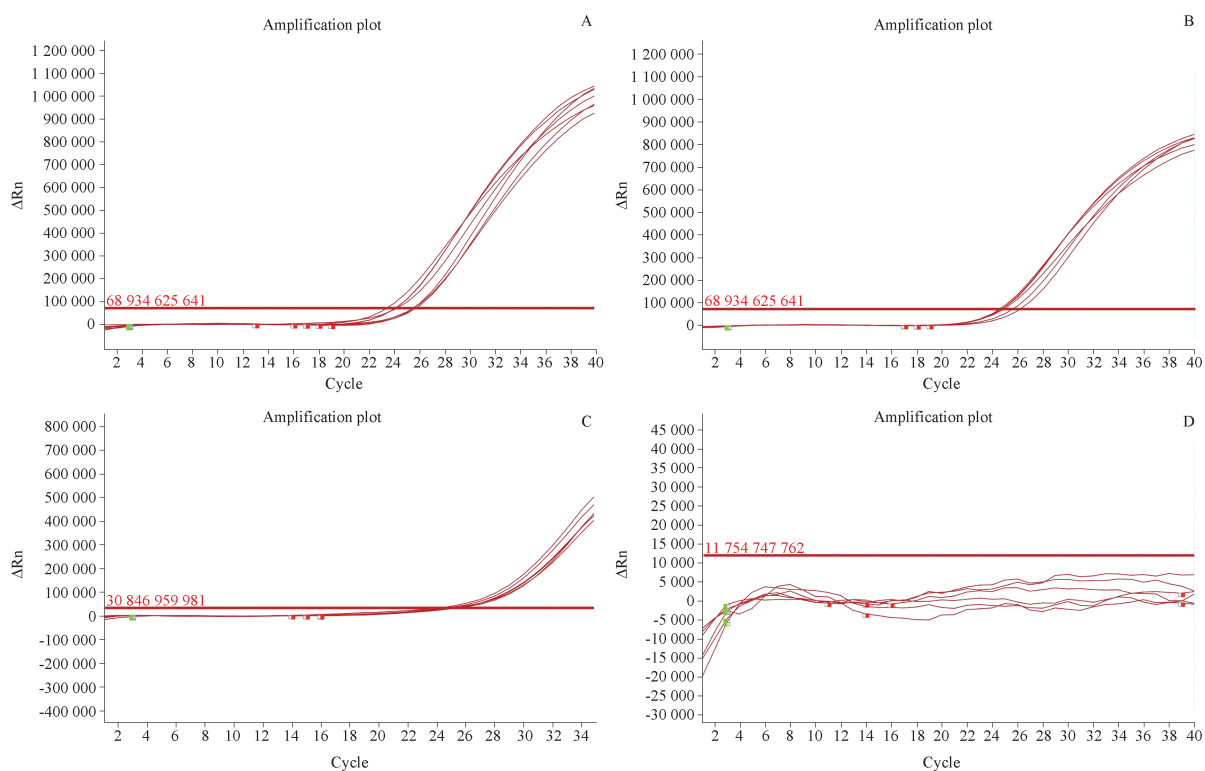


图2 美洲大蠊特异性扩增曲线

Fig.2 Specific amplification curves of *Periplaneta americana*

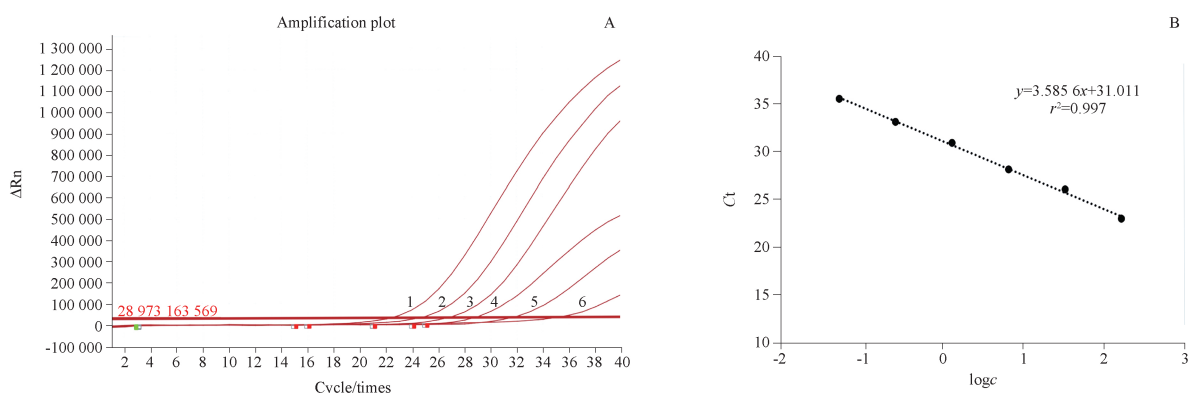


A - 探针浓度: $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 循环数: 40, 退火温度: $60 \text{ }^\circ\text{C}$; B - 探针浓度: $2.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 循环数: 40, 退火温度: $60 \text{ }^\circ\text{C}$; C - 探针浓度: $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 循环数: 35, 退火温度: $60 \text{ }^\circ\text{C}$; D - 探针浓度: $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 循环数: 40, 退火温度: $65 \text{ }^\circ\text{C}$ 。

A - probe concentration: $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, cycle number: 40, annealing temperature: $60 \text{ }^\circ\text{C}$; B - probe concentration: $2.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, cycle number: 40, annealing temperature: $60 \text{ }^\circ\text{C}$; C - probe concentration: $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, cycle number: 35, annealing temperature: $60 \text{ }^\circ\text{C}$; D - probe concentration: $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, cycle number: 40, annealing temperature: $65 \text{ }^\circ\text{C}$.

图3 不同探针浓度、循环数、温度下的美洲大蠊扩增曲线

Fig.3 Amplification curves of *Periplaneta americana* at different probe concentrations, cycles and temperatures



A - 美洲大蠊灵敏度扩增曲线; B - 美洲大蠊标准曲线; A 中 1~6 分别为初始浓度 $168 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 的 6 级 5 倍稀释 DNA 样品的扩增曲线。

A - sensitivity amplification curve of *Periplaneta americana*; B - standard curve; Amplification curves of 6-level 5-fold diluted DNA samples with initial concentration of $168 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ were obtained from 1 to 6.

图 4 美洲大蠊 DNA 溶液灵敏度检测结果

Fig. 4 Sensitivity test results of *Periplaneta americana*

2.4 重复性和精密度

按确定的最佳方法和条件对美洲大蠊进行重复性和精密度测定, 平行提取 6 份美洲大蠊药材, 平均 Ct 值为 26.751, RSD 为 1.35%, 同一份美洲大蠊 DNA 样品, 设 6 个复孔, 平均 Ct 值为 26.575, 相对标准偏差 (RSD) 为 1.07%, 实验结果表明该方法具有良好的重复性和精密度。

2.5 检测限

在杜比亚蟑螂中掺入不同比例的蜚蠊对照药材进行实时荧光 PCR 方法检测限分析, 通过 Ct 值之差的方法计算掺伪比例, 以计算值与预期值比值的百分

数作为回收率, 蜚蠊掺伪定量检测的回收率在 90.93% ~ 104.81% 之间(表 2)。

理论上当 ΔCt 绝对值为 4 时, 掺伪比例为 6.25%, 当 ΔCt 绝对值为 5 时, 掺伪比例为 3.13%。实际检测中, 运用 Ct 值比较法对不同比例的蜚蠊对照药材掺伪品进行了相对定量检测, 计算结果与预期的结果相仿, 蜚蠊掺入比例为 3% 时仍能稳定检出, 掺入比例为 5% 时, 其 ΔCt 绝对值在 4 ~ 5 之间(表 2)。综合考虑到药材及饮片的市场现状和实验环境等因素带来的误差, 将 ΔCt 绝对值 ≤ 4 作为检出美洲大蠊的判断依据。

表 2 蜚蠊掺伪定量检测结果

Tab. 2 Quantitative detection results of *Blattidae* adulteration

Proportion of adulteration/%	Ct value	Absolute value of ΔCt	Test value/%	Recovery rate/%
3	31.319	4.991	3.14	104.81
5	30.600	4.273	5.17	103.47
10	29.787	3.459	9.09	90.93
30	28.084	1.756	29.61	98.69
50	27.306	0.978	50.77	101.55
100	26.328			

2.6 实际样品测定

在实际检测工作中, 将实验室收集的 4 批美洲大蠊药材、10 批中药饮片美洲大蠊粉进行 DNA 提取, 然后按照上述建立的美洲大蠊 TaqMan 探针实时荧光 PCR 方法进行检测。结果表明, 4 批美洲大蠊药材和 10 批美洲大蠊粉均有荧光扩增曲线, 且与阳性对照的 Ct 值之差绝对值 ≤ 4.0 (表 3), 检测结果为阳性, 表明本研究建立的荧光 PCR 方法可以准确地用于市

售美洲大蠊以及美洲大蠊粉的实际检测。另一方面, 也将实验室收集到的市场上常见混伪品进行检测, 结果显示, 杜比亚蟑螂、土鳖虫、德国小蠊和九香虫则无荧光扩增曲线, 检测结果为阴性, 这也进一步表明本研究所建立的检测方法具有良好的特异性(图 5)。本研究所建立的实时荧光 PCR 检测方法快速、可靠且稳定, 可以用于美洲大蠊药材以及中药饮片美洲大蠊粉的快速检测。

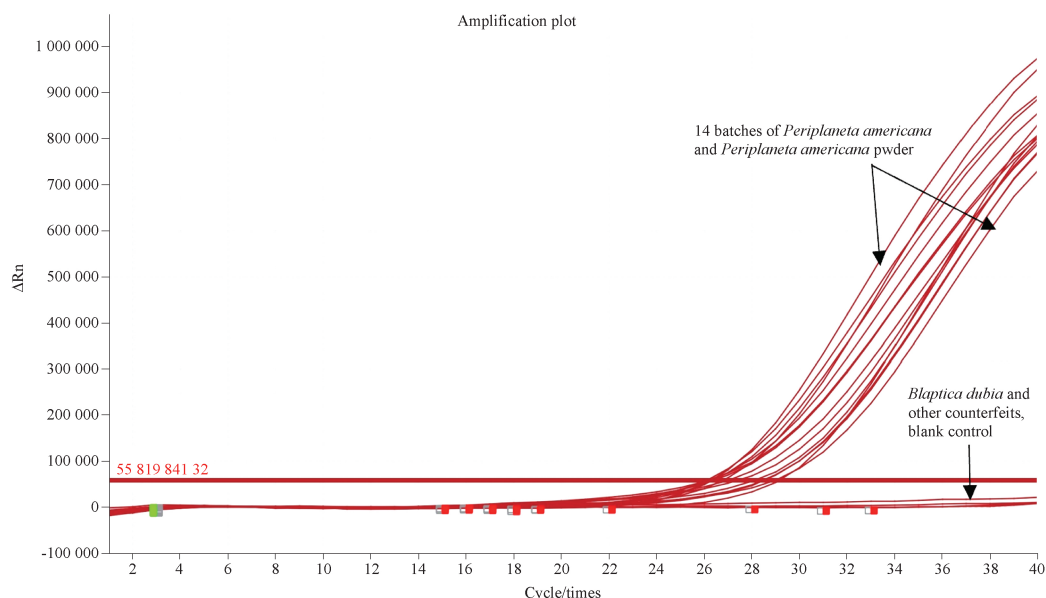


图5 美洲大蠊样品及其常见伪品实时荧光扩增曲线

Fig. 5 Real-time PCR amplification curves of *Periplaneta americana* samples and its counterfeits

表3 美洲大蠊样品及其常见伪品信息和 Ct 值

Tab. 3 Information and Ct values of *Periplaneta americana* samples and its counterfeits

No.	Sample	Batch No.	Ct value
1	<i>Periplaneta americana</i>	211219	26.009
2	<i>Periplaneta americana</i>	220126	26.681
3	<i>Periplaneta americana</i>	211132	26.147
4	<i>Periplaneta americana</i>	210918	26.307
5	<i>Periplaneta americana</i> powder	220101	29.806
6	<i>Periplaneta americana</i> powder	220102	26.295
7	<i>Periplaneta americana</i> powder	220103	28.539
8	<i>Periplaneta americana</i> powder	220201	27.733
9	<i>Periplaneta americana</i> powder	220301	26.030
10	<i>Periplaneta americana</i> powder	211201	27.181
11	<i>Periplaneta americana</i> powder	211202	28.913
12	<i>Periplaneta americana</i> powder	211203	28.367
13	<i>Periplaneta americana</i> powder	211103	28.009
14	<i>Periplaneta americana</i> powder	211102	26.611
15	<i>Blaptica dubia</i>	/	-
16	<i>Eupolyphaga Sinensis</i> W.	/	-
17	<i>Blattella germanica</i>	/	-
18	<i>Aspongopus chinensis</i> Dallas	/	-

注: - - 无荧光扩增曲线; / - 无批号。

Note: - - no fluorescence amplification curve; / - no batch number.

3 讨论

美洲大蠊作为一种传统动物药,在临床上有其独特疗效,具有抑菌^[8]和促进伤口愈合方面^[9]等显著疗效。近几年,国内外学者对美洲大蠊的关注日益增多,国内报道较国外多,但主要集中在其疗效机制以及药理作用^[10]。随着需求量的增加,对美洲大蠊质

量控制的首要任务是品种鉴定和真伪鉴别,但目前尚未见统一的质量控制标准,已有的鉴定方法未能结合美洲大蠊自身特性,专属性较低,因此,需要完善并提高其质量评价体系,进一步推进美洲大蠊药材质量评价的科学性与有效性,保障临床用药的安全性。

对美洲大蠊进行研究时,应考虑动物药的特殊性,在传统鉴别方法的基础上,结合现代新方法新技术建立专属性较强的鉴定方法。分子生物学在中药领域的应用逐渐广泛,实时荧光定量 PCR 作为基因检测的重要手段,以不同物种间遗传信息的差异作为研究点,具有较高的特异性和灵敏度,受 DNA 杂质的影响较小^[11]。动物药的分子生物学鉴别多采用线粒体基因序列 COI 片段^[12-14],物种水平的鉴定效率较高。

本研究设计出有效性和专属性较强的引物和探针,通过引物、探针组合的设计,建立了一种具有高度可复制性和良好特异性的美洲大蠊 TaqMan 探针实时荧光 PCR 检测方法,并对该检测方法的关键参数进行了优化和验证,使得方法具有较高的灵敏度。利用 PCR 技术的特异性强、自动化程度高、检测周期短等特点,该方法不仅能对完整的美洲大蠊药材进行鉴定,还能对其破碎的组织、粉末等进行准确有效的鉴定,可避免传统 PCR 的污染问题,提高鉴别水平,在实际样品检测中主要应用于美洲大蠊的定性检测。实验通过制备不同比例的蜚蠊对照药材掺伪品,并运用 Ct 值比较法对

这5种比例的自混掺伪样进行了相对定量检测,计算结果与预期的结果相仿,证明本方法有较高的精确性和较好的实用性,也可用于美洲大蠊的相对定量检测。实验结果表明,该方法可以成功地用于鉴定美洲大蠊,并且能够实时监测实验结果,操作更加简单快捷,大大缩短了检测周期,还可应用于检测中药饮片美洲大蠊粉,具有较强的实用价值。

REFERENCES

- [1] BAI Y P, LIU H B, REN Y, *et al.* Herbal textual research of *Blattidae* [J]. *Sichuan J Zool*(四川动物),2020,39(1):116-120.
- [2] GAO J, SHEN Y M, YUE B S. Research progress on pharmacological effects and clinical efficacy of *Periplaneta americana* [J]. *Pharmacol Clin Chin Mater Med*(中药药理与临床),2018,34(4):203-208.
- [3] LÜ N. Study on the chemical constituents of *Periplaneta americana* and the quality control of Kangfuxin Liquid [D]. Beijing: Peking Union Medical College,2017.
- [4] DENG Y Q, ZENG C J, MA Q, *et al.* Research progress on quality evaluation of *Periplaneta americana* [J]. *Asia Pac Tradit Med*(亚太传统医药),2019,15(8):203-207.
- [5] SU Y, XU L C. Pharmacognosy and molecular pharmacognosy identification of *Periplaneta americana* [J]. *Shandong Sci*(山东科学),2021,34(3):19-25.
- [6] LI K F, WANG F, DING W, *et al.* Application of fluorescence quantitative PCR in gene expression and identification of medicinal plants [J]. *World Chin Med* (世界中医药),2022,17(21):3101-3106, 3111.
- [7] SINGH C, ROY-CHOWDHURI S. Quantitative real-time PCR: recent advances[J]. *Methods Mol Biol*, 2016, 1392:161-176.
- [8] BASSERI H, BAKHTIYARI R, HASHEMI S J, *et al.* Antibacterial/antifungal activity of extracted chitosan from American cockroach (Dictyoptera: Blattidae) and German cockroach (Blattodea: Blattellidae). *J Med Entomol*, 2019, 56(5):1208-1214.
- [9] ZJU J J, YAO S, GUO X, *et al.* Bioactivity-guided screening of wound-healing active constituents from American cockroach (*Periplaneta americana*) [J]. *Molecules*, 2018, 23(1):101. DOI: 10.3390/molecules23010101.
- [10] ZENG C, LIAO Q, HU Y, *et al.* The role of *Periplaneta americana* (Blattodea: Blattidae) in modern versus traditional Chinese medicine[J]. *J Med Entomol*, 2019,56(6):1522-1526.
- [11] ZHOU L Y, LIU T, WAGN S, *et al.* Research progress of real-time fluorescent quantitative PCR and its application in the field of traditional Chinese medicine [J]. *Mod Chin Med* (中国现代中药),2016,18(2):246-251, 262.
- [12] PEI S Q, YANG B. Establishment of real-time fluorescence quantitative PCR rapid identification method for *Agkistrodon acutus* [J]. *Qual Saf Insp Test* (质量与安全检验检测),2022,32(3):11-14,30.
- [13] HE Y S, LIAN X C, GAO L H, *et al.* Study on authenticity identification of bear bile powder based on fluorescence PCR technology [J]. *J Chin Med Mater*(中药材),2018,41(11):2534-2536.
- [14] LI Y, LIU Y Y, BIAN R R, *et al.* Study on the method of multiple real-time fluorescent PCR to identify the source of snakes [J]. *Food Drug*(食品与药品),2016,18(4):246-251.

(收稿日期:2023-06-12)