

· 药 学 基 础 ·

蝙蝠蛾拟青霉及金水宝胶囊的 DNA 条形码鉴定

赵小惠^{1,2}, 刘霞¹, 钟承赞³, 杨明³, 曾乐³, 向丽^{2*}, 陈士林^{2*}

- (1. 武汉理工大学 化学化工与生命科学学院, 武汉 430070;
2. 中国中医科学院 中药研究所 中药鉴定与安全性评估重点实验室, 北京 100700;
3. 江西国药有限责任公司, 南昌 330052)

[摘要] 目的: 由于传统方法对发酵菌丝体鉴定困难,采用 DNA 条形码技术对金水宝胶囊原料菌种蝙蝠蛾拟青霉及相关产品进行快速鉴定。方法: 采用内转录间隔区(ITS)序列对收集的蝙蝠蛾拟青霉及其易混淆物种共 8 种 168 份样品进行条形码鉴定,并基于 ITS 序列设计蝙蝠蛾拟青霉特异引物对相关产品进行快速鉴定。结果: 44 份不同来源蝙蝠蛾拟青霉的 ITS 序列长度均为 499 bp,无变异位点。基于 ITS 序列可对蝙蝠蛾拟青霉及其 7 种易混伪品进行区别;通过 ITS 序列设计的蝙蝠蛾拟青霉特异性引物(ITS-BF/ITS-BR)可特异扩增得到长度 102 bp 的短片段,采用该片段可快速鉴别蝙蝠蛾拟青霉与其他虫草菌,并可区分市场上相关产品。结论: 通过 ITS 序列及特异性引物可以实现蝙蝠蛾拟青霉及其相关产品的快速鉴定,为金水宝胶囊的生产及质量控制提供参考。

[关键词] 蝙蝠蛾拟青霉; DNA 条形码; 内转录间隔区 (ITS); 特异引物; 冬虫夏草; 金水宝胶囊; 发酵

[中图分类号] R22;R931;R28;Q523 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2020)08-0156-07

[doi] 10. 13422/j. cnki. syfjx. 20200948

[网络出版地址]

[网络出版时间]

DNA Barcoding Identification of *Paecilomyces hepiali* and Jinshuibao Capsules

ZHAO Xiao-hui^{1,2}, LIU Xia¹, ZHONG Cheng-zan³, YANG Ming³, ZENG Le³,
XIANG Li^{2*}, CHEN Shi-lin^{2*}

- (1. School of Chemistry, Chemical Engineering and Life Sciences, Wuhan University of
Technology, Wuhan 430070, China;
2. Key Laboratory of Beijing for Identification and Safety Evaluation of Chinese Medicine, Institute of
Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;
3. Jiangxi Guoyao Pharmaceutical Co. Ltd., Nanchang 330052, China)

[Abstract] **Objective:** Because traditional methods are difficult to identify the fermentation mycelium, DNA barcoding technology was used to quickly identify the raw material strain *Paecilomyces hepiali* of Jinshuibao capsules and related products. **Method:** A total of 168 samples of 8 species of *P. hepiali* and its confusable species were identified by internal transcribed spacer (ITS) sequences, and based on the ITS sequences, *P. hepiali* specific primers were designed to quickly identify the related products. **Result:** The length of ITS sequences in 44 *P. hepiali* samples from different sources was 499 bp and there was no mutation site. It was shown that *P. hepiali*

[收稿日期] 20191205(002)

[基金项目] 国家中药标准化项目(ZYBZH-C-JX-39);国家自然科学基金项目(U1812403-1);国家“重大新药创制”科技重大专项(2018ZX09201009-006-001);中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(ZZ13-YQ-102)

[第一作者] 赵小惠,在读硕士,从事中药资源研究,E-mail:15527543594@163.com

[通信作者] * 向丽,博士,副研究员,从事中药资源与鉴定研究,E-mail:lxiang@icmm.ac.cn;

* 陈士林,博士,教授,博士生导师,从事中药资源学研究,E-mail:slchen@icmm.ac.cn

could be distinguished from 7 confusable species based on ITS sequences. The specific primer (ITS-BF/ITS-BR) of *P. hepiali* designed by ITS sequences could be amplified to obtain a short fragment of 102 bp in length, which could be used to rapidly identify *P. hepiali* from other confusable species, and to distinguish relevant products in the market. **Conclusion:** The rapid identification of *P. hepiali* and its related products can be achieved through the ITS sequences and specific primers, which provides a reference for the production and quality control of Jinshuibao capsules.

[**Key words**] *Paecilomyces hepiali*; DNA barcoding; internal transcribed spacer (ITS); specific primers; *Cordyceps sinensis*; Jinshuibao capsules; fermentation

冬虫夏草具有补肾益肺、止血化痰等功效^[1], 是我国珍稀药用资源, 具有多种药理活性。有研究学者从冬虫夏草中分离得到了多种真菌, 蝙蝠蛾拟青霉 *Paecilomyces hepiali* 就是其中之一^[2]。蝙蝠蛾拟青霉于 1982 年由戴如琴等从冬虫夏草中分离得到, 之后由陈庆涛教授鉴定并命名^[3]。同年, 另一蝙蝠蛾拟青霉菌株 Cs-4 从青海省化隆县的冬虫夏草中分离得到^[4], 该菌株后续被投入新药研制, 由此开发得到我国第一个中药一类新药——金水宝胶囊^[5]。蝙蝠蛾拟青霉作为保密菌株, 于 1995 年 11 月获得生产发酵正式标准。2000 年, 金水宝胶囊载入《中国药典》, 并一直沿用至今, 目前相关产品年销售额达 30 亿元。

目前, 研究学者对蝙蝠蛾拟青霉的研究多聚焦于其化学成分及药理作用。曹阳等^[6]通过硅胶柱色谱法和制备型 HPLC 等技术手段从蝙蝠蛾拟青霉菌丝体中正丁醇层分离得到 2'-*O*-methyladenosine 等 8 个化合物; 樊晓飞等^[7]利用核磁共振光谱学等方法从蝙蝠蛾拟青霉中分离获得麦角甾醇等 6 个化合物; 姜雪等^[8]通过比较发现, 多糖、腺苷和虫草酸作为野生冬虫夏草的主要活性成分, 同样存在于蝙蝠蛾拟青霉及蛹虫草中, 且含量相近, 故而推测这 3 个物种可能具有相似的药理作用。

由于各类虫草菌丝体形态学特征差异很小, 传统的形态学鉴定难以分辨^[9]。长期以来, 相关菌种发酵菌丝体命名混乱, 各类菌种冒用、乱用、误用现象普遍存在^[10]。对于复杂多样的菌丝体, 即使经验丰富的研究学者, 在没有相关文献资料帮助的情况下, 也很难将众多的虫草菌丝体准确的鉴别区分^[11]。以传统形态学鉴别、显微鉴别等为代表的鉴别方法存在一定主观性, 加之专业的分类学家培养困难, 难以满足实际需求。DNA 条形码技术与传统鉴定的区别之处在于, 对比所获得的 DNA 片段与标准片段, 结果客观, 不受主观意识的影响, 可在分子层面上进行鉴别研究^[12-13]。DNA 条形码技术因其

高效、快速、准确的特点, 迅速发展, 被广泛应用至动植物及微生物的鉴定研究之中^[14-16], 并被收录于 2015 年版《中国药典》^[17]。真菌通常将内转录间隔区 (ITS) 作为其 DNA 条形码序列, 例如, 刘悦等^[18]通过对比伞菌类不同科属 50 个物种的真菌的序列长度及碱基构成, 通过与 GenBank 中序列的比对分析以及建立系统进化邻接 (NJ) 树, 结果表明 ITS 序列可快速、准确鉴定伞菌类真菌; 马红梅等^[19]应用 DNA 条形码技术对青海冬虫夏草和新疆虫草进行鉴别, 得到 ITS 序列较 18S 序列更适合作为冬虫夏草和新疆虫草的条形码进行鉴定研究的结论。

LIU 等^[20]和苏燕燕等^[21]对冬虫夏草、凉山虫草、古尼虫草等都开发了特异引物, 可用于不同虫草的快速鉴定, 但蝙蝠蛾拟青霉特异引物鉴定尚未见报道。为了实现蝙蝠蛾拟青霉的快速鉴定, 本研究拟采用 DNA 条形码技术对蝙蝠蛾拟青霉及其产品金水宝胶囊进行鉴别, 并基于 ITS 序列开发特异引物进行快速鉴定, 为金水宝胶囊的生产及质量控制提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料 DK-8D 型电热恒温水槽 (上海一恒科技有限公司), DK-34 型高速离心机 (丹麦 LaboGene 公司), Nanodrop 2000 型超微量分光光度计 (美国 Thermo 公司), IMS-20 型雪花制冰机 (苏州雪尼电器设备有限公司), DYY-8C 型琼脂糖凝胶电泳仪 (北京六一仪器厂), GelDoc™ EZ 型全自动凝胶成像系统 (美国 Bio-Rad 公司), AR1530 型电子天平 (瑞士梅特勒-托利多公司), P70D20TP-C6 型微波炉 (广州格兰仕集团有限公司)。

植物基因组 DNA 提取试剂盒 [DP350, 天根生化科技 (北京) 有限公司, 批号 S7123], 2 × *Taq* 聚合酶链式反应 (PCR) Master Mix 和 RNA 酶 (北京艾德莱生物科技有限公司, 批号分别为 301447AX, 282232AX), 氨基丁三醇 (Tris)-盐酸电泳缓冲液 (1 × TAE, 自制), Tris 和乙二胺四乙酸二钠 (EDTA-

2Na) (美国西格玛奥德里奇公司, 批号依次为 SLBX2689,108J067), YeaRed 核酸染料(上海翊圣生物科技有限公司, 批号 Y4926510), Trans2K DNA Marker (北京全式金生物技术有限公司, 批号 N20701), 琼脂糖(北京擎科新业生物技术有限公司, 批号 E14190718), β -巯基乙醇(北京化工厂有限责任公司, 批号 607M031), 水为无菌去离子水或双蒸水, 引物由天根生化科技(北京) 有限公司合成。

1.2 蝙蝠蛾拟青霉及其易混淆物种 DNA 条形码鉴定 从野外及江西国药有限责任公司收集了蝙蝠蛾拟青霉菌株共 41 份样品, 从 GenBank 下载序列 3 条, 另外从西藏、青海、四川、湖南、江苏等产地及市场收集虫草类样品及其无性型发酵菌丝体, 包括冬虫夏草(*Cordyceps sinensis*, 异名 *Ophiocordyceps sinensis*) 78 份及其发酵菌丝体中国被毛孢(*Hirsutella sinensis*) 4 份, 蛹虫草(*C. militaris*) 3 份, 古尼虫草(*C. gunnii*) 10 份, 金蝉花(*C. cicadae*) 19 份, 下垂虫草(*O. nutans*) 5 份, 凉山虫草(*Metacordyceps liangshanensis*) 4 份和新疆虫草(*O. gracilis*) 4 份。共计收集样品 8 种 168 份及 GenBank 序列 3 条, 经中国中医科学院中药研究所向丽副研究员鉴定, 凭证标本保存于中国中医科学院中药研究所。见表 1。

菌丝体样本取 20 ~ 30 mg, 天然虫草类样本取子座部分 20 ~ 30 mg。菌丝体、虫草子座总 DNA 提取及 ITS 序列扩增方法参照文献[22]。扩增引物选用 ITS5F/4R, 其引物序列(5' → 3') 为 5F: GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG; 4R: TCCTCCGC TTATTGATATGC。扩增体系共 25 μ L, 其组成为 2 $\times$ *Taq* Master Mix 10 μ L, ITS5F/4R 各 1 μ L, DNA 模板 2 μ L, 余下部分由双蒸水补足。PCR 扩增程序参照菌类 DNA 条形码鉴定扩增程序进行操作^[14]。PCR 所得产物需经凝胶电泳检测, 凝胶浓度选用 1%。凝胶电泳检测合格的 PCR 产物需双向测序, 获得测序峰图文件后采用 CodonCode Aligner 3.0 进行质量评估、剪切、拼接等处理。将得到的高质量 ITS 序列输入 NCBI 网站(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 进行 BLAST 比对验证。通过 MEGA 6.0 软件对 168 条实验所得 ITS 序列及 3 条 GenBank 下载序列进行序列特征分析, 计算鸟嘌呤和胞嘧啶(GC) 含量以及种内、种间遗传距离, 蝙蝠蛾拟青霉与易混淆物种邻接(NJ) 系统聚类树的构建基于 Kimura 双参数遗传距离(Kimura 2-parameter distance, K2P) 模型系统, 设置自展值(bootstrap) 1 000 次, 各分支置信度均 > 50%。

表 1 蝙蝠蛾拟青霉及其易混淆物种 DNA 条形码鉴定样品的信息
Table 1 Information on DNA barcoding identification samples of *P. hepiali* and its confusable species

样本	数目 /份	编号	来源
蝙蝠蛾拟青霉	44	C01 ~ 24	发酵罐
		CN01 ~ 05	发酵斜面
		B01 ~ 03	北京
		H4 * 01 ~ 03	青海
		H7 * 01 ~ 03	青海
		H720 * 01 ~ 03	青海
冬虫夏草 (含中国被毛孢)	82	EF555097, KX247780, NR160318	GenBank
		HN01 ~ 03	湖南
		YS01 ~ 15	青海玉树
		GLMQ01 ~ 06	青海果洛藏族自治州玛沁县
		NQ01 ~ 21	西藏那曲
		CD01 ~ 06	西藏昌都
		KD01 ~ 09	四川康定
		REG01 ~ 03	四川若尔盖
		DG01 ~ 06	四川德格
		LT01 ~ 09	四川理塘
		BMB01	四川康定(菌丝体)
		BMB02	青海(菌丝体)
		BMB03	中国普通微生物菌种保藏管理中心(菌丝体)
		BMB04	不详, 中国(菌丝体)
蛹虫草	3	YCC01 ~ 03	湖北药材市场
古尼虫草	10	SZ01 ~ 05	湖北随州
		XZ01 ~ 05	西藏
金蝉花	19	HDS01 ~ 03	四川横断山区
		NJ01 ~ 11	江苏南京
		AH01 ~ 05	安徽
下垂虫草	5	XC01 ~ 05	吉林药材市场
凉山虫草	4	LS01 ~ 04	四川大凉山
新疆虫草	4	XJ01 ~ 04	新疆药材市场

1.3 金水宝胶囊菌粉生产过程的 DNA 条形码溯源 金水宝胶囊种子菌株单菌落样品、车间母瓶样品以及发酵生产流程样品均由江西国药有限责任公司提供, 共计取样 157 份, 见表 2。金水宝胶囊原料菌

株单菌落样品 29 个(C01 ~ 24, CN01 ~ 05), 北京菌株单菌落样品 3 个(B01 ~ 03), 青海菌株单菌落样品 9 个(H4 * 01 ~ 03, H7 * 01 ~ 03, H720 * 01 ~ 03);另取金水宝胶囊原料菌株斜面样品 9 个(XM01 ~ 09), 母瓶样品 4 个(MPS01, MPG01 ~ 03);小发酵干品 2 个(XFJ01 ~ 02), 共 56 个样品。车间母瓶样品共 31 份, 选取 8 批次斜面, 经发酵后每批次斜面转接 2 批次母瓶, 共收集 16 批次母瓶, 每批次母瓶取样 2 份。发酵生产流程样品采样阶段包括种子罐、繁殖罐、发酵罐、板框、双锥、烘箱及混合粉末共 7 个生产阶段, 共收集 10 个批次生产流程样品。DNA 提取, PCR 扩增及序列分析参见 1.2 项, 获得的 ITS 序列在 NCBI 网站进行 BLAST 比对验证并经 MEGA 6.0 软件比对。

表 2 金水宝胶囊生产过程中样品的信息
Table 2 Information of samples during production process of Jinshuibao capsules

产业链流程	样品类型	编号	数量/份
种子菌株单菌落	单菌落菌丝体	C01 ~ 24, CN01 ~ 05, B01 ~ 03, H4 * 01 ~ 03, H7 * 01 ~ 03, H720 * 01 ~ 03	41
	斜面	XM01 ~ 09	9
	母瓶	MPS01, MPG01 ~ 03	4
车间母瓶	小发酵干品	XFJ01 ~ 02	2
	母瓶菌丝体	MPS02 ~ 32	31
发酵生产流程	种子罐	A01 ~ J01	10
	繁殖罐	A02 ~ J02	10
	发酵罐	A03 ~ J03	10
	板框	A04 ~ J04	10
	双锥	A05 ~ J05	10
	烘箱	A06 ~ J06	10
	混合粉末	A07 ~ J07	10

1.4 蝙蝠蛾拟青霉特异性引物开发 对 1.1 项下所得 ITS 序列进行数据分析, 通过 MEGA 6.0 对比蝙蝠蛾拟青霉及其混淆品序列, 设计得到 1 对蝙蝠蛾拟青霉特异性引物(ITS-BF/ITS-BR), 其基因序列(5'→3') 为 ITS-BF: GTTTTCAACTCCCAAACCCTTT; ITS-BR: CAGAAGATACTGAGAATACAGA。PCR 扩增体系同 1.1 项。为优化 PCR 扩增的退火温度, 设置3 个温度(52, 54, 56 ℃)进行梯度考察, 结果表明 54 ℃时 PCR 效果最佳。故选定该退火温度对蝙蝠蛾拟青霉及其 7 个易混淆物种进行扩增。PCR 扩增程序为

94 ℃预变性 5 min; 94 ℃变性 30 s, 54 ℃退火 30 s, 72 ℃延伸 30 s, 循环 30 次; 72 ℃延伸 10 min。PCR 产物检测及序列对比同 1.1 项。

1.5 金水宝胶囊及相关虫草类发酵产品的快速鉴定 从市场收集到金水宝胶囊、百令胶囊、至灵胶囊、心肝宝胶囊以及宁心宝胶囊 5 种相关产品, 每个产品 3 个批次, 共 15 份样品, 见表 3。取样品粉末 20 ~ 30 mg 作为供试品。其 DNA 提取方法参照文献[22]。采用蝙蝠蛾拟青霉特异性引物(ITS-BF/ITS-BR)对供试品 DNA 进行序列扩增; 扩增体系及扩增程序同 1.4 项。运用 1% 琼脂糖凝胶电泳对 PCR 产物进行检测。

表 3 金水宝胶囊及相关虫草类发酵产品的样品信息
Table 3 Sample information of Jinshuibao capsules and related fermentation products of Cordyceps

样品	标示	编号	来源
金水宝胶囊(P1)	发酵虫草菌粉	P11 ~ 13	药店
百令胶囊(P2)	发酵冬虫夏草菌粉	P21 ~ 23	药店
至灵胶囊(P3)	冬虫夏草	P31 ~ 33	网购
心肝宝胶囊(P4)	人工虫草菌丝粉	P41 ~ 43	网购
宁心宝胶囊(P5)	虫草头孢菌粉	P51 ~ 53	网购

2 结果

2.1 蝙蝠蛾拟青霉及其易混淆物种的 DNA 条形码鉴定 所得 171 条 ITS 序列经 BLAST 检索验证, 均与形态鉴定结果相符。44 条不同来源蝙蝠蛾拟青霉 ITS 序列长度一致, 全长 499 bp, 无一位点发生变异, 该序列平均 GC 质量分数 56.0%。7 种易混淆物种的 ITS 序列长度差异较大, 其中, 冬虫夏草、新疆虫草、金蝉花均约 500 bp, 古尼虫草最长, 达 634 ~ 639 bp; 除金蝉花外, 各虫草及发酵菌丝体变异位点也较多; 除下垂虫草外, 各虫草的平均 GC 质量分数均≥55%, 表明序列具有一定的保守性, 见表 4。通过对各易混淆物种的遗传距离分析, 蝙蝠蛾拟青霉种内最大遗传距离为 0, 均小于 7 种易混淆物种的最小种间遗传距离 0.056, 表明通过遗传距离可将蝙蝠蛾拟青霉与易混淆物种进行区分。其余各物种种内最大遗传距离也均小于最小种间遗传距离。在 NJ 树图中, 蝙蝠蛾拟青霉及其易混淆物种均各单独聚为一支, 并无蝙蝠蛾拟青霉与其易混淆物种纠缠一支的情况出现, 与遗传距离分析结果相符, 说明基于 ITS 序列可实现蝙蝠蛾拟青霉及其易混淆物种的鉴别, 见图 1。

表 4 蝙蝠蛾拟青霉及其易混淆物种的 ITS 序列特征

Table 4 ITS sequence characteristics of *P. hepiali* and its confusable species

样本	数目/条	序列长度 /bp	变异位点 /个	平均 GC 质量 分数/%	种内遗传距离(平均值)	种间遗传距离(平均值)
蝙蝠蛾拟青霉	44	499	0	56	0	0.056 ~ 0.747(0.401)
冬虫夏草(含中国被毛孢)	82	493	18	63	0 ~ 0.027(0.013)	0.049 ~ 0.785(0.417)
蛹虫草	3	565 ~ 566	5	56	0.004 ~ 0.007(0.005)	0.694 ~ 0.793(0.743)
古尼虫草	10	634 ~ 639	16	55	0 ~ 0.018(0.009)	0.123 ~ 0.696(0.409)
金蝉花	19	500	0	60	0	0.056 ~ 0.788(0.422)
下垂虫草	5	453 ~ 459	19	35	0 ~ 0.027(0.013)	0.127 ~ 0.706(0.416)
凉山虫草	4	596 ~ 602	14	64	0 ~ 0.020(0.010)	0.049 ~ 0.793(0.421)
新疆虫草	4	489 ~ 497	7	65	0 ~ 0.012(0.006)	0.108 ~ 0.771(0.439)

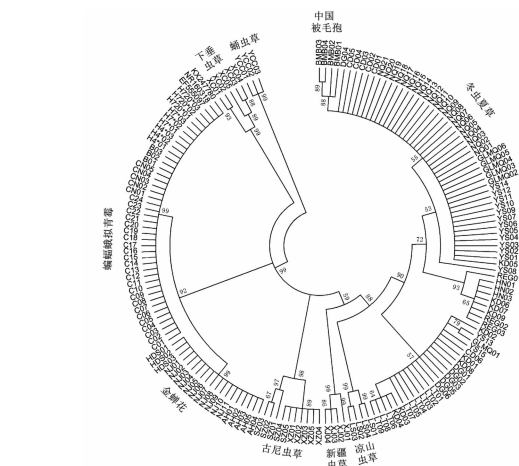


图 1 蝙蝠蛾拟青霉及其易混淆物种的聚类分析
Fig.1 Cluster analysis of *P. hepiali* and its confusable species

2.2 金水宝胶囊菌粉生产过程 DNA 条形码溯源

通过从金水宝胶囊原料菌株单菌落、车间母瓶以及发酵生产流程共 157 份样品中提取 DNA, 所得 DNA 质量良好。所有样本 DNA 并无 PCR 扩增失败情况出现。凝胶电泳检测结果条带单一, 各片段长度在 500 ~ 750 bp。经过双向测序后, 56 个虫草菌单菌落样品均取得了高质量测序峰图。经 CodonCode Aligner 3.0 软件进行序列拼接和校对, 剪切后得到 56 条 ITS 序列, 这些 ITS 序列长度均为 499 bp, 无变异位点。同时, 31 批次的车间母瓶样品以及 10 个批次 7 个不同生产阶段的样品 ITS 序列均未发生变异, DNA 序列相似度 100%, 无碱基变异。经 BLAST 比对, 鉴定菌种为蝙蝠蛾拟青霉 *P. hepiali*。

2.3 蝙蝠蛾拟青霉特异性引物开发 采用 1.4 项下扩增条件对蝙蝠蛾拟青霉、冬虫夏草菌、古尼虫草等进行 PCR 扩增, 见图 2。结果发现只有蝙蝠蛾拟青霉可特异扩增到约 100 bp 目标条带, 经测序后获

得高质量峰图, 经 BLAST 比对验证, 确定为蝙蝠蛾拟青霉。说明设计的特异性引物 (ITS-BF/ITS-BR) 适用于蝙蝠蛾拟青霉的特异性 PCR 鉴别, 可对蝙蝠蛾拟青霉、其他虫草及发酵菌丝体进行快速准确的鉴别和区分。



图 2 蝙蝠蛾拟青霉及其易混淆物种的特异性引物 ITS-BF/ITS-BR 的 PCR 鉴别
M. DNA Marker; 1 ~ 3. 蝙蝠蛾拟青霉; 4 ~ 5. 阴性对照; 6 ~ 7. 冬虫夏草; 8 ~ 9. 中国被毛孢; 10 ~ 11. 蛹虫草; 12 ~ 13. 下垂虫草; 14 ~ 15. 凉山虫草; 16 ~ 17. 金蝉花; 18 ~ 19. 古尼虫草; 21 ~ 22. 新疆虫草

Fig.2 PCR identification of *P. hepiali* and its confusable species by ITS-BF/ITS-BR

2.4 金水宝胶囊及相关虫草类发酵产品的快速鉴定 特异性电泳检测结果表明, P1 鉴定为蝙蝠蛾拟青霉, P2 ~ P5 为非蝙蝠蛾拟青霉产品, 见图 3。对于金水宝胶囊及相关虫草类发酵产品, 可以先采用 ITS 序列特异性引物 (ITS-BF/ITS-BR) 分别扩增, 根据电泳检测情况判断样品是否含有蝙蝠蛾拟青霉。如果不含有, 可以通过扩增 ITS 序列确定样品菌种名称。说明特异性引物 (ITS-BF/ITS-BR) 可以实现对相关产品中是否含有蝙蝠蛾拟青霉的快速鉴定。

3 讨论

冬虫夏草是我国的传统名贵中药材, 市场需求较大, 但其产量受生长环境限制, 供不应求, 致使掺伪、造假等现象逐渐显现, 误导、欺骗消费者的现象也时有发生^[23-24]。蝙蝠蛾拟青霉菌与冬虫夏草

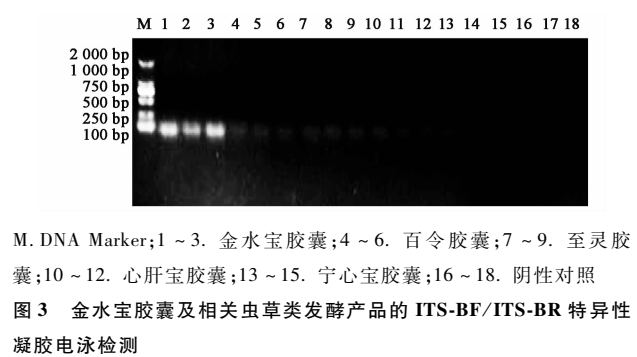


Fig. 3 ITS-BF/ITS-BR specific gel electrophoresis detection of Jinshuibao capsules and related fermentation products of *Cordyceps*

药理作用极为相似,众多学者对其进行了研究^[25-28],结果表明蝙蝠蛾拟青霉具有镇痛、降糖等生理活性,是很好的冬虫夏草替代品^[29]。目前,有学者优化了蝙蝠蛾拟青霉的发酵工艺^[30-31],本研究拟对其发酵过程的产品质量进行监控,通过抽样鉴别验证,收集了母菌、斜面、小发酵样、大发酵样、产品等 157 份样品,结果证明 DNA 条形码技术可用于蝙蝠蛾拟青霉发酵过程质量的辅助监控,有利于保证其在发酵过程中的质量稳定。

ITS 序列在真菌鉴别中具有较高的通用性和较好的鉴别效果^[32]。由于 ITS 序列需要送测序公司进行测序,时间相对较长,测序成本相对较高,为了对蝙蝠蛾拟青霉及其产品进行快速鉴定,本研究基于 ITS 序列,设计了一对蝙蝠蛾拟青霉特异性引物 (ITS-BF/ITS-BR),可扩增得到 102 bp 的短片段,可准确鉴别蝙蝠蛾拟青霉及其易混淆物种。对于虫草类物种的特异性鉴定,LIU 等^[20]开发了冬虫夏草 (DCF4/DCR4),金蝉花 (CCF/CCR),古尼虫草 (CGF/CGR) 等的特异引物,可用于不同虫草的快速鉴定。苏燕燕等^[21]也基于 ITS 序列开发了冬虫夏草的 2 对特异引物 (ITSSF1/ITSSR1 和 ITSSF2/ITSSR2),并结合细胞色素 C 氧化酶亚基 I (CO I) 序列可以实现野生和发酵的冬虫夏草的快速鉴定。因此,对于未知虫草类粉末的鉴定,可以采用不同物种的特异引物快速确定粉末是否为混合粉末。若混合粉末中有未知物种,可以通过 ITS 序列扩增后进行单克隆测序来进一步确定物种来源。

本研究对蝙蝠蛾拟青霉及其他易混淆物种进行了 DNA 条形码鉴定研究,并对相关市售产品进行了特异性检测,结果表明该方法可对蝙蝠蛾拟青霉及其易混淆物种、相关市售产品进行精准区分,可实现蝙蝠蛾拟青霉及其易混淆物种的快速鉴定,对蝙蝠蛾拟青霉在发酵过程中的质量鉴定研究也有一定参

考意义,可通过对其发酵过程的抽样检测达到对发酵产品质量的把控。

[参考文献]

[1] 陈璐,万德光,国锦琳. 冬虫夏草的本草新考[J]. 吉林中医药,2014,34(10):1022-1023.

[2] WANG W J,LI Y,WANG X L,et al. Neotypification of *Paecilomyces hepiali* (Hypocreales) [J]. Taxon, 2015, 64(1):147-150.

[3] 戴如琴,兰江丽,陈伟华,等. 蝙蝠蛾拟青霉新种的研究[J]. 北京农业大学学报,1989,15(2):221-224.

[4] 中国医学科学院药物研究所. 中草药现代研究[M]. 北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版社,1995:91.

[5] 郭用庄,邓筱安. 药用真菌新秀——金水宝胶囊[J]. 中草药,1987,18(10):8.

[6] 曹阳,张淑华,梁冲,等. 蝙蝠蛾拟青霉菌丝体化学成分研究[J]. 中国药物化学杂志,2019,29(4):300-304.

[7] 樊晓飞,杨明,姜磊,等. 蝙蝠蛾拟青霉菌丝体化学成分的研究[J]. 菌物研究,2013,11(2):72-77.

[8] 姜雪,王春月,李兰洲,等. 蝙蝠蛾拟青霉及蛹虫草与野生冬虫夏草活性比较[J]. 长春中医药大学学报,2017,33(4):544-547.

[9] 阳丹,黄婷婷,陈成,等. 蝙蝠蛾拟青霉菌丝体研究现状[J]. 中国中医药信息杂志,2015,22(5):129-131.

[10] 周娴,黄梦琦,邱孺,等. 冬虫夏草组成及生产应用研究进展[J]. 民营科技,2018(9):98-99.

[11] 蔡金龙,谢世清,张广辉,等. 药用植物 DNA 条形码鉴定研究进展[J]. 植物科学学报,2017,35(3):452-464.

[12] 吴田泽,赵小惠,胡心怡,等. 中药材 DNA 条形码鉴定技术应用进展[J]. 中医药导报,2019,25(16):125-130.

[13] 杜启艳,常重杰. DNA 条形码在鉴定物种中的应用[J]. 生物学教学,2010,35(12):60-61.

[14] 陈梦,朱玲燕,黄真,等. 三斑海马及其混伪品的 DNA 条形码分子鉴定研究[J]. 中草药,2019,50(22):5554-5562.

[15] XIANG L,SONG J Y,XIN T Y,et al. DNA barcoding the commercial Chinese caterpillar fungus [J]. FEMS Microbiol Lett,2013,347(2):156-162.

[16] 石林春,陈俊,向丽,等. 基于 ITS2 条形码的中药材天南星及其混伪品 DNA 分子鉴定[J]. 中国中药杂志,2014,39(12):2176-2179.

[17] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:四部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:383.

[18] 刘悦,汤欢,李西文,等. 基于 ITS 序列的伞菌类药用

食用真菌的 DNA 条形码鉴定研究[J]. 世界中医药, 2016,11(5):791-795.

[19] 马红梅,于静,戴明,等. 适用于冬虫夏草和新疆虫草鉴别的 DNA 条形码技术研究[J]. 世界科学技术—中医药现代化,2016,18(5):826-832.

[20] LIU Y, WANG X Y, GAO Z T, et al. Detection of *Ophiocordyceps sinensis* and its common adulterates using species-specific primers [J]. Front Microbiol, 2017, 8:1179.

[21] 苏燕燕,李文佳,杨俐,等. 冬虫夏草及虫草类产品 DNA 条形码鉴定研究[J]. 中国中药杂志,2019,44(10):1965-1973.

[22] 向丽. 冬虫夏草保护生物学研究[D]. 北京:北京协和医学院,2013.

[23] 姚艺桑,朱佳石. 中药冬虫夏草和所含多种冬虫夏草菌拉丁名混用的历史和现状[J]. 中国中药杂志, 2016,41(7):1361-1366.

[24] 陈小秋,刘宝玲,赵中振,等. 冬虫夏草与其混淆品的性状及显微鉴别研究[J]. 中国中药杂志,2011,36(9):1141-1144.

[25] 王玢,朱培新,梁运祥,等. 冬虫夏草菌丝体多糖对小鼠抗疲劳和耐缺氧能力的影响[J]. 食品科技,2012, 37(10):164-167.

[26] 姜磊. 蝙蝠蛾拟青霉 (*Paecilomyces hepiali*) 菌丝体化学成分和药理活性的研究[D]. 长春:吉林农业大学,2011.

[27] 李如意,宋厚盼,魏艳霞,等. 冬虫夏草药理作用的研究进展[J]. 环球中医药,2016,9(10):1284-1288.

[28] 黄雪峰,黄宝菊,郑方毅,等. 冬虫夏草成分及其药理作用研究进展[J]. 福建农业科技,2015(8):69-73.

[29] 陈万群,陈古荣. 冬虫夏草代用品研究进展[J]. 中草药,1994,25(5):269-271.

[30] 武忠伟,黄蓓蓓,张朝辉,等. 蝙蝠蛾拟青霉发酵全液喷雾干燥工艺优化研究[J]. 食品工业科技,2017,38(8):284-289.

[31] 张命龙,焦春伟,谢意珍,等. 蝙蝠蛾拟青霉液体发酵工艺优化及菌丝体腺苷含量的检测[J]. 菌物学报, 2016,35(2):188-198.

[32] SCHOCH C L, SEIFERT K A, HUHNDORF S, et al. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for *Fungi* [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2012, 109 (16): 6241-6246.

[责任编辑 刘德文]