

# 基于核质遗传原理建立多重 PCR 检测方法鉴定阿胶中马、驴源性成分及皮张种源

谌阳, 王文君, 付明, 徐国强, 周翔, 刘榜

华中农业大学动物科学技术学院, 农业动物遗传育种与繁殖教育部重点实验室, 武汉 430070

**摘要:** 阿胶(*Asini Colla Corii*)及其原料皮张源性成分的鉴定是对阿胶真实性的一种保障, 阿胶生产企业和市场监管部门急需马、驴、骡皮张以及阿胶中源性成分鉴别的有效检测方法。本研究基于马、驴核基因组和线粒体基因组筛选物种特异性 DNA 序列作为检测靶标, 设计马、驴特异性引物, 建立了鉴别马、驴、骡皮张以及鉴定阿胶中马和驴源性成分的多重 PCR 方法。结果显示, 本文所建立的方法可用于阿胶源性成分及皮张种源的鉴别, 其特异性强, 只在目标物种中扩增出目的条带, 而非目标物种中没有任何扩增产物, 而且灵敏度能达到 0.2 ng, 可为阿胶生产企业和市场监管部门提供技术支撑。

**关键词:** 阿胶; 核基因; 线粒体基因; 多重 PCR; 马、驴源性成分

## A multiplex PCR method based on nuclear and cytoplasmic inheritance to identify the horse and donkey-derived components of *Asini Colla Corii* and the hide

Yang Shen, Wenjun Wang, Ming Fu, Guoqiang Xu, Xiang Zhou, Bang Liu

Key Laboratory of Agricultural Animal Genetics, Breeding and Reproduction of Ministry of Education, College of Animal Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

**Abstract:** To identify the original components of *Asini Colla Corii* and its raw material hides provides a guarantee for authenticity of *Asini Colla Corii*. It is urgent for *Asini Colla Corii* production enterprises and market supervision departments to develop effective identification methods of *Asini Colla Corii* and hides derived from horses, donkeys, mules and hinnies. This study screened species-specific DNA sequences of nuclear and mitochondrial genomes as detection targets, designed horse and donkey specific primers and established multiple PCR identification methods for identifying the animal hides (including the horse, donkey, mule and hinny) and *Asini Colla Corii* containing horse-derived and donkey-derived components. Our method can identify the horse, donkey, mule and hinny hides and horse, donkey-derived components of *Asini Colla Corii* with high species specificity (no crossed amplification was observed). The limit of detection was 0.2 ng

收稿日期: 2020-04-20; 修回日期: 2020-07-10

基金项目: 国家科技重大专项(编号: 2018ZX08012-001)资助[Supported by the National Science and Technology Major Project (No. 2018ZX08012-001)]

作者简介: 谌阳, 在读硕士研究生, 专业方向: 动物分子生物学与种源检测。E-mail: shyang@webmail.hzau.edu.cn

通讯作者: 刘榜, 教授, 博士生导师, 研究方向: 动物分子生物学与育种。E-mail: liubang@mail.hzau.edu.cn

DOI: 10.16288/j.ycz.20-108

网络出版时间: 2020/9/17 16:41:52

URI: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20200916.1703.002.html>

DNA. The method developed in this study provides technical support for *Asini Colla Corii* production enterprises and market supervision departments.

**Keywords:** *Asini Colla Corii*; nuclear gene; mitochondrial gene; multiplex PCR; horse and donkey-derived components

阿胶(*Asini Colla Corii*)是利用马科动物驴(*Equus asinus* L.)的干燥皮或鲜皮经煎煮、浓缩而成,自宋代阿胶之名为驴皮独享,记载于宋以后沿用至今。阿胶是亚洲人常用的保健品,需求量逐年增加,但驴皮的数量远不能满足生产的需要。据报道 2013 年阿胶市场用量约为 3500 吨,约需驴皮 280 万张左右,而我国当年驴的出栏量仅 237.8 万头,无法满足阿胶生产的需求<sup>[1]</sup>。这种驴皮供不应求的现状,使得驴皮的价格上涨了 30 多倍<sup>[2]</sup>。一些不法分子在利益驱使下,用与驴皮相似的马皮和骡皮冒充驴皮销售,以致阿胶中掺入马和骡的成分<sup>[3,4]</sup>,使阿胶功效发生改变,扰乱市场秩序,损害了商家信誉及消费者权益。在市场监管中,急需针对阿胶中马和驴源性成分鉴定及其原料马、驴、骡皮张鉴别的检测方法。

21 世纪初期,由于核酸的特异性和稳定性,以核酸为靶标的 PCR 方法逐渐开始被应用到皮张和阿胶的鉴定中,但多以线粒体 DNA 为靶标,如基于线粒体细胞色素 *b* 基因(*Cytb*)建立 PCR-RFLP 方法、半巢式-多重 PCR 方法进行皮张鉴别和阿胶中源性成分的检测<sup>[5-7]</sup>;基于线粒体细胞色素 C 氧化酶亚基 I (*COI*)的 PCR 和实时荧光 PCR 鉴定阿胶中的源性成分<sup>[8,9]</sup>。目前针对阿胶和皮张鉴别的靶标主要是线粒体 DNA,但由于线粒体 DNA 母系遗传的特点,使其在马、驴和骡种源鉴定方面具有局限性,无法鉴别驴和驴骡、马和马骡。仅有一篇结合线粒体 DNA 和核基因组靶标,建立实时荧光 PCR 方法并成功鉴别马、驴、马骡和驴骡皮张的报道<sup>[10]</sup>,但其不涉及阿胶成品的检测。因此,对于阿胶和皮张种源成分的鉴别需要开发新的检测方法。

基于遗传学中核质遗传基本原理:骡的核遗传物质一半来自于马,另一半来自于驴;而细胞质遗传物质——线粒体 DNA 全部来自于母本,马骡和驴骡的线粒体 DNA 分别来自于马和驴。据此,本研究利用马、驴、马骡和驴骡在核基因组和线粒体 DNA 上的差异来筛选特异性靶标,建立马、驴核基因和

线粒体基因的多重 PCR 检测方法,进行马、驴、马骡、驴骡皮张和阿胶中马、驴源性成分的鉴别。

## 1 材料方法

### 1.1 样品采集与制备

皮张样品:市场采集马皮(6 张)、驴皮(6 张)和骡皮(马骡皮 2 张、驴骡皮 1 张)。

阿胶样品:市场购买驴皮阿胶 1 份;委托阿胶生产企业按其工艺流程制作了 2 种骡皮和驴皮混合阿胶、3 种未标明原料皮张成分的阿胶样品(含马和驴源性成分)。

### 1.2 DNA 提取

皮张样品 DNA 提取:马皮、驴皮、马骡皮和驴骡皮按照苯-酚氯仿抽提法提取 DNA<sup>[11]</sup>。

阿胶样品 DNA 提取:取 200 mg 阿胶样品置于 2 mL EP 管中,加入 1 mL 裂解液;阿胶溶解后,加入 15  $\mu$ L 蛋白酶 K,56℃消化 2 h;在消化好的样品中加入等体积的 Tris 饱和酚,缓慢颠倒 10 min,然后 4℃、12,000 r/min 离心 10 min;移上清液于 2 mL EP 管中,加入等体积的 Tris 饱和酚:氯仿:异戊醇(25:24:1),颠倒混匀 10 min,4℃、12,000 r/min 离心 10 min;移上清液于 2 mL EP 管中,加等体积的氯仿:异戊醇(24:1),颠倒混匀 10 min,4℃、12,000 r/min 离心 10 min;移上清液于新的 2 mL EP 管中,然后利用 OMEGA DNA 纯化试剂盒进行纯化。

阴性对照 DNA 样品:大鼠(*Rattus norvegicus*)、小鼠(*Mus musculus*)、仓鼠(*Cricetulus griseus*)、豚鼠(*Cavia porcellus*)、普通牛(*Bos taurus*)、水牛(*Bubalus*)、绵羊(*Ovis orientalis aries*)、山羊(*Capra*)、猪(*Sus scrofa*)、兔(*Oryctolagus cuniculus*)、狐(*Vulpes*)、狗(*Canis domesticus*)和貉(*Nyctereutes*)等物种 DNA 来自实验室前期储备。

### 1.3 马、驴物种特异核基因与线粒体基因检测靶标筛选与引物设计

首先,在 NCBI 数据库下载马、驴核基因组和线粒体 DNA 序列,通过本地 BLAST 将马、驴基因组序列与其他哺乳动物(普通牛、水牛、绵羊、山羊、猪)全基因组序列进行比对,最终筛选出马核基因 *OBSCN* 和驴核基因 *LOC106835644* 以及马、驴线粒体基因 *ND2* 序列;然后应用 Bioedit 对筛选出的马、驴的 DNA 序列进行同源性多重比对,并利用 NCBI-Primer 网站进行引物设计([www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast)),确保引物的物种内保守性和物种间特异性,并使所设计的引物具有相同的退火温度。引物信息见表 1。

### 1.4 马、驴物种特异性 PCR 扩增体系建立

#### 1.4.1 马、驴物种特异性 PCR 扩增

马、驴核基因和线粒体基因的 PCR 检测体系均以目标物种马、驴、马骡、驴骡的 DNA 为检测样品模板,以非目标物种大鼠、小鼠、仓鼠、豚鼠、普通牛、水牛、绵羊、山羊、猪、兔、狐、狗、貉的基因组 DNA 为阴性对照模板。PCR 扩增体系:上下游引物各 0.2  $\mu\text{mol/L}$ , 0.025 U/ $\mu\text{L}$  *rTaq*, 0.2 mmol/L dNTP, 1 $\times$  buffer(TaKaRa 公司),模板 50 ng,用无菌超纯  $\text{H}_2\text{O}$  补足到 20  $\mu\text{L}$ 。扩增程序:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 20 s,扩增 35 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 终延伸 30 s,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

#### 1.4.2 马、驴特异性 PCR 扩增体系灵敏度检测

提取马皮和驴皮基因组 DNA,用 Nanodrop 定量到 10 ng/ $\mu\text{L}$ ,然后 10 倍梯度稀释( $10^1$ 、 $10^0$ 、 $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ )。取马的稀释模板 2  $\mu\text{L}$  用于马核基因和线粒体基因特异性 PCR 扩增灵敏度检测,同样取 2  $\mu\text{L}$  驴的稀释模板检测驴的核基因和线粒体基因特异性 PCR 扩增灵敏度,即每个浓度梯度对应的 DNA 量为 20 ng、2 ng、0.2 ng、0.02 ng 和 0.002 ng,按照模板中的 DNA 量计算灵敏度。除 DNA 模板外其他试剂用量和扩增程序同 1.4.1。

#### 1.4.3 马、驴特异性 PCR 扩增体系保守性检测

分别以不同个体马皮、驴皮 DNA 样品为模板检测核基因和线粒体基因特异性 PCR 扩增的保守性,扩增体系和程序同 1.4.1。

### 1.5 马、驴、骡皮张和阿胶加工品的检测

马、驴核基因二重 PCR 扩增体系包括 Horse-NF、Horse-NR、Donkey-NF 和 Donkey-NR 引物各 0.2  $\mu\text{mol/L}$ , 0.025 U/ $\mu\text{L}$  *rTaq*, 0.2 mmol/L dNTP, 1 $\times$ buffer,模板 50 ng,  $\text{H}_2\text{O}$  补足到 20  $\mu\text{L}$ 。扩增程序与 PCR 特异性检测相同(见 1.4.1)。

马、驴线粒体基因二重 PCR 扩增体系包括 Horse-MF、Horse-MR、Donkey-MF 和 Donkey-MR 引物各 0.2  $\mu\text{mol/L}$ , *rTaq*、dNTP、1 $\times$ buffer 等试剂用量和扩增程序同 1.4.1。

马、驴、骡皮张检测,先利用马、驴核基因二

表 1 扩增马、驴目的基因引物信息

Table 1 Primer sequences for target genes in horses and donkeys

目的基因	引物名称	序列(5'→3')	目的片段大小(bp)
<i>OBSCN</i>	Horse-NF	CAGGTGAGCCGAGCTGCGCT	166
	Horse-NR	TGGCGCACGCAGTTCGTCCC	
<i>LOC106835644</i>	Donkey-NF	CTGTCCTGATGGAAGAGAACTTGG	144
	Donkey-NR	GGTGGTGCTGCAAATTCACCTTTA	
<i>ND2</i>	Horse-MF	AAATCCCCCTTATCTTCACAACT	179
	Horse-MR	GAAATATTTGGTGGAGGCTTC	
<i>ND2</i>	Donkey-MF	CATCCTACTAACTATAGCCGTG	130
	Donkey-MR	CACTAAGATGGCTGCTATTC	

引物名称中的 N 表示核 DNA, M 表示线粒体 DNA。

重 PCR 检测体系对马、驴和骡皮进行鉴别, 对鉴别出的骡再采用马、驴线粒体基因二重 PCR 检测体系区别马骡和驴骡。

阿胶样品的检测, 利用上述马、驴核基因二重 PCR 鉴别阿胶中的源性成分, 其中检测的阿胶样品 DNA 为 100 ng, 扩增体系与马、驴核基因二重 PCR 相同, 扩增程序同 1.4.1。

## 2 结果与分析

### 2.1 马、驴物种特异性 PCR 扩增体系建立

本研究建立的马和驴核基因、马和驴线粒体基因共 4 个特异性 PCR 扩增体系均能特异性地分别在马、驴、马骡、驴骡目标物种中进行扩增, 马、驴核基因特异性 PCR 扩增片段分别为 166 bp 和 144 bp, 马、驴线粒体基因特异性 PCR 扩增片段分别是 179 bp 和 130 bp。空白和阴性对照中无任何扩增产物, 说明 4 个 PCR 扩增体系都具有特异性(图 1)。

将马和驴的 DNA 分别稀释为 10 ng/μL、1 ng/μL、 $10^{-1}$  ng/μL、 $10^{-2}$  ng/μL、 $10^{-3}$  ng/μL 共 5 个浓度梯度, 进行马和驴 4 对引物特异性 PCR 的灵敏度检测。马、驴核基因特异性 PCR 扩增体系能扩增出目的条带的最低模板浓度分别为 0.1 ng/μL 和 0.01 ng/μL; 马、

驴线粒体基因特异性 PCR 扩增体系能扩增出目的条带的最低模板浓度均为 0.01 ng/μL (图 2)。由此可知, 马和驴核基因 PCR 检测灵敏度分别是 0.2 ng 和 0.02 ng, 线粒体基因 PCR 检测灵敏度均为 0.02 ng。

采用马和驴各 6 个个体的 DNA 样品进行马和驴特异性扩增体系的种内保守性检测, 马和驴核基因特异性 PCR 分别扩增出 166 bp 和 144 bp 的目的条带, 马和驴线粒体基因特异性 PCR 分别扩增出 179 bp 和 130 bp 的目的条带, 而且 4 个特异性 PCR 扩增体系在各自 6 个样品中扩增片段大小一致(图 3)。以上结果表明马和驴特异性扩增体系在物种内具有保守性。

### 2.2 马、驴源性成分二重 PCR 扩增体系

上述结果表明本研究所建立的马和驴的 4 个特异性 PCR 扩增体系均可以进行种源成分鉴定。为了实现在一个扩增体系中快速、简便地进行马、驴、骡种源成分的鉴别, 在此基础上进一步建立马、驴核基因和线粒体基因二重 PCR 检测体系。两组二重 PCR 检测体系能够特异性在马、驴、马骡、驴骡目标物种中进行扩增, 而空白和阴性对照中无任何扩增产物(图 4)。其中利用马、驴核基因二重 PCR 进行检测时, 在马和驴中仅有 1 条扩增条带, 分别为 166 bp 和 144 bp; 在马骡和驴骡中都有 166 bp 和

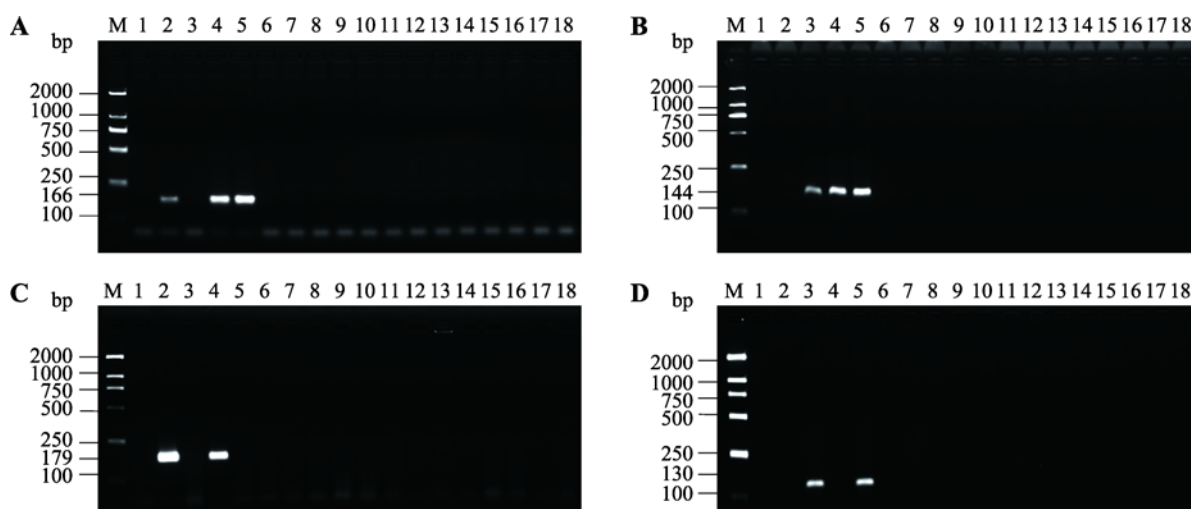


图 1 马、驴物种特异性 PCR 扩增结果

Fig. 1 Results of horse and donkey species-specific PCR amplification

A: 马核基因特异性 PCR 扩增结果; B: 驴核基因特异性 PCR 扩增结果; C: 马线粒体基因特异性 PCR 扩增结果; D: 驴线粒体基因特异性 PCR 扩增结果。M: DNA Marker; 1: 空白对照; 2: 马; 3: 驴; 4: 马骡; 5: 驴骡; 6~18: 阴性对照(分别是普通牛、水牛、绵羊、山羊、猪、兔、狐、狗、貉、大鼠、小鼠、仓鼠和豚鼠)。

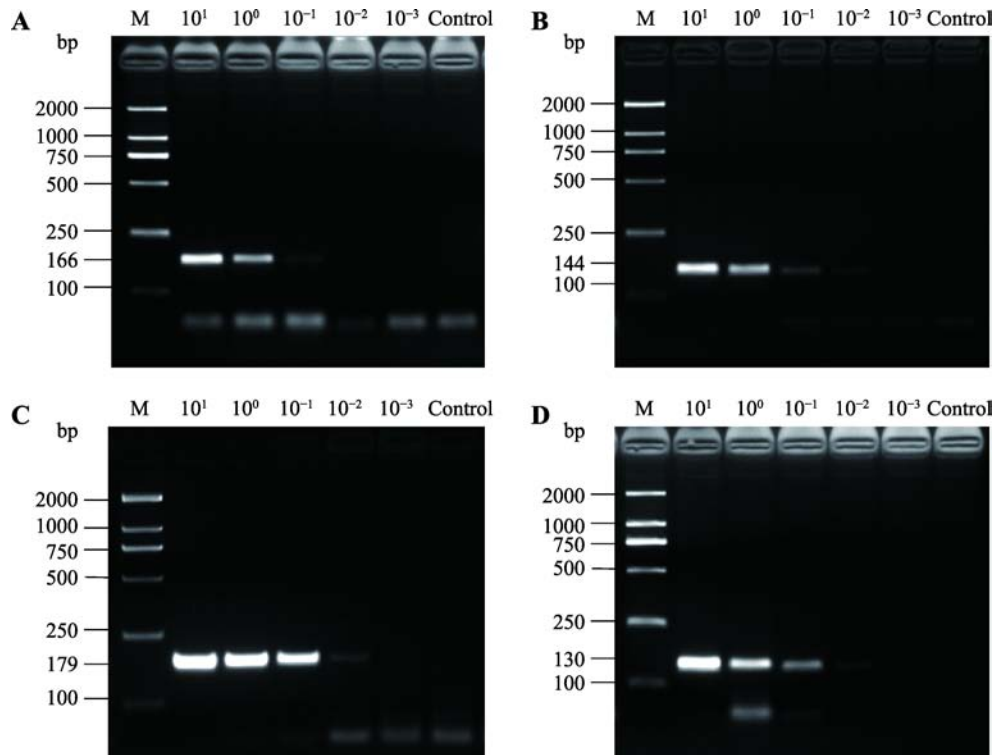


图 2 马和驴特异性 PCR 扩增体系灵敏度检测

Fig. 2 Sensitivity detection of horse and donkey specific amplification

A: 马核基因特异性扩增体系灵敏度检测; B: 驴核基因特异性扩增体系灵敏度检测; C: 马线粒体基因特异性扩增体系灵敏度检测; D: 驴线粒体基因特异性扩增体系灵敏度检测。M: DNA Marker; Control: 空白对照。

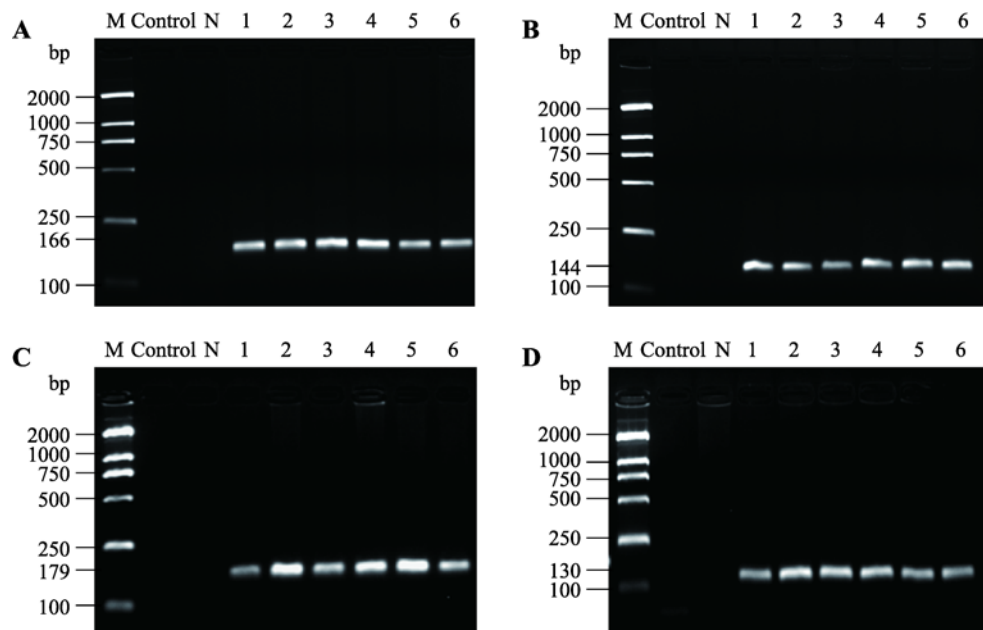


图 3 马和驴特异性扩增体系种内保守性检测结果

Fig. 3 Intraspecific conservation results of horse and donkey specific amplification

A: 马核基因特异性扩增体系保守性检测; B: 驴核基因特异性扩增体系保守性检测; C: 马线粒体基因特异性扩增体系保守性检测; D: 驴线粒体基因特异性扩增体系保守性检测。M: DNA Marker; Control: 空白对照; N: 阴性对照; 1~6: DNA 检测样本。



144 bp 两条扩增条带(图 4A), 从扩增结果可以区分出马、驴和骡, 但不能区分马骡和驴骡。再利用马、驴线粒体基因二重 PCR 进行检测, 在马骡中有和马相同的 179 bp 扩增条带; 在驴骡中有和驴相同的 130 bp 扩增条带(图 4B)。综上所述, 可以通过核基因二重 PCR 鉴别出马、驴和骡; 再利用线粒体基因二重 PCR 进一步将骡中的马骡和驴骡进行区分。

### 2.3 马、驴和骡皮张鉴别

利用马、驴核基因二重 PCR 检测方法对马、驴、骡皮进行鉴别, 马皮样品的扩增产物均是 1 条 166 bp 条带, 驴皮样品的扩增产物均为 1 条 144 bp 条带, 骡皮样品则均有 166 bp 和 144 bp 两条扩增条带(图 5A), 从而可区别马、驴、骡皮。

随后采用马、驴线粒体基因二重 PCR 检测方法区别上述鉴别出的骡皮, 马骡皮扩增产物是 1 条 179 bp 的条带, 与马皮的扩增产物一致; 驴骡皮扩

增产物是 1 条 130 bp 的条带, 与驴皮的扩增产物一致(图 5B), 基于此成功鉴别出马骡皮和驴骡皮。综上所述, 结合马、驴核基因和马、驴线粒体基因二重 PCR 检测方法能准确鉴别马、驴、马骡和驴骡皮张。

### 2.4 阿胶中马、驴源性成分鉴定

利用马、驴核基因二重 PCR 检测方法对阿胶样品进行检测, 驴皮阿胶样品仅扩增出 1 条 144 bp 条带, 仅含有驴源性成分; 而 2 种骡皮和驴皮混合的阿胶样品和 3 种未标明原料皮张成分的阿胶样品都扩增出 166 bp 和 144 bp 两条带, 则既含有马源性成分又含有驴源性成分(图 6), 说明委托加工的 5 种阿胶样品中均含有马源性成分。检测结果与实际情况相符。由此可见在进行阿胶中种源成分检测时, 只要在驴皮中掺入马和骡, 利用马、驴核基因二重 PCR 检测方法都能检测出阿胶中的马和驴源性成分。

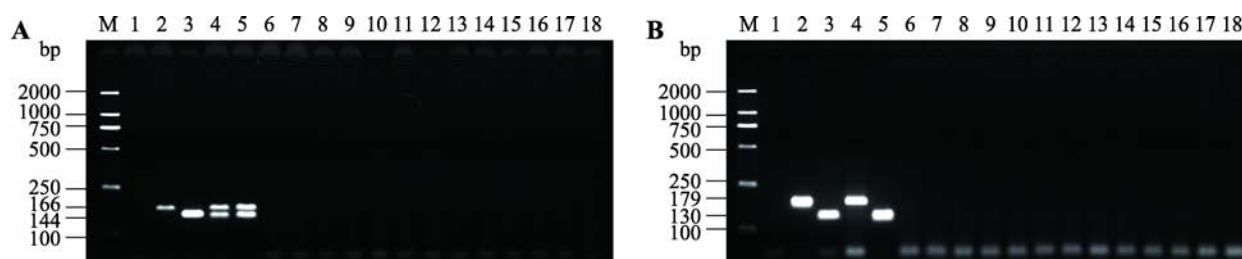


图 4 马、驴二重 PCR 扩增体系特异性检测结果

Fig. 4 Specific detection results of horse and donkey duplex PCR amplification

A: 马、驴核基因二重 PCR 特异性检测结果; B: 马、驴线粒体基因二重 PCR 特异性检测结果。M: DNA Marker; 1: 空白对照; 2: 马; 3: 驴; 4: 马骡; 5: 驴骡; 6~18: 阴性对照(分别是普通牛、水牛、绵羊、山羊、猪、兔、狐、狗、貉、大鼠、小鼠、仓鼠和豚鼠)。

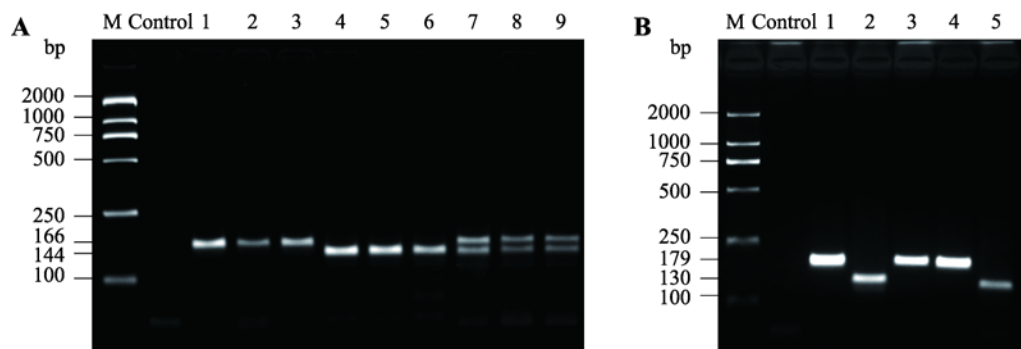


图 5 马皮、驴皮、马骡皮和驴骡皮鉴别结果

Fig. 5 Identification results of hides derived from horse, donkey, mule and hinny

A: 马皮、驴皮和骡皮鉴别结果。M: DNA Marker; Control: 空白对照; 1~3: 马皮; 4~6: 驴皮; 7~9: 骡皮。B: 马骡皮和驴骡皮鉴别结果。M: DNA Marker; Control: 空白对照; 1: 马阳性对照; 2: 驴阳性对照; 3: 4: 马骡皮; 5: 驴骡皮。

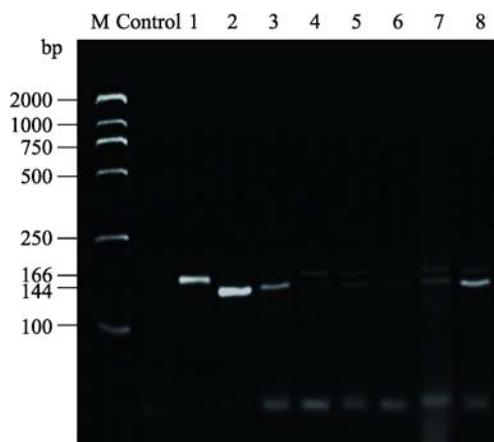


图 6 阿胶中马、驴源性成分鉴定结果

Fig. 6 Identification results of horse and donkey derived components in *Asini Colla Corii*

M: DNA Marker; Control: 空白对照; 1: 马阳性对照; 2: 驴阳性对照; 3: 驴皮阿胶样品; 4、5: 委托加工骡皮和驴皮混合的阿胶样品; 6~8: 委托加工未标明原料皮张成分的阿胶样品。

### 3 讨论

多种动物源性成分混合使得实际样品的检测更为复杂, 在 1 个 PCR 试管中检测不同 DNA 靶标往往会由于引物对之间会形成相互干扰和竞争而导致扩增效率降低<sup>[12]</sup>, 因此 DNA 靶标的选择至关重要。所筛选的 DNA 靶标在目标物种中应具有高度特异性, 物种间有足够多的变异区域, 特别是亲缘关系较近的物种应能进行区分; 靶标序列在同一物种内部要高度保守, 特别是引物序列区域不能有变异, 如有变异将会使同一物种扩增结果不同而产生假阳性或假阴性结果。为此, 本研究筛选出马核基因 *OBSCN*、驴核基因 *LOC106835644*、马和驴线粒体基因 *ND2* 作为靶标, 但由于 4 条序列在马和驴中同源性较高, 因此将引物设计在马和驴靶标基因序列有变异的区域, 至少要求所设计的引物 3'端有 2 个及以上碱基差异, 从而有效保证所建立的 PCR 检测体系在马和驴中的扩增结果不同, 确保其检测方法的特异性。另外普氏野马(*Equus przewalskii*)是现在仅存的野马, 所筛选的马特异性靶标在普氏野马和家马中同源性较高, 进而保证了特异性 PCR 检测体系的保守性, 既能检测出家马也能检测出普氏野马。

在进行皮张检测时, 利用本研究所建立的核基因检测方法可以准确区分马、驴、骡, 解决马、驴、

骡皮张鉴定的难题。利用线粒体 DNA 靶标进行检测, 仅能区分马和驴种源, 无法将细胞质遗传物质来源相同的马骡和马区分, 同样也不能区分驴和驴骡, 这样仅从线粒体靶标进行检测将会造成驴骡和驴的混淆, 那么也就会造成阿胶企业在生产中检测技术的问题而导致驴骡冒充驴的掺假。本研究中所建立的两个二重 PCR 扩增体系根据需要进行选择应用, 如果仅仅为了区分马、驴、骡, 通过核基因二重 PCR 即可达到检测目的, 如果想进一步鉴定马骡和驴骡, 可再结合线粒体基因二重 PCR 进行鉴别。

阿胶是深加工产品, 掺假阿胶多是马皮和骡皮原料的添加, 可能有以下几种情况: (1) 驴皮中掺入马皮; (2) 驴皮中同时掺入马皮和骡皮, 问题就比较复杂, 因为骡是由马和驴杂交而成, 核基因组中的遗传物质一半来自驴一半来自马, 而线粒体呈现母性遗传, 马骡的线粒体 DNA 来自马, 驴骡的线粒体 DNA 来自驴。针对这两种掺假情况, 均可以利用本研究所建立的核基因二重 PCR 方法进行检测, 无论是掺入马还是骡, 均可检测出掺入的马源性成分。若采用线粒体 DNA 为靶标进行检测, 用马和马骡掺入时, 通过线粒体 DNA 检测可以检出马源性成分; 若用驴骡掺入, 因其线粒体 DNA 来自驴, 这种情况下就只能检出驴的源性成分, 会产生漏检的后果。在进行阿胶中源性成分检测时, 因阿胶生产涉及到的不是单个皮张, 当马、驴和骡 3 个物种皮张混合在一起生产阿胶时, 无论如何都无法将骡皮与马、驴混合皮张区分开, 只能鉴定出是否有马和驴源性成分。这不是检测方法的问题, 而是这几个物种之间的特殊遗传关系本身所致。

在利用核酸检测技术进行阿胶源性成分检测中常遇到的一个困难是: 经过高温熬制、高压等加工工艺制备, DNA 会受到严重破坏; 为此, 在利用阿胶样品提取 DNA 时如何提高 DNA 的产量和纯度是首先应该克服的困难, 本研究通过利用经典的苯酚氯仿抽提法进行提取, 再利用小片段基因组 DNA 纯化试剂盒进行纯化, 有效提高了 DNA 的纯度。由于阿胶样品中的 DNA 降解严重, 在进行源性成分检测设计时, PCR 扩增片段不能太长, 否则扩增效率会降低; 扩增片段也不能太短, 如果太短会影响检测的特异性。本研究所设计的检测体系的扩增产物在

150 bp 左右, 可有效保障阿胶中的源性成分检测的特异性和灵敏度, 进而保证了检测结果的准确性。

综上所述, 结合马驴核基因组和线粒体 DNA 中物种特异性序列建立的二重 PCR 检测方法, 具有操作简单、特异性强、结果判断直接且准确等优点, 能快速、有效区分马、驴、马骡和驴骡以及鉴定阿胶中马、驴源性成分, 实现阿胶产品从原料到成品的监控, 为阿胶生产企业和监管部门提供技术支撑。

## 参考文献(References):

- [1] 丁立威. 阿胶产供销趋势分析. 中国现代中药, 2014, 16(4): 329–332, 335. [DOI]
- [2] 李杰, 王玉斌. 我国驴业发展现状、问题及对策. 中国畜牧杂志, 2019, 55(5): 159–162. [DOI]
- [3] Huang SQ, Zhang W, Peng Y. Studies on identification of furs of *Equus Asinus* L. *Strait Pharm J*, 2016, 28(4): 50–53.  
黄世琼, 张伟, 彭娅. 驴皮的真伪鉴别. 海峡药学, 2016, 28(4): 50–53. [DOI]
- [4] Tian JS, Shi BY, Zhang FS, Li XW, Geng WH, Yang Y, Liu HL, Qin XM. Establishment of RAPD for analysis on furs of *Equus asinus* and discrimination from *Equus caballus orientalis*. *Chin Tradit Herb Drug*, 2013, 44(3): 354–358.  
田俊生, 史碧云, 张福生, 李晓伟, 耿伟华, 杨永, 刘会来, 秦雪梅. 驴皮药材 RAPD 分析方法建立及其与伪品马皮的鉴别. 中草药, 2013, 44(03): 354–358. [DOI]
- [5] Wang XL, Pan J, Wang S, Wan JF, Bao Z, Jie XJ, You JH, Jie FS, Shi XM. Identification of the raw material of ejiao using the *CytB* gene PCR-RFLP method. *Perio Ocean Univ China*, 2006, 36(4): 645–648.  
汪小龙, 潘洁, 王师, 万俊芬, 包振, 解锡军, 尤金花, 解福生, 师秀梅. 细胞色素 *B* 基因 PCR-RFLP 鉴定阿胶原料. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2006, 36(4): 645–648. [DOI]
- [6] Zhang H, Sun HX, Xu N, Huang JF, Sun PC. Study on Semi-nested Multiplex PCR Identification Method of Gelatin. *Food Res Dev*, 2016, 37(17): 103–106.  
张慧, 孙海新, 许娜, 黄金发, 孙丕春. 阿胶的半巢式-多重 PCR 鉴别方法研究. 食品研究与开发, 2016, 37(17): 103–106. [DOI]
- [7] Kumeta Y, Maruyama T, Asama H, Yamamoto Y, Hakamatsuka T, Goda Y. Species identification of *Asini Corii Collas* (donkey glue) by PCR amplification of cytochrome *b* gene. *J Nat Med*, 2014, 68(1): 181–185. [DOI]
- [8] Zuo HL, Zhao J, Wang YT, Xia ZN, Hu YJ, Yang FQ. Identification of the adulterated *Asini Corii Colla* with cytochrome *c* oxidase subunit I gene-based polymerase chain reaction. *Pharmacognosy Res*, 2017, 9(4): 313–318. [DOI]
- [9] Zhang WJ, Cui SH, Cheng XL, Wei F, Ma SC. An optimized TaqMan real-time PCR method for authentication of ASINI CORII COLLA (donkey-hide gelatin). *J Pharm Biomed Anal*, 2019, 170: 196–203. [DOI]
- [10] Liu YY, Zhang QF, Bian RR, Chen J, Bu X. The detection of donkeys, horses, hinny and mule hides derived materials in ass-hide gelatin products by multiple fluorescent quantitative PCR. *J Pharma Res*, 2016, 35(10): 569–574, 578.  
刘艳艳, 张全芳, 卞如如, 陈杰, 步讯. 利用多重荧光定量 PCR 检测阿胶原料驴、马、驴骡和马骡皮张的源性. 药学研究, 2016, 35(10): 569–574, 578. [DOI]
- [11] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: A laboratory manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1989. [DOI]
- [12] Chen JW, Shao N, Zhang YC, Zhu YS, Yang LT, Tao SC, Lu DR. A visual multiplex PCR microchip with easy sample loading. *Hereditas(Beijing)*, 2017, 39(6): 525–534.  
陈建伟, 邵宁, 张雨晨, 朱元首, 杨立桃, 陶生策, 卢大儒. 一种载样简单的多重可视化 PCR 微芯片. 遗传, 2017, 39(6): 525–534. [DOI]

(责任编辑: 赵方庆)