

# 基于可视化环介导等温扩增技术快速检测 中药材蜈蚣真伪<sup>\*</sup>

胡超逸<sup>1</sup>, 邓 犇<sup>1</sup>, 张景景<sup>1</sup>, 范荫荫<sup>2</sup>, 管 瑶<sup>2</sup>, 张 凯<sup>2</sup>,  
刘义飞<sup>1</sup>, 胡志刚<sup>1\*\*</sup>, 森 林<sup>1\*\*</sup>

(1. 湖北中医药大学药学院 武汉 430065; 2. 湖北金贵中药饮片有限公司 武汉 430065)

**摘 要:**目的 建立少棘巨蜈蚣的环介导等温扩增(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)的方法, 以实现对市场蜈蚣药材真伪的快速检测。方法 针对少棘巨蜈蚣COI序列设计专属性LAMP引物; 考察恒温条件下最佳反应时间; 通过对DNA模板的梯度稀释, 确定LAMP反应对蜈蚣药材的最低检测浓度; 对少棘巨蜈蚣及其伪品进行LAMP扩增反应, 以考察LAMP引物对少棘巨蜈蚣的特异性。结果 筛选得到了一套特异性较好可用于检测少棘巨蜈蚣的LAMP引物, LAMP反应最佳反应时间为30 min, 皮克级别的DNA就能被显著检出。结论 LAMP反应对于少棘巨蜈蚣的检测显示了良好的特异性, 使用简便, 有用于指导市场流通过程中蜈蚣药材的快速检测的潜力。

**关键词:**少棘巨蜈蚣 LAMP 快速检测 COI基因

doi: 10.11842/wst.20211111009 中图分类号: R282.5 文献标识码: A

动物药是中医药体系的重要组成部分, 蜈蚣作为一味药用动物, 其干燥全体是临床常用的传统动物药材之一; 特别是近些年, 大量研究显示蜈蚣和其毒液在抑制肿瘤、治疗银屑病等方面展示的巨大潜力<sup>[1-3]</sup>, 使得药用蜈蚣的使用数量逐渐增加。唇足纲在全球共有3000多种蜈蚣, 在我国蜈蚣属亦有十余种蜈蚣分布<sup>[4]</sup>, 但少棘巨蜈蚣(*Scolopendra subspinipes mutilans* L. Koch)是《中国药典》1963至2020版所收录蜈蚣药材(*scolopendra*)的唯一基源<sup>[5-6]</sup>。少棘巨蜈蚣作为一种唇足纲的药用动物资源, 特殊的生活习性和对环境的严苛要求, 使得在土地利用情况发生变化的环境下, 野生资源逐渐减少。同时人工养殖难度较大, 这些因素使得蜈蚣资源逐渐衰竭, 蜈蚣药材价格逐年增高。作者在亳州、安国、荷花池、玉林等国内多家主要药材市场发现<sup>[7]</sup>: 为牟取蜈蚣药材价格上涨所带来的利益, 多

家商铺销售有与少棘巨蜈蚣的外观性状相似, 但体型相对较长的伪品, 该类伪品较长的体型恰好符合“长条蜈蚣价格较高”的市场规律和采购者的偏好, 进一步研究发现该伪品为同属物种多棘巨蜈蚣(*S. subspinipes multidentis* Newport)。同时在湖北宜昌、襄阳以及浙江舟山等主要产地发现, 多年来一直存在着部分养殖户坚持人工驯化养殖的尝试, 其中所面临一个重要问题是农民在选择种苗时常误选多棘巨蜈蚣进行饲养。虽然多棘巨蜈蚣与少棘巨蜈蚣药材外观性状较为相似(图1a, 图1b), 但少棘巨蜈蚣是《中国药典》2020版收载的唯一基原, 且没有关于两者在临床上可以代替使用的报道, 因此若能够有效的对蜈蚣进行快速鉴别, 必定能够从源头推动其资源的可持续利用和更多临床价值的挖掘。

蜈蚣作为传统动物药材, 与植物药的有效成分研

收稿日期: 2021-11-11

修回日期: 2022-03-05

<sup>\*</sup> 湖北省财政厅、湖北省科学技术厅湖北省中央引导地方科技发展专项(2019ZYD063): 中药组学与资源评价创新平台, 负责人: 刘义飞; 中共武汉市委人才办武汉市第5批“黄鹤英才”计划人才项目: 基于DNA条形码及快速检测技术的中药饮片可追溯体系构建, 负责人: 胡志刚。

<sup>\*\*</sup> 通讯作者: 胡志刚, 教授, 主要研究方向: 中药资源与本草基因组学; 森林, 副教授, 主要研究方向: 药用植物基因组及其进化研究。

究相对成熟的现状相比,其有效成分多为大分子,给采用化学手段鉴定带来了一定困难。而传统的性状和显微鉴定需要多年经验积累且主观性较强<sup>[8-10]</sup>,另外因蜈蚣药材养殖年限的不同给传统鉴定方式再次增加了困难<sup>[11]</sup>。分子鉴定的出现有力的解决了动物样品因成分、性状等问题造成的干扰,尤其是陈士林等人提出的中药材DNA条形码技术是一种通用易推广的中药材鉴定新技术<sup>[12-13]</sup>,该技术不受药用动植物的生长因素、不同的发育阶段或样品器官组织差异的影响<sup>[14]</sup>,其中所推荐采用的动物COI条形码序列对动物药材的真伪显示出了非常高的鉴定效率,可以有效区分少棘与多棘巨蜈蚣(图1c,图1d分别为少棘和多棘巨蜈蚣COI序列条形码),是目前鉴别蜈蚣药材真伪的重要方法。但为了能够更加快速地指导市场流通和产地种源鉴定,有必要开发出一套更为快速简便的鉴定方式,能够直接应用于蜈蚣药材的现场鉴定。环介导等温扩增技术(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)是一种能够在恒温条件下进行反应的核酸扩增技术<sup>[15]</sup>,与常规PCR扩增反应相比, LAMP扩增有其难以替代的优势,如:反应不需要PCR仪等仪器设备,只需一台能够提供恒温环境的水浴锅等常见加热装置;反应时间较快,通常只需几十分钟就能够完成整个反应<sup>[16-17]</sup>。利用这一优势,在反应体系中加入羟基萘酚蓝(hydroxynaphthol blue, HNB)等指示染料,利用该染料能够与反应副产物结合变色的特点,在反应过程中和反应结束后,直接通过肉眼判断反应是否发生<sup>[18]</sup>。凭借这些优势LAMP扩增反应技术已被广泛引入动、植物、病毒等轻工和医学领域的快速鉴别<sup>[19-22]</sup>。

本研究借鉴DNA条形码对蜈蚣药材的鉴别结果和LAMP扩增技术对其他动物药材成功鉴别经验,针对少棘巨蜈蚣的COI序列,设计了其专属特异性引物,进一步构建其LAMP检测体系。利用该鉴定体系对其反应时长、最低能够检测到的DNA浓度进行了判断,同时对混伪品进行检测,验证该体系的特异性,并在此基础上对该方法日后用于现场检测的可行性和可能存在的问题进行了探讨。

## 1 材料

### 1.1 实验材料

在对各主流药材市场调研过程中,搜集到大量蜈

表1 蜈蚣药材样品信息及COI序列比对结果

| 序号 | 样品编号 | 市场来源  | COI条形码比对结果                      | 最大相似度 |
|----|------|-------|---------------------------------|-------|
| 1  | SJ-1 | 湖北蕲春  | <i>S. subspinipes mutilans</i>  | 100%  |
| 2  | SJ-2 | 安徽亳州  | <i>S. subspinipes mutilans</i>  | 100%  |
| 3  | SJ-3 | 四川荷花池 | <i>S. subspinipes mutilans</i>  | 100%  |
| 4  | DJ-4 | 湖北蕲春  | <i>S. subspinipes multidens</i> | 100%  |
| 5  | DJ-5 | 广西玉林  | <i>S. subspinipes multidens</i> | 100%  |
| 6  | DJ-6 | 广西玉林  | <i>S. subspinipes multidens</i> | 100%  |

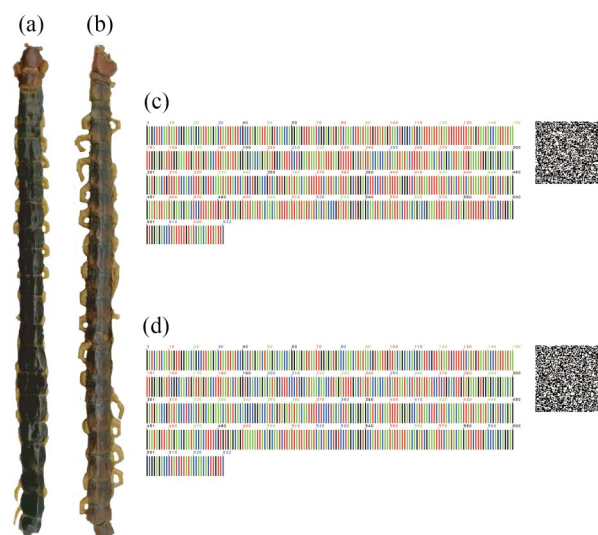


图1 少棘巨蜈蚣 *S. subspinipes mutilans* 及其混伪品

多棘巨蜈蚣 *S. subspinipes multidens* 性状图与COI条形码

注:(a)(b)为少棘巨蜈蚣与多棘巨蜈蚣干燥体性状图;(c)(d)为少棘巨蜈蚣与多棘巨蜈蚣COI序列条形码。

蚣药材样本,从中抽取3批少棘巨蜈蚣(*Scolopendra subspinipes mutilans* L. Koch)和3批多棘巨蜈蚣(*Scolopendra subspinipes multidens* Newport)干燥体,经湖北中医药大学胡志刚教授鉴定,凭证样品存于湖北中医药大学药学院。并使用DNA条形码技术对样品基原再次验证(图1c,图1d分别为少棘和多棘巨蜈蚣COI条形码),按照中药材DNA条形码标准操作指导原则<sup>[23]</sup>所推荐的COI序列对6份蜈蚣干燥样品进行检测,将所获得的6条样品序列在全球药典基因组数据库<sup>[24]</sup>(www.gpgenome.com)中进行比对,样品信息和DNA条形码比对结果如表1所示。

### 1.2 试剂和仪器

动物组织DNA提取试剂盒(天根生化科技有限公司,中国北京);*Bst* DNA聚合酶、 $MgCl_2$ 、dNTPs、羟基萘酚蓝(HNB)指示剂均购自哈尔滨新海基因生物科技有限公司;DNA Marker DL2000(北京擎科生物公司);

表2 少棘巨蜈蚣 COI 基因的 LAMP 引物

| 引物名称               | 引物序列 5'→3'                                  |
|--------------------|---------------------------------------------|
| 上游外引物:F3           | GGAAGTTTAATCGGAGATGATC                      |
| 下游外引物:B3           | ACAAATAAAGGAGTTCGTTTC                       |
| 上游内引物:FIP (F1c+F2) | CCTGTTCTGCTCCATTTTCAAAATATTAGGAGCACCAGATATG |
| 下游内引物:BIP (B1c+B2) | GAAGTGTATCCACCTTTAGCAATAGAGGAAGCTCCAGC      |
| 环引物 F:LoopF        | TTGATGGTGGTAATAGTCAA                        |
| 环引物 B:LoopB        | GGACCGTCAGTTGATATAACAA                      |

引物由上海生工生物有限公司合成。

电热恒温水槽(上海一恒科技有限公司),琼脂糖凝胶电泳仪(北京市六一仪器),聚合酶链式反应仪(基因有限公司),凝胶成像仪(JS-680B, Peiqing Science & technology), NanoDrop 2000 (Thermo Scientific Co., 美国)。

## 2 实验方法

### 2.1 DNA 提取和稀释定量

取表1中蜈蚣药材和混伪品的足部等干燥体组织各约30 mg,使用天根动物DNA提取试剂盒,按说明书要求提取样品DNA,经NanoDrop检测DNA浓度,作模板DNA储存使用;利用无菌水对少棘巨蜈蚣模板DNA以10倍梯度进行稀释定量,冷藏于-20℃备用。

### 2.2 引物设计

得到少棘巨蜈蚣总DNA后,使用通用引物对两种蜈蚣COI系列进行扩增,经测序、生物信息学分析比较其差异信息,通过LAMP Designer V1.15软件设计并筛选了一套特异性检测引物组,引物序列特征见表2。

### 2.3 LAMP 反应体系

LAMP反应体系25 μL:包括DNA模板1.5 μL, Bst DNA聚合酶10 U、上游内引物FIP 1.6 μM、下游内引物BIP 1.6 μM、上游外引物F3 0.2 μM、下游外引物B3 0.2 μM、环引物LoopF 0.4 μM、环引物LoopB 0.4 μM、100 mM MgCl<sub>2</sub> 1.5 μL、10 mM dNTPs 3.5 μL和羟基萘酚蓝指示剂0.15 mM,余量为dd H<sub>2</sub>O。

### 2.4 少棘巨蜈蚣药材特异性检测

为了检测LAMP引物对蜈蚣药材鉴定的特异性,分别在最佳反应条件下对6份样品构建LAMP反应体系,若反应结果为阳性,反应体系将由紫罗兰色变为天蓝色。同时采用电泳方式对反应结果进行验证,阳性反应体系的电泳结果呈现典型的梯子形条带,以此可直接观察扩增是否发生完成。

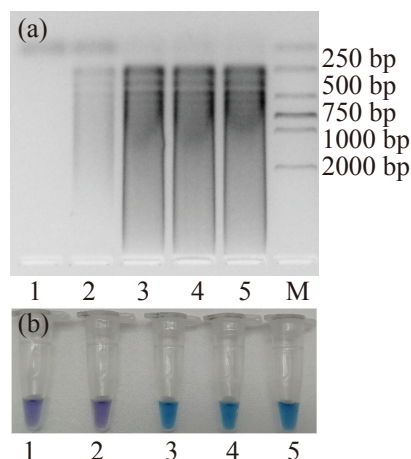


图2 60℃恒温条件下LAMP反应结果

注:1:0 min,2:15 min,3:30 min,4:45 min,5:60 min;M:DNA Marker;  
(a):LAMP反应后电泳结果;(b):LAMP反应后各反应体系颜色变化。

## 3 实验结果

### 3.1 LAMP 反应条件

按照2.3要求,平行制备多个含有少棘巨蜈蚣模板DNA的反应体系,在65℃恒温水浴锅中加热,依次间隔15 min观察其颜色变化。如图2所示,与起始颜色相比,反应发生15 min后,含有少棘巨蜈蚣DNA模板的反应体系由0 min的紫罗兰色发生了非常微弱的颜色变化,电泳检测结果显示了微弱的梯子形条带,但尚不能较好的判断反应结果;继续加热15 min后,可见反应体系已由紫罗兰色变为天蓝色,电泳结果显示条带清晰呈梯子形。继续加热,至45和60 min时,体系颜色仍为天蓝色,电泳条带清晰,说明30 min的反应时长,足以产生稳定的结果用于判断反应是否发生。

### 3.2 反应灵敏度

将少棘巨蜈蚣DNA模板按照1、10<sup>-1</sup>、10<sup>-2</sup>、10<sup>-3</sup>、10<sup>-4</sup>倍数依次进行梯度稀释,经NanoDrop测得起始DNA模板浓度为59.84 ng·μL<sup>-1</sup>,观察不同浓度DNA在

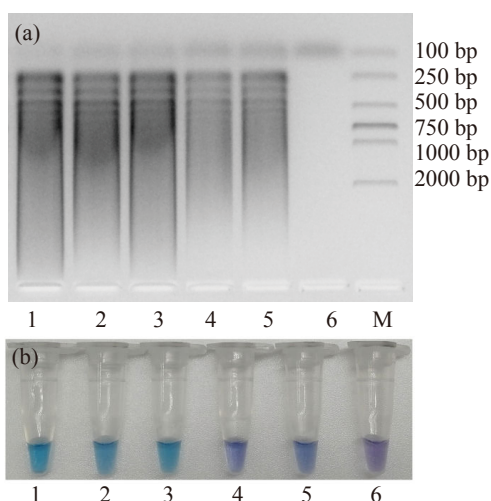


图3 少棘巨蜈蚣DNA模板依次稀释后反应结果。

注: 1: 1倍, 2:  $10^{-1}$ 倍, 3:  $10^{-2}$ 倍, 4:  $10^{-3}$ 倍, 5:  $10^{-4}$ 倍, 6: 阴性对照, M: DNA Marker; (a): 电泳条带结果; (b): 显色剂显色差异。

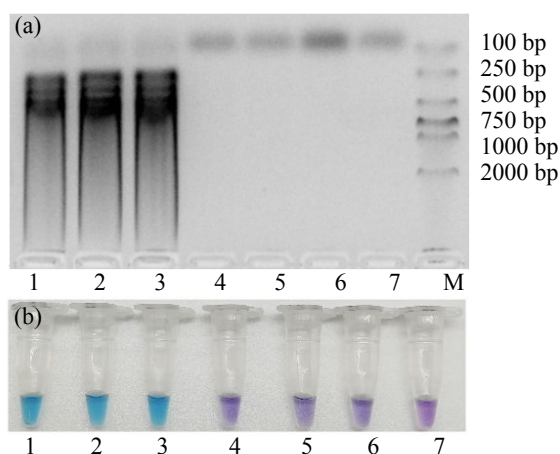


图4 少棘巨蜈蚣及其混伪品LAMP反应结果

注: 1: SJ-1, 2: SJ-1, 3: SJ-1, 4: DJ-1, 5: DJ-1, 6: DJ-1, 7: 阴性对照, M: DNA Marker; (a): 电泳条带结果; (b): 显色剂显色差异。

相同反应体系下的差异。30 min后, 稀释至  $10^{-3}$  或  $10^{-4}$  倍的反应体系颜色仍存在一定变化, 电泳结果可以看到较为微弱的条带, 此时DNA模板浓度为  $5.984 \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ , 说明在保证30 min的快速反应条件下, 仍可确保该方法对低浓度少棘巨蜈蚣DNA的检测。

### 3.3 蜈蚣药材及其混伪品的检测

分别对1.1中筛选的6个批次的蜈蚣DNA进行LAMP扩增反应, 以dd H<sub>2</sub>O为阴性对照, 在60℃恒温水域条件下使其反应30 min。反应结束后, 如图4中显示, 含有少棘巨蜈蚣DNA的三个反应体系(SJ-1, SJ-2, SJ-3)变为蓝色, 而含有多棘巨蜈蚣DNA的体系

(DJ-1, DJ-2, DJ-3)与阴性对照一致, 保持紫色不变; 电泳结果显示少棘巨蜈蚣的扩增体系存在梯子形条带, 而多棘巨蜈蚣无明显变化。显示了该引物对少棘巨蜈蚣具有较强的特异性, 能够快速将少棘巨蜈蚣药材所含DNA与其伪品多棘巨蜈蚣进行区分。

## 4 讨论

前期市场和产地调研发现, 多地存在将多棘巨蜈蚣混作少棘巨蜈蚣高价出售的情况, 出现这一现象的主要原因在于少棘巨蜈蚣资源缩减、多棘巨蜈蚣与其外观相似、且蜈蚣药材价格与体长相关。因此在推进蜈蚣资源可持续利用的过程中, 一种快速有效的鉴别方式, 是保证人工养殖正确引种和市场健康流通的基础。在DNA条形码等分子鉴定手段应用于蜈蚣药材检测之前, 主要鉴别方式依赖于性状鉴别, 少棘与多棘巨蜈蚣的性状差异主要体现在<sup>[25]</sup>: 前者体长多在150 mm以内, 头板和第一背板为桔红色, 其余背板为墨绿色; 而后者体长可达200 mm, 头板和第一背板为红褐色, 其余背板为棕褐色(图1a、图1b)。但人工养殖条件下食物充足等因素使部分3龄以上少棘巨蜈蚣体长达到150 mm以上, 且颜色判断主观性较强, 给蜈蚣的性状鉴别增加了一定难度<sup>[26]</sup>。同时蜈蚣作为动物药材, 在干燥、保存过程中, 其蛋白成分存在不同程度的酶解情况, 给SDS-PAGE等蛋白鉴定方式也造成了一定的干扰<sup>[6]</sup>。分子鉴定无疑在蜈蚣等动物药材鉴定过程中体现了巨大优势, 除DNA条形码通用鉴别方式以外<sup>[27]</sup>, 先后有多项关于蜈蚣基源鉴别的特异性PCR研究<sup>[28-30]</sup>, 虽特异性引物存在差异, 但所用目的片段多为线粒体DNA上的COI序列, 体现了COI序列在蜈蚣分子鉴定上的高效性。在此基础上, 本研究设计了一套用于检测少棘巨蜈蚣的LAMP引物, 与普通PCR一对引物相比, LAMP引物包含了一对外引物(F3、B3), 一对内引物(FIP、BIP)和一对环引物(LoopF、LoopB), 在以往大量研究中<sup>[31-33]</sup>证实了LAMP引物更高的特异性和扩增效率。参照其他物种LAMP反应体系设计<sup>[34-35]</sup>和蜈蚣药材自身特点, 本研究进一步设计了一套包含模板DNA、引物组、HNB显色剂、BstDNA聚合酶以及反应所需的碱基、缓冲液等少棘巨蜈蚣LAMP检测体系, 并证实了该体系能够在30 min、65℃恒温条件下对低至皮克级别的少棘巨蜈蚣DNA模板进行检测的能力。同时与DNA条形码标准操作和其他特异

性PCR相比,该反应体系省去了测序、数据分析过程,因为加入了羟基萘酚蓝(HNB)显色剂,该显色剂可直接与扩增反应的副产物焦磷酸根离子结合产生颜色变化<sup>[36]</sup>,因此可通过肉眼观察结果直接判断药材真伪,且反应时间较短,无需PCR仪等仪器设备,能够更加快速的指导现场检测。

随着LAMP反应的优势体现,多年来,已有多种药用动植物LAMP鉴别研究案例,如Qing Huang<sup>[37]</sup>等将LAMP扩增反应用于药用动物广地龙的鉴别,Meng Shiou Lee<sup>[38]</sup>等将LAMP技术应用于燕窝及其制品的检测,Ming Li<sup>[39]</sup>等开发的针对药用植物的白花蛇舌草的LAMP鉴别方法。都体现了LAMP检测方法在药用动植物快速鉴别的优势和可行性,该研究对于少棘巨蜈蚣的快速检测同样对于今后其他药用动植物的快速检测具有参考意义。而在中药材LAMP检测体系构建过程中,关键之处在于目标片段的筛选和特异性引物设计,本研究所采用的COI序列在少棘巨蜈蚣种间保守性较好,在前期的蜈蚣DNA条形码研究一文中显示,多批次少棘巨蜈蚣样本的COI序列之间不存在种内变异位点<sup>[27]</sup>;而与同属多棘蜈蚣之间存在大量变异区域(图1c、图1d),符合LAMP引物设计要求。结果显示了该引物组对少棘巨蜈蚣的高特异性,能够成功的将现今市场上存在的伪品多棘巨蜈蚣进行区分。以往研究显示,LAMP技术因反应灵敏度高,容易形成气溶胶污染,因此可能会出现假阳性的情况<sup>[40]</sup>。同时,

本研究在实验过程中发现,蜈蚣作为肉食性动物,为避免腹中食物造成干扰,在取样时,尽量选择头部、足部等部位,同时尽量将DNA提取和试剂配制分开操作。较高的灵敏度对于今后在药材市场现场推广蜈蚣药材的LAMP检测造成了一定的干扰。为克服这些问题,可在反应管中加入低熔点的固体石蜡来阻止污染<sup>[41]</sup>。同时,在DNA条形码等常规PCR实验过程中发现,蜈蚣药材具有较厚的保护组织,给DNA提取增加了一定难度,在提取过程中往往需要延长水浴时间以确保足够的DNA能够释放。但在LAMP反应过程中,可以检测到低浓度的少棘巨蜈蚣DNA,在减少测序、数据处理所耗时间的同时,也能够缩短DNA提取过程中所需要的时间。

该研究基于多地调研现状,为解决多棘巨蜈蚣混入少棘巨蜈蚣并以较高价格销售的现状,将LAMP检测技术引入少棘巨蜈蚣真伪鉴定,结合下一步的试剂盒开发和转化应用,期望能够实现现在得到样品DNA后,能在短时间内实现样品的准确鉴别,将对于当下蜈蚣药材的引种养殖和市场流通所出现的伪品流通情况进行有力监测。另外多年来,墨江蜈蚣、黑头蜈蚣等其他蜈蚣属物种的活体和药材流通区域都极其有限,其资源相对缩减,未曾在各主流药材市场发现其药材商品,但近年存在有进口蜈蚣流入药材市场报道<sup>[42]</sup>,今后将基于本研究所设计的检测体系,进一步搜集进口蜈蚣样品,扩大完善该检测体系的适用性。

## 参考文献

- 1 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.中医药导报,2021,27(5):65-67,72.
- 2 李钟杰,袁亚萍,王勇.少棘蜈蚣多肽药用价值的研究进展.中草药,2021,52(3):857-863.
- 3 张晴,王姗姗,杨素清,等.基于真实世界探讨蜈蚣败毒饮治疗寻常性银屑病证候分布与基线特征.辽宁中医药大学学报,2021,23(9):93-97.
- 4 Kang S, Liu Y, Zeng X, et al. Taxonomy and identification of the genus scolopendra in china using integrated methods of external morphology and molecular phylogenetics. *Sci Rep*, 2017, 7(1):16032.
- 5 国家药典委员会.中华人民共和国药典(一部).北京:中国医药科技出版社,2015:143.
- 6 杨成俊,周伟庆.蜈蚣及其混淆品的鉴别研究.安徽农业科学,2011,39(25):15402-15403.
- 7 胡超逸,森林,詹志来,等.蜈蚣药材商品规格等级标准研究.安徽农业科学,2019,47(16):209-211,253.
- 8 张辉,姚辉,崔丽娜,等.基于COI条形码序列的《中国药典》动物药材鉴定研究.世界科学技术-中医药现代化,2013,15(3):371-380.
- 9 李桃,谭晓梅,龙群,等.蜈蚣药材薄层鉴别及抗凝活性定量的研究.中药材,2012,35(5):686-689.
- 10 李峰,王成芳,包永睿.蜈蚣药材高效毛细管电泳指纹图谱研究.时珍国医国药,2011,22(12):2835-2836.
- 11 陈金印,丁志山.我国蜈蚣产业发展的现状与思考.江西中医学院学报,2013:4.
- 12 Chen S L, Hui Y, Han J P, et al. Principles for molecular identification of traditional Chinese materia medica using DNA barcoding. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*, 2013, 38(2):141-148.
- 13 Shilin C, Hui Y, Jianping H, et al. Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species. *Plos One*, 2010, 5(1):e8613.
- 14 Li X, Jingyuan S, Tianyi X, et al. DNA barcoding the commercial Chinese caterpillar fungus. *Fems Microbiol Lett*, 2013, 347(2):156-162.

- 15 Laohasinnarong D. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): an alternative molecular diagnosis. *J Appl Anim Sci*, 2011, 4(3):9–19.
- 16 Tomita N, Mori Y, Kanda H, *et al.* Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products. *Nat Protoc*, 2008, 3(5):877–882.
- 17 Li J J, Xiong C, Liu Y, *et al.* Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP): emergence as an alternative technology for herbal medicine identification. *Front Plant Sci*, 2016, 7:1956.
- 18 Wu L, Wang B, Zhao M, *et al.* Rapid identification of officinal akebiae caulis and its toxic adulterant aristolochiae manshuriensis caulis (aristolochia manshuriensis) by loop-mediated isothermal amplification. *Front Plant Sci*, 2016, 7:887.
- 19 肖斌, 朱永红, 邹全明. 简便敏感的环介导等温扩增基因诊断新技术. *中华检验医学杂志*, 2005(7):761–763.
- 20 Shi Y, Feng Y, Xu C, *et al.* Loop-mediated isothermal amplification assays for the rapid identification of duck-derived ingredients in adulterated meat. *Food Anal Methods*, 2017, 10(7):2325–2331.
- 21 Rivoarilala O L, Garin B, Andriamahery F, *et al.* Rapid in vitro detection of CTX-M groups 1, 2, 8, 9 resistance genes by LAMP assays. *PLoS One*, 2018, 13(7):e0200421.
- 22 Kumari S, Kumar R R, Mendiratta S K, *et al.* Species-specific loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for identification of tissue of cattle origin by targeting mitochondrial gene sequences. *J Biotech*, 2019, 9(3):69.
- 23 陈士林, 姚辉, 韩建萍, 等. 中药材DNA条形码分子鉴定指导原则. *中国中药杂志*, 2013, 38(2):141–148.
- 24 Liao B, Hu H, Xiao S, *et al.* Global Pharmacopoeia Genome Database is an integrated and mineable genomic database for traditional medicines derived from eight international pharmacopoeias. *Sci China Life Sci*, 2022, 65(4):809–817.
- 25 康四和, 邓海英, 刘义梅, 等. 我国药用蜈蚣资源与品质研究现状及对策. *中南民族大学学报(自然科学版)*, 2016, 35(2):61–66.
- 26 康四和. 中国蜈蚣属动物分类鉴定及药用蜈蚣药材质量评价研究. 武汉: 湖北中医药大学博士研究生学位论文, 2018.
- 27 张红印, 陈俊, 贾静, 等. 中药材蜈蚣及其混伪品DNA条形码鉴别研究. *中国中药杂志*, 2014, 39(12):2208–2211.
- 28 黄娅琳, 蒋敬, 胡点典. 利用12S rRNA、COI基因分子标记鉴定少棘巨蜈蚣干燥体. *基因组学与应用生物学*, 2019, 38(6):2483–2488.
- 29 田娜, 袁媛, 金艳, 等. 特异性PCR鉴别蜈蚣及其混伪品. *中国实验方剂学杂志*, 2019, 25(17):113–117.
- 30 于静. 市售鹿茸片、蜈蚣的DNA条形码及蜈蚣特异性位点的研究. 乌鲁木齐: 新疆医科大学硕士研究生学位论文, 2016.
- 31 Yang L, Wu W R, Zhou H, *et al.* Rapid identification of dendrobium officinale using Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) method. *Chin J Nat Med*, 2019, 17(5):337–345.
- 32 Sheu S C, Yu M T, Lien Y Y, *et al.* Development of a specific isothermal nucleic acid amplification for the rapid and sensitive detection of shrimp allergens in processed food. *Food Chem*, 2020, 332:127389.
- 33 Lee M S, Su T Y, Lien Y Y, *et al.* The development of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assays for the rapid authentication of five forbidden vegetables in strict vegetarian diets. *Sci Rep*, 2017, 7: 44238.
- 34 石磊, 王曼, 时国强, 等. 环介导等温扩增技术研究进展. *河北大学学报(自然科学版)*, 2021, 41(5):565–571.
- 35 高玉梅, 柳毅, 李洪, 等. 可视化LAMP检测阿胶及其保健食品中马源性成分. *食品工业*, 2021, 42(8):282–285.
- 36 姜朕元, 赵艳, 王婷, 等. FADV-4环介导等温扩增-HNB可视化检测方法的建立和应用. *黑龙江畜牧兽医*, 2020(24):65–69, 76, 175.
- 37 Huang Q, Li Z, Ma Z, *et al.* Specific and rapid identification of the *Pheretima aspergillum* by loop-mediated isothermal amplification. *Biosci Rep*, 2019, 39(2):BSR20181943.
- 38 Lee M S, Huang J Y, Lien Y Y, *et al.* The rapid and sensitive detection of edible bird's nest (*Aerodramus fuciphagus*) in processed food by a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay. *J Food Drug Anal*, 2019, 27(1):154–163.
- 39 Li M, Wong Y L, Jiang L L, *et al.* Application of novel loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for rapid authentication of the herbal tea ingredient *Hedyotis diffusa* Willd. *Food Chem*, 2013, 141(3):2522–2525.
- 40 Notomi T, Mori Y, Tomita N, *et al.* Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): principle, features, and future prospects. *J Microbiol*, 2015, 53(1):1–5.
- 41 Li X, Liu W, Wang J, *et al.* Rapid detection of *Trichinella spiralis* larvae in muscles by loop-mediated isothermal amplification. *J Microbiol*, 2012, 42(13–14):1119–1126.
- 42 胡云飞, 鞠康, 荣百玲, 等. 不同品种进口蜈蚣的微性状鉴别. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23(8):39–44.

## Rapid Detection of *Scolopendra Subspinipes Mutilans* Using Visual Loop-mediated Isothermal Amplification Technology

Hu Chaoyi<sup>1</sup>, Deng Ben<sup>1</sup>, Zhang Jingjing<sup>1</sup>, Fan Yinyin<sup>2</sup>, Guan Yao<sup>2</sup>, Zhang Kai<sup>2</sup>,  
Liu Yifei<sup>1</sup>, Hu Zhigang<sup>1</sup>, Sen Lin<sup>1</sup>

(1. School of Pharmacy, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China; 2. Hubei Jingui Chinese

*Herbal Pieces Co., Ltd., Wuhan 430065, China)*

**Abstract:** Objective To establish an identification system of *Scolopendra subspinipes mutilans* via loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method, so as to realize rapid detection of authenticity of Chinese medicine material centipede in the market. Methods We designed specific LAMP primers following the COI gene of *S. subspinipes mutilans*. Then we inspected the best reaction time at a constant temperature and the lowest detection concentration of DNA template. Finally, to verify the specificity of LAMP primers, we accomplished amplification reaction with *S. subspinipes multidens* DNA template. Results Our LAMP primers showed a great specificity for detection of *S. subspinipes mutilans* during a 30 minutes reaction time, and the target DNA could be significantly detected at  $10^{-9}$  mg consistency. Conclusion *Scolopendra subspinipes mutilans* LAMP reaction showed great potential for the detection, which are able to be applied in the identification of *S. subspinipes mutilans* as a rapid detection methods in the market.

**Keywords:** *Scolopendra Subspinipes Mutilans*, LAMP, Rapid detection, COI sequence

(责任编辑:周阿剑、刘玥辰, 责任译审:周阿剑, 审稿人:王瑀、张志华)