

多重位点特异性PCR同时鉴别酸枣仁及其掺伪品

李柯帆¹, 索晓雄¹, 李晓兰¹, 杜晨晖¹, 闫艳², 裴香萍^{1*}

(1. 山西中医药大学 中药与食品工程学院, 山西 晋中 030619;

2. 山西大学 中药现代研究中心, 太原 030006)

[摘要] **目的:**优化并建立多重位点聚合酶链式反应(PCR)体系同时鉴别酸枣仁、枳椇子和理枣仁及不同掺伪量,解决酸枣仁药材商品及其制剂的掺伪难题。**方法:**通过分析比对酸枣仁及其伪品的内部转录间隔区(ITS)序列差异找到特异性单核苷酸多态性(SNP)位点,设计特异性鉴别引物,通过优化退火温度、循环次数及引物浓度,评估不同聚合酶种类和不同PCR仪等扩增条件对不同来源的酸枣仁、枳椇子及理枣仁样品进行特异性扩增,根据特异性扩增条带大小进行鉴别,并对最低检测限和掺伪检出限进行研究。**结果:**在退火温度为63℃,循环次数为23次时,酸枣仁、枳椇子和理枣仁分别扩增出549、169、389 bp的特异性条带。该方法对酸枣仁和理枣仁的最低检测限为0.24 ng,枳椇子为1.2 ng,对酸枣仁、枳椇子和理枣仁的掺伪检出限分别为0.5%、2%和2%。**结论:**该文建立的多重位点特异性PCR鉴别方法能同时准确鉴别酸枣仁、枳椇子和理枣仁,对解决酸枣仁药材掺伪问题提供基础研究,为控制酸枣仁药材质量安全及临床应用提供参考。

[关键词] 酸枣仁; 枳椇子; 理枣仁; 多重位点特异性聚合酶链式反应(PCR); 鉴别; 掺伪

[中图分类号] R284.2;R289;R22;R2-031;R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2023)02-0141-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20221315

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220812.1417.016.html>

[网络出版日期] 2022-08-12 17:24

Simultaneous Identification of Ziziphi Spinosae Semen and Its Adulterants by Multiplex Allele-specific PCR

LI Kefan¹, SUO Xiaoxiong¹, LI Xiaolan¹, DU Chenhui¹, YAN Yan², PEI Xiangping^{1*}

(1. College of Traditional Chinese Medicine (TCM) and Food Engineering,

Shanxi University of Chinese Medicine, Jinzhong 030619, China;

2. Modern Research Center for TCM, Shanxi University, Taiyuan 030006, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize and establish a multiplex polymerase chain reaction (PCR) system to simultaneously identify Ziziphi Spinosae Semen (ZSS), *Hovenia acerba* semen (HAS), and Ziziphi Mauritiana Semen (ZMS), determine their content to solve the problem of adulteration of ZSS pieces and its preparations. **Method:** After the analysis and comparison of the internal transcribed spacer (ITS) sequence differences of ZSS and its adulterants, specific single nucleotide polymorphism (SNP) sites were found, and specific primers for identification were designed. The samples of ZSS, HAS, and ZMS from different sources were specifically amplified under the conditions of optimized annealing temperature, the number of cycles, and concentration of primers, as well as different polymerases and PCR systems after evaluation. Identification was carried out according to the size of specific amplification bands, and the lower limit of detection (LOD) and adulteration LOD were studied. **Result:** When the annealing temperature was 63 °C and the number of cycles was 23, 549, 169, 389 bp specific bands were amplified from ZSS, HAS, and ZMS. The lower LOD of this

[收稿日期] 2022-03-11

[基金项目] 山西省中药现代化振东专项基金项目(2016ZD0104);国家自然科学基金青年科学基金项目(81603251)

[第一作者] 李柯帆,在读硕士,从事中药新产品开发与应用研究,E-mail:1321814061@qq.com

[通信作者] *裴香萍,硕士,教授,从事中药鉴定及中药质量评价研究,Tel:351-3179903,E-mail:peixp69@163.com

method was 0.24 ng and 1.2 ng for ZSS and HAS, respectively. The adulteration LOD for ZSS, HAS, and ZMS was 0.5%, 2%, and 2% respectively. **Conclusion:** The established multiplex allele-specific PCR identification method can accurately identify ZSS, HAS, and ZMS at the same time, which can provide a basis for solving the problem of adulteration of ZSS and references for controlling the quality, security, and clinical application of ZSS.

[Keywords] Ziziphi Spinosae Semen; *Hovenia acerba* semen; Ziziphi Mauritiana Semen; multiplex allele-specific polymerase chain reaction(PCR); identification; adulteration

近年来,随着临床失眠人群的增加,酸枣仁作为我国临床治疗失眠的首选中药之一,其用量也在不断提升,从而导致酸枣仁药材价格逐年攀升,酸枣仁商品掺伪现象频繁出现,以掺入理枣仁现象尤为常见,偶有掺入枳椇子,严重影响了酸枣仁药材及其制剂的临床疗效。酸枣仁 *Ziziphi Spinosae Semen* (ZSS) 为鼠李科枣属植物酸枣 *Ziziphus jujuba* var. *spinosa* 的干燥成熟种子,始载于《神农本草经》,具有宁心安神、敛汗养肝之功^[1],已有几千年的临床应用历史^[2]。理枣仁 *Ziziphi Mauritiana Semen* (ZMS) 为枣属植物滇刺枣 *Z. mauritiana* 的干燥成熟种子,作为云南民间习用药材,具有与酸枣仁相似的宁心安神、敛汗之功^[3]。枳椇子 *Hovenia acerba* semen (HAS) 为鼠李科枳椇属植物枳椇 *H. acerba* 的干燥成熟种子,具有解酒消渴、护肝及抗衰老等功效^[4],因三者外部形态特征比较相近,在酸枣仁药材中常混有不同比例的伪品,为更好地控制酸枣仁药材质量,保证临床用药的有效性,建立一种能够同时鉴别酸枣仁及其伪品的检测方法显得尤为重要,目前,文献报道对酸枣仁的真伪鉴别中已有性状鉴别、薄层鉴别、显微鉴别、理化鉴别等传统鉴别方法^[5-6],还有基于质谱和化学计量学方法分析酸枣仁和理枣仁标志性差异成分的研究^[7],以及基于氢核磁技术对其不同比例掺伪粉末的鉴别研究^[8],但是对于多重位点特异性聚合酶链式反应(PCR)的研究还未见报道。

近年来,DNA分子鉴别方法因准确性好、稳定性强等特点,广泛应用于中药材基原及真伪鉴定研究中^[9]。其中多种方法已应用于酸枣仁的分子鉴别研究,如荧光PCR^[10]、随机扩增多态性DNA(RAPD)^[11]、扩增性简单序列重复PCR(ISSR-PCR)、位点特异性PCR^[12]、序列测定及DNA条形码技术等。但现有鉴别技术鉴别多个物种时需进行多次PCR反应,且只能鉴别酸枣仁的真伪,不能对其具体掺伪品种进行准确鉴别。因此为健全酸枣仁质量控制体系,需建立一种同时鉴别酸枣仁及其

伪品的分子鉴别方法。

多重PCR技术能够在—个体系中同时检测多个目标片段,具有特异性强、灵敏度高、实用性好等特点,已广泛应用于临床医学、人类基因研究、食品微生物、植物生物学及海洋生物学等领域^[13-14]。近几年多重PCR技术也逐渐应用于中药材鉴别研究中,如对苍耳子及其混淆品,石斛属药材,人参、三七、西洋参,多基原药材地龙和海龙的分子鉴别等研究中^[15-19]。本研究基于酸枣仁、理枣仁和枳椇子的单核苷酸多态性(SNP)位点差异,通过设计不同的特异性引物,建立一种能够同时鉴别酸枣仁及其伪品的多重位点特异性鉴别方法,为健全酸枣仁的质量控制体系提供参考。

1 材料

1.1 试剂 植物基因组DNA提取试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司,批号W0115],DEPC处理水、6×DNA上样缓冲液(北京索莱宝科技有限公司,批号分别为20210309、20210623),2×M5 HiPer plus Taq HiFi PCR Mix、M5 Taq DNA Polymerase、M5 Taq HiFi DNA Polymerase、2×M5 Super FastTaq PCR MasterMix、M5 Gelred Plus 核酸染料、M5 DL2000 DNA相对分子质量标准(北京聚合美生物科技有限公司,批号分别为21FB0102、20MB1404、20LB1102、21CB0808、310718V5、21DB0215),巯基还原剂[生工生物工程(上海)股份有限公司,批号525K038]。

1.2 仪器 C1000 Touch™ Thermal Cycler、T100™ Thermal Cycler型PCR仪(美国Bio-rad公司),K960型PCR仪(杭州晶格科学仪器有限公司),FA/3204B型1/1万电子天平(上海精科天美科学仪器有限公司),H1650型高速离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司),HH-4型恒温数显水浴锅(金坛市杰瑞尔电器有限公司),DYY-8C型电泳仪(北京六一生物科技有限公司所),Tanon-1600型凝胶成像分析系统(上海天能科技有限公司)。

1.3 药材 药材样品部分采集于山西省县区,其他

购自河北安国药材市场及山西省太原市、晋中市部分药店。样品共计25批,其中酸枣仁15批,枳椇子5批,理枣仁5批,所有样品经山西中医药大学裴香萍教授鉴定为正品。样品详细信息见表1。

表1 酸枣仁、枳椇子和理枣仁药材样品来源信息

Table 1 Information of medicinal material samples of *Ziziphi Spinosa* Semen (ZSS), *Hovenia acerba* semen (HAS) and *Ziziphi Mauritianae* Semen (ZMS)

序号	材料名称	拉丁名	采集或购买地
1	酸枣仁	<i>Ziziphus jujuba</i> var. <i>spinosa</i>	山西晋中市榆次区
2	酸枣仁	<i>Z. jujuba</i> var. <i>spinosa</i>	山西晋中市太谷区
3	酸枣仁	<i>Z. jujuba</i> var. <i>spinosa</i>	山西太原市阳曲县
4	酸枣仁	<i>Z. jujuba</i> var. <i>spinosa</i>	山西吕梁市汾阳市
5	酸枣仁	<i>Z. jujuba</i> var. <i>spinosa</i>	山西晋城市泽州县
6	酸枣仁	<i>Z. jujuba</i> var. <i>spinosa</i>	河北安国药材市场
7	酸枣仁	<i>Z. jujuba</i> var. <i>spinosa</i>	河北安国药材市场
8	酸枣仁	<i>Z. jujuba</i> var. <i>spinosa</i>	河北安国药材市场
9	酸枣仁	<i>Z. jujuba</i> var. <i>spinosa</i>	河北安国药材市场
10	酸枣仁	<i>Z. jujuba</i> var. <i>spinosa</i>	河北安国药材市场
11	酸枣仁	<i>Z. jujuba</i> var. <i>spinosa</i>	河北安国药材市场
12	酸枣仁	<i>Z. jujuba</i> var. <i>spinosa</i>	晋中市同仁堂药店
13	酸枣仁	<i>Z. jujuba</i> var. <i>spinosa</i>	河北安国药材市场
14	酸枣仁	<i>Z. jujuba</i> var. <i>spinosa</i>	河北安国药材市场
15	酸枣仁	<i>Z. jujuba</i> var. <i>spinosa</i>	太原市国大万民药房
16	枳椇子	<i>Hovenia acerba</i>	河北安国药材市场
17	枳椇子	<i>H. acerba</i>	晋中市天诚药房
18	枳椇子	<i>H. acerba</i>	晋中市同仁堂药店
19	枳椇子	<i>H. acerba</i>	河北安国药材市场
20	枳椇子	<i>H. acerba</i>	河北安国药材市场
21	理枣仁	<i>Ziziphus mauritiana</i>	河北安国药材市场
22	理枣仁	<i>Z. mauritiana</i>	河北安国药材市场
23	理枣仁	<i>Z. mauritiana</i>	河北安国药材市场
24	理枣仁	<i>Z. mauritiana</i>	河北安国药材市场
25	理枣仁	<i>Z. mauritiana</i>	河北安国药材市场

注:数量均为1批

2 方法

2.1 引物设计 从美国国家生物信息中心(NCBI)数据库中下载枣属和枳椇属物种的内部转录间隔区(ITS)序列,序列号见表2。利用BioEdit分析软件进行同源对齐,校对后分析酸枣仁、枳椇子和理枣仁的特异性SNP位点差异,在此基础上利用Oligo 7软件设计用于鉴定的特异性引物,使得特异性引物的3'端位于SNP位点上。并利用软件PrimerPremier 5.0对引物序列结果的发卡结构、错

误引发和引物二聚体情况进行分析。设计的酸枣仁、枳椇子和理枣仁的特异性引物序列信见表3,由生工生物工程(上海)有限公司合成。

表2 酸枣仁、枳椇子和理枣仁的ITS序列

Table 2 ITS sequence of ZSS, HAS and ZMS

物种	拉丁名	序列号
酸枣仁	<i>Ziziphus jujuba</i> var. <i>spinosa</i>	DQ146574.1、EU075088.1、KF186458.1、MF574596.1
枳椇子	<i>Hovenia acerba</i>	KP093126.1、KP093127.1、KY082789.1、MH711734.1、MH808996.1
理枣仁	<i>Z. mauritiana</i>	DQ146588.1、EU075098.1、JQ627029.1、JQ627031.1、JQ627038.1、JQ627045.1、KC155273.1、KX088507.1、KY379510.1

注:来源均为NCBI

表3 酸枣仁、枳椇子、理枣仁的特异性引物

Table 3 Specific primers of ZSS, HAS and ZMS

物种	引物	序列(5'-3')	长度/bp
酸枣仁	SF1 上游	CCTGTGTCCCGGAGCCTTCCT	549
	SR4 下游	GGTCTCTGTAGGGCCGCGACA	
枳椇子	HAF1 上游	AATCCCGTGAACCATCGAATCT	169
	HAR6 下游	CGCATTTCGGCCAACCGCTCG	
理枣仁	ZMF5 上游	GTGCGTCTATTCTGTCTTA	389
	ZMR5 下游	TCCGCGACGCATTGGGGTCTT	

2.2 基因组DNA提取 每份样品称取约100 mg,在样品中添加液氮后充分研磨,转移至离心管后利用植物基因组DNA提取试剂盒按照说明书提取基因组DNA。使用超微量分光光度计测定基因组DNA的浓度和纯度,调整基因组DNA浓度至20 mg·L⁻¹范围内,用于PCR扩增或于-20℃保存备用。后续通过1.5%琼脂糖凝胶电泳检测该基因组DNA的完整性。

2.3 多重PCR扩增条件的确定 分别建立酸枣仁、枳椇子和理枣仁的单重PCR鉴别方法,考察相对特异性引物的适用性,确定最佳范围后进行多重PCR反应条件的优化。多重特异性PCR鉴别反应在200 μL的PCR管中进行,反应总体积为25 μL,包含正向引物和反向引物各0.5 μL,2×M5 HiPer plus Taq HiFi PCR Mix 12.5 μL,DNA模板1.5 μL,加灭菌蒸馏水补足至25 μL,将反应液振荡混匀,瞬时离心后置PCR仪上进行扩增。反应结束后,取反应产物5 μL,加入DNA上样缓冲液2 μL,混匀后于1.5%琼脂糖凝胶电泳检测,最后置凝胶成像分析系

统中观察记录结果。

使用酸枣仁特异性引物对酸枣仁、枳椇子和理枣仁进行PCR扩增,分别考察了①退火温度,62、63、64、65℃;②PCR循环次数,21、22、23、24次循环;③Taq酶种类,2×M5 HiPer plus Taq HiFi PCR Mix、M5 Taq DNA Polymerase、M5 Taq HiFi DNA Polymerase、2×M5 Super FastTaq PCR MasterMix;④不同型号PCR仪,K960型,C1000 Touch™型,T100™型。

2.4 多重PCR鉴别体系的建立 前期实验扩增结果发现利用酸枣仁、枳椇子和理枣仁对应的特异性引物对分别扩增出酸枣仁特异性片段549 bp、枳椇子特异性片段169 bp、和理枣仁特异性片段389 bp,在此基础上对反应体系及条件、退火温度和循环次数进行进一步优化,建立多重位点特异性PCR鉴别体系。反应总体系为25 μL,包括酸枣仁和理枣仁上下游引物(10 μmol·L⁻¹)各0.2 μL,枳椇子上下游

引物(10 μmol·L⁻¹)各0.25 μL,2×M5 HiPer plus Taq HiFi PCR Mix 12.5 μL,DNA模板1.5 μL,加灭菌蒸馏水补足至25 μL,扩增程序为95℃预变性5 min;94℃变性30 s,63℃退火30 s,72℃延伸30 s,共23次循环;产物末端72℃延伸7 min,10℃保温10 min。

3 结果与分析

3.1 单重PCR扩增 通过前期特异性引物的实验筛选,最终确定酸枣仁的特异性引物对为SF1/SR4、枳椇子的特异性引物对为HAF1/HAR6、理枣仁的特异性引物对为ZMF5/ZMR5。最终确定的各引物对稳定性好,专属性强,可用于多重位点特异性PCR反应体系中。引物对SF1/SR4仅在酸枣仁中扩增出549 bp的特异性条带,引物对HAF1/HAR6仅在枳椇子中扩增出169 bp的特异性条带,引物对ZMF5/ZMR5仅在理枣仁中扩增出389 bp的特异性条带。各引物扩增结果见图1。



注:M.DL2 000 DNA Marker;1、2.酸枣仁;3、4.枳椇子;5、6.理枣仁;K.空白

图1 酸枣仁、枳椇子和理枣仁的单重PCR扩增

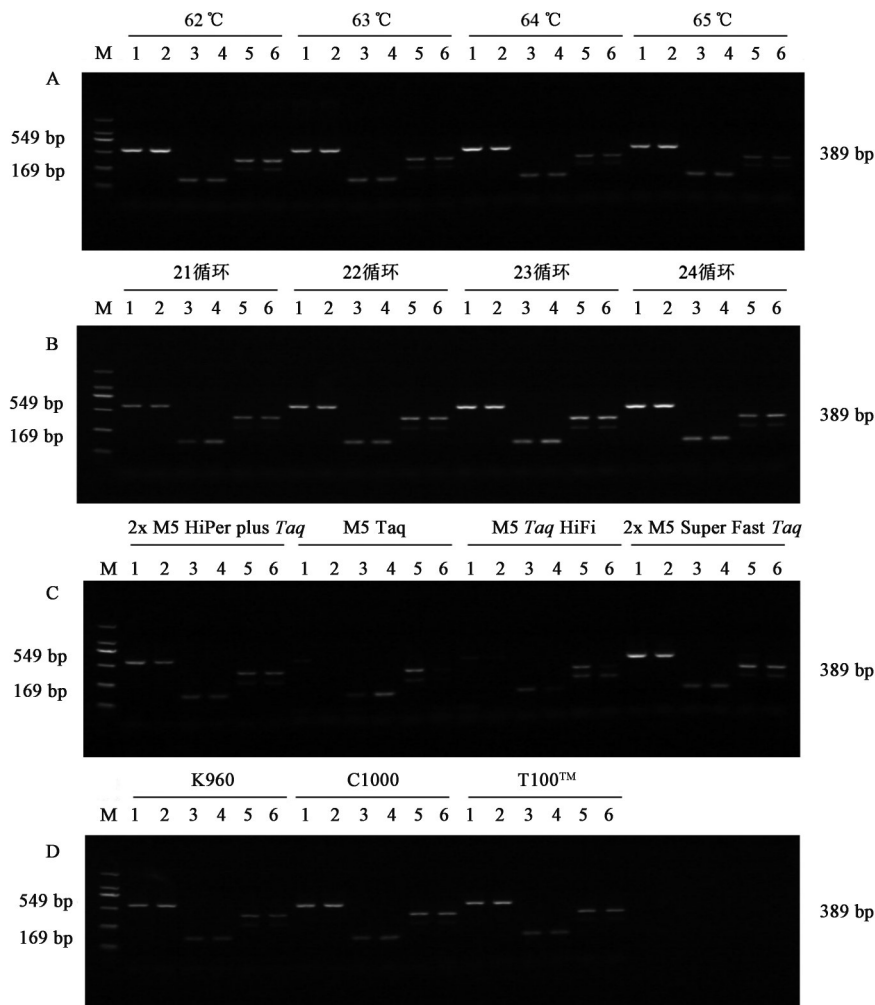
Fig. 1 PCR amplification results of ZSS, HAS and ZMS

3.2 多重位点特异性PCR鉴别条件的确定

3.2.1 退火温度和循环次数 退火温度和循环次数能够直接影响多重PCR反应结果的特异性和准确性,前期预试验结果发现退火温度在62~65℃时,酸枣仁、枳椇子、理枣仁分别能扩增出549、389、169 bp大小的特异性条带,酸枣仁和枳椇子未出现非特异性条带,理枣仁约在250 bp处出现非特异性扩增条带,因其未干扰389 bp处条带的特异性,且该条带亮度较浅,不影响鉴定结果的准确性。在退火温度为64℃以上时理枣仁特异性条带亮度明显减弱,为保证PCR反应的可重复性,确定反应退火温度为63℃,见图2。当PCR鉴别反应循环次数为21~24次循环时所有样本均可看到对应的特异性条带,见图2。在23次循环以上时酸枣仁、枳椇子和理枣仁的特异性条带亮度都明显增强,在保证特异性产物条带亮度的前提下,选择较低循环次数可以最大避免产物污染的情况出现,确保鉴别实验的准确性,因此本实验采用23次循环。面对不同的实验材

料也可适当调整循环次数,对于新鲜的植物材料可以降低循环次数,对于经过加工后存在DNA降解的植物材料可适当提高循环次数。

3.2.2 最适引物量的确定 PCR特异性引物的用量也是影响多重位点特异性PCR反应结果的重要因素之一。以预试验中酸枣仁、枳椇子、理枣仁正、反向引物各0.5 μL为基础,分别考察枳椇子正、反向引物用量为0.1、0.2、0.3、0.4 μL时对多重位点PCR反应鉴别结果的影响,发现引物用量为0.2 μL与0.3 μL时亮度差距较大,后续测试了引物用量为0.25 μL时条带亮度合适;在此基础上考察酸枣仁正、反向引物用量各为0.1、0.2、0.3、0.4 μL时对结果的影响,0.1 μL时酸枣仁特异性条带明显减弱,确定酸枣仁特异性引物对用量各为0.2 μL;考察理枣仁正、反向引物用量各为0.1、0.2、0.3、0.4 μL时的影响,发现该引物用量为0.1 μL时特异性条带亮度明显降低。最终确定引物用量为酸枣仁-枳椇子-理枣仁(0.2 μL:0.25 μL:0.2 μL)。见图3。



注:A. 退火温度;B. 循环次数;C. 不同聚合酶种类;D. 不同PCR仪;M. DL2000 DNA Marker;1、2. 酸枣仁;3、4. 枳椇子;5、6. 理枣仁

图2 不同条件的多重PCR扩增

Fig. 2 Multiplex allele-specific PCR amplification results under different conditions

3.3 方法耐受性实验考察

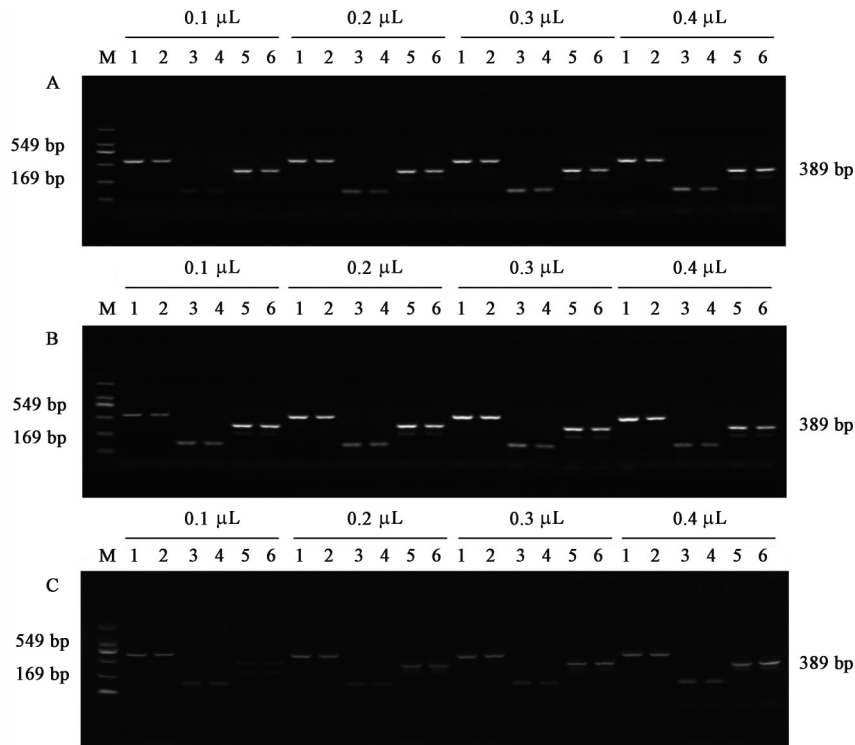
3.3.1 Taq DNA 聚合酶种类考察 不同聚合酶活性的差异以及3'-5'外切酶活性的影响会改变鉴别反应结果的特异性和准确性。本实验利用2× M5 HiPer plus Taq HiFi PCR Mix、M5 Taq DNA Polymerase、M5 Taq HiFi DNA Polymerase及2×M5 Super Fast Taq PCR MasterMix进行不同保真度酶对鉴别反应结果影响的检测,考察该鉴别方法的适用性,见图2。结果表明,M5 Taq DNA Polymerase及M5 Taq HiFi DNA Polymerase对酸枣仁特异性条带的扩增结果不理想,其中M5 Taq DNA Polymerase仅扩增出1个酸枣仁样品亮度较暗的条带,选此Taq酶作为反应条件时可以适当调整酸枣仁引物浓度及扩增循环次数等条件,使用2×M5 Super Fast Taq PCR MasterMix扩增时理枣仁出现549 bp假阳性条带。

3.3.2 PCR 仪考察 实验中分别使用K960型、

C1000 Touch™型,T100™型热循环仪进行多重PCR扩增,结果表明通过使用不同PCR仪,酸枣仁、枳椇子和理枣仁分别在549、389、169 bp处出现特异性条带,虽条带亮度有细微差异,但并不影响最终鉴别结果,见图2。

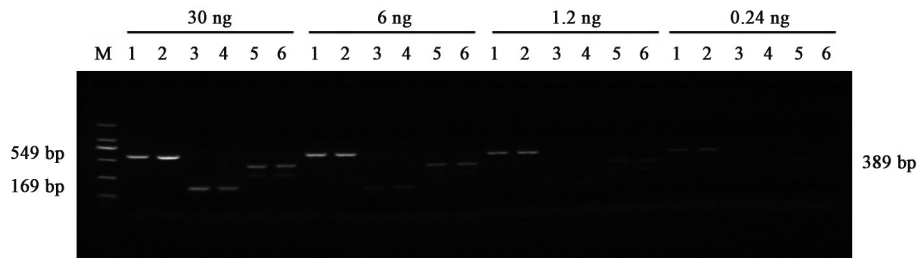
3.3.3 多重位点特异性PCR法的检测限 对不同DNA进样量的酸枣仁、枳椇子和理枣仁进行PCR反应以考察以上各物种的检测限。结果显示酸枣仁和理枣仁的DNA进样量低至0.24 ng时仍能扩增出条带清晰的特异性片段,枳椇子DNA进样量在>1.2 ng时能扩增出特异性鉴别条带,由此确定多重位点特异性鉴别反应的酸枣仁检测下限为0.24 ng,枳椇子检测下限为1.2 ng,理枣仁检测下限为0.24 ng。见图4。

3.3.4 掺伪检出限 以不同比例的理枣仁和枳椇子混于酸枣仁中,根据2.2项下方法制备样品,采用多重位点特异性PCR反应对掺伪样品进行检测。



注:A.引物HAF1/R6;B.引物SF1/R4;C.引物ZMF5/R5;M. DL2000 DNA Marker;1、2. 酸枣仁;3、4. 枳椇子;5、6. 理枣仁
图3 不同引物量的多重PCR扩增

Fig. 3 Multiplex allele-specific PCR amplification results with different primer amounts



注:M. DL2000 DNA Marker;1、2. 酸枣仁;3、4. 枳椇子;5、6. 理枣仁
图4 酸枣仁多重PCR的检测限

Fig. 4 Limit of detection in ZSS by multiplex allele-specific PCR

取枳椇子和理枣仁粉末各1g等量混匀,用二者混合物的不同比例与酸枣仁粉末充分混匀,如表4所示取各粉末量,获得含有酸枣仁粉末为0、0.5%、1%、2%、5%、10%、20%、50%、100%的样品,并以同样方法制作枳椇子和理枣仁的混合样品,扩增结果见图5、图6。结果表明,样品中混入0.5%以上的酸枣仁、2%以上的枳椇子或2%以上的理枣仁即可检测出来。故多重PCR反应中酸枣仁、枳椇子和理枣仁的掺伪检出限为0.5%、2%和2%。

3.3.5 适用性 分别对药材市场及不同药店收集的酸枣仁、枳椇子和理枣仁共20批样品(10批酸枣仁,5批枳椇子和5批理枣仁)进行多重位点PCR特异性扩增,扩增产物经过琼脂糖凝胶电泳检测,结果发现,酸枣仁均扩增获得549bp的特异性条带,

枳椇子均扩增获得169bp特异性条带,理枣仁均扩增获得389bp特异性条带,与形态学鉴别结果相一致。经各大药店购买的酸枣仁、理枣仁和枳椇子经鉴定均为正品,扩增结果见图6。

4 讨论

影响多重位点特异性扩增的因素有很多,其中特异性引物的设计是影响多重PCR扩增的关键因素之一,相比较*rbcL*、*matK*等其他序列,ITS序列的碱基差异明显,SNP位点相对较多,因此本研究选择ITS序列作为引物设计区域。同时酸枣仁、枳椇子和理枣仁的ITS序列中G+C含量较高,根据各SNP位点设计退火温度适宜的特异性引物较为困难,本实验应用Oligo 7软件对各个SNP位点进行筛选,并排除G+C含量较高的区域作引物序列部分,

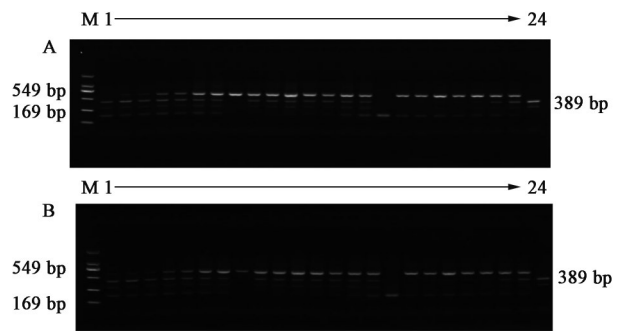
表4 酸枣仁、枳椇子和理枣仁的掺伪比例

Table 4 Adulteration ratio of ZSS, HAS and ZMS

分类	酸枣仁 /mg	枳椇子 /mg	理枣仁 /mg	掺伪比例 /%	通道
酸枣仁掺伪	0	50	50	0	A1
	0.5	49.75	49.75	0.5	B1
	1	49.5	49.5	1	2
	2	49	49	2	3
	5	47.5	47.5	5	4
	10	45	45	10	5
	20	40	40	20	6
	50	25	25	50	7
枳椇子掺伪	100	0	0	100	8
	50	0	50	0	A9
	49.75	0.5	49.75	0.5	B9
	49.5	1	49.5	1	10
	49	2	49	2	11
	47.5	5	47.5	5	12
	45	10	45	10	13
	40	20	40	20	14
理枣仁掺伪	25	50	25	50	15
	0	100	0	100	16
	50	50	0	0	A17
	49.75	49.75	0.5	0.5	B17
	49.5	49.5	1	1	18
	49	49	2	2	19
	47.5	47.5	5	5	20
	45	45	10	10	21
40	40	20	20	22	
25	25	50	50	23	
0	0	100	100	24	

对剩余位点进行引物设计,后续进行实验验证,保证了特异性引物的正常扩增过程。

多重PCR鉴别法研究中,常需要对掺伪品检出限进行考察,本实验研究结果表明酸枣仁、枳椇子和理枣仁的掺伪检出限为0.5%、2%和2%,枳椇子优化前的掺伪检出限相对较高,分析其原因可能为枳椇子种皮相对较厚重,相同质量粉末中枳椇子有效DNA提取量较低,目前市场上酸枣仁商品中以理枣仁掺入的现象更为常见,本试验所建立的方法中酸枣仁与理枣仁的掺伪检出限低至0.5%和2%,表明该方法灵敏度高,研究方法科学合理,能够准确对市售酸枣仁进行真伪检测,可以作为酸枣仁真伪鉴别方法的有效补充。



注: M.DL2000 DNA Marker; A: 1~8. 酸枣仁的不同比例0、1%、2%、5%、10%、20%、50%、100%; 9~16. 枳椇子的不同比例0、1%、2%、5%、10%、20%、50%、100%; 17~24. 理枣仁的不同比例0、1%、2%、5%、10%、20%、50%、100%; B: 1~8. 酸枣仁的不同比例0.5%、1%、2%、5%、10%、20%、50%、100%; 9~16. 枳椇子的不同比例0.5%、1%、2%、5%、10%、20%、50%、100%; 17~24. 理枣仁的不同比例0.5%、1%、2%、5%、10%、20%、50%、100%

图5 酸枣仁多重PCR的掺伪检出限

Fig. 5 Detection limit of adulteration in ZSS by multiplex allele-specific PCR



注: M.DL2000 DNA Marker; 1~10. 酸枣仁; 11~15. 枳椇子; 16~20. 理枣仁; 21~23. 酸枣仁-枳椇子-理枣仁分别为0.5%:49.75%:49.75%、49.75%:0.5%:49.75%、49.75%:49.75%:0.5%; 24. 空白

图6 在酸枣仁、枳椇子和理枣仁中多重PCR的适用性考察

Fig. 6 Applicability of multiplex allele-specific PCR in ZSS, HAS and ZMS

酸枣仁、理枣仁和枳椇子形态学上相似,传统的性状鉴别方法某些情况下不能展现正品药材足够的物种特异性,不能对近缘物种进行准确、快速的区分,现有的分子鉴定方法仅能确定正品酸枣仁药材的真伪,不能确定具体掺伪品种及掺伪量等问题,且鉴定过程耗时繁杂,因此本文建立一种同时检测酸枣仁及其伪品存在的多重PCR鉴别体系,能够实现同一体系中对多基原物种同时检测,利用该方法可快速、灵敏地鉴别正品酸枣仁药材中伪品的存在及伪品物种,直接反映出市售酸枣仁药材的掺伪情况,为酸枣仁药材及制剂产品质量控制体系的健全奠定基础。

本实验通过对市售药材的适用性考察,目前在山西省太原市、晋中市各大药店中购买的样品经本方法检测均为正品,虽然酸枣仁药材价格较高,零售价正品酸枣仁与伪品理枣仁、枳椇子相差悬殊,近10倍之差,个别商家会以理枣仁混淆酸枣仁的情

况,有时混伪品比例较低,采用其他方法不易检测,本方法研究结果中酸枣仁掺伪量低至0.5%,理枣仁的掺伪量低至2%,枳椇子的掺伪量低至2%,能够科学灵敏地解决混伪品的检测问题。多重PCR鉴别方法的建立是在传统鉴别方法基础上的补充和创新,利用该鉴别方法后期可对酸枣仁、理枣仁、枳椇子药材混伪品及其不同制剂进行掺伪鉴别,对完善酸枣仁药材鉴别体系,保证酸枣仁临床用药安全可控提供保障。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2020:382
- [2] 杨超,朱晓钗,万浩婷,等. 基于灰色关联分析方法研究炒酸枣仁镇静催眠作用谱效关系[J]. 中草药,2021,52(17):5267-5274.
- [3] 闫艳,申晨曦,张福生,等. 酸枣仁与理枣仁的研究进展及质量标志物预测分析[J]. 中草药,2019,50(19):4769-4784.
- [4] 汪亚楠,闫孝明,张晴宇,等. 基于网络药理学和分子对接技术探讨葛花枳椇子治疗酒精性肝损伤的潜在作用机制[J]. 浙江大学学报:医学版,2020,49(6):714-724.
- [5] 刘薇,李明华,余坤子,等. 中药酸枣仁的真伪鉴别方法研究[J]. 药物分析杂志,2015,35(9):1629-1634.
- [6] 王健. 薄层层析法鉴别酸枣仁和理枣仁[J]. 中国药理学杂志,1989,256(5):278-279.
- [7] 申晨曦. 酸枣仁和理枣仁化学成分系统表征及对比研究[D]. 太原:山西大学,2020.
- [8] 申晨曦,杜晨晖,李震宇,等. 基于氢核磁共振与偏最小二乘法对酸枣仁及其掺伪品的鉴别[J]. 食品科学,2020,41(8):275-281.
- [9] 卢雪蕊,史中飞,滕宝霞,等. 位点特异性PCR鉴别桃仁中掺入苦杏仁的方法分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2021,27(11):155-161.
- [10] 杨宝,郭星,郑巍,等. 双重实时荧光PCR法鉴别酸枣仁和理枣仁[J]. 农产品加工,2021,532(14):67-71,74.
- [11] 高立霞,李松涛,张丽君,等. 酸枣仁和枳椇子的RAPD分子鉴别[J]. 时珍国医国药,2017,28(10):2435-2436.
- [12] 李桂林,宋雅迪,吕振晖,等. 基于ITS序列位点特异性PCR的酸枣仁及其混伪品的鉴别[J]. 中国现代中药,2016,18(12):1566-1570.
- [13] 陈明洁,方侗,柯涛,等. 多重PCR-一种高效快速的分子生物学技术[J]. 武汉理工大学学报,2005,27(10):33-36.
- [14] 邵碧英,陈彬,汤敏英,等. 沙门氏菌多重PCR检测方法的建立[J]. 食品科学,2007,335(10):489-492.
- [15] 章秀梅,李丹,刘丛彬,等. 多重PCR方法同时鉴别中药苍耳子及其混淆品[J]. 中国中药杂志,2022,47(10):2605-2613.
- [16] 罗宇琴,蒋超,袁媛,等. 多重位点特异性PCR鉴别霍山石斛、铁皮石斛与齿瓣石斛药材[J]. 药学报,2017,52(6):998-1006.
- [17] 蒋超,罗宇琴,袁媛,等. 多重位点特异性PCR鉴别人参、三七、西洋参掺杂[J]. 中国中药杂志,2017,42(7):1319-1323.
- [18] 田娜,魏艺聪,袁媛,等. 地龙的多重位点特异性PCR鉴别[J]. 中国实验方剂学杂志,2019,25(17):124-129.
- [19] 刘富艳,金艳,袁媛,等. 多重位点特异性PCR鉴别海龙及其混伪品[J]. 中国实验方剂学杂志,2018,24(15):57-64.

[责任编辑 顾雪竹]