

天南星、半夏的PCR-RFLP鉴别

肖建才, 闫滨滨, 杨健, 孙嘉惠, 王铁霖, 万修福, 孙楷, 蒋超*, 张燕*
(中国中医科学院 中药资源中心 道地药材国家重点实验室培育基地, 北京 100700)

[摘要] 目的:近年来,随着半夏和天南星的野生资源急剧下降、药材栽培技术不成熟等问题出现,市场的混伪品频繁出现,而其主要鉴别特征在药材流通中大多消失。因此,迫切需要建立一种可以快速、有效鉴别天南星和半夏特异性的分子鉴定方法。**方法:**通过比对天南星、半夏及其混伪品的 *rbcL* 序列,分别选择了天南星和半夏的特异性酶切位点 *Hae* III 和 *Dra* I,采用聚合酶链式反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)进行鉴定,建立并优化了PCR-RFLP反应主要体系条件,并对其耐用性和正品、掺杂物及混伪品的检出能力进行了考察。**结果:**建立了天南星和半夏药材的PCR-RFLP鉴别方法,在退火温度为54℃、循环次数为35个,DNA模板量为3~30 ng时,天南星和半夏经过特异性引物扩增后,分别能被 *Hae* III 和 *Dra* I 限制性内切酶酶切,产生两片段或切开的小片段,并在100~250 bp 出现单一条带,而混伪品无法酶切,且均在250 bp 出现条带,该方法对天南星或半夏的掺杂物和混伪品具有高度准确的鉴别能力。**结论:**该研究建立的PCR-RFLP方法可以快速鉴别天南星、半夏。

[关键词] 天南星; 半夏; 聚合酶链反应-限制性片段长度多态性方法; 混伪品; 分子鉴定

[中图分类号] R284.2; R285; R289; R22; R2-031; R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2023)06-0194-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20230116

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20221215.1455.002.html>

[网络出版日期] 2022-12-16 14:40:21

Identification of *Arisaematis Rhizoma* and *Pinelliae Rhizoma* by PCR-RFLP

XIAO Jiancai, YAN Binbin, YANG Jian, SUN Jiahui, WANG Tielin, WAN Xiufu, SUN Kai,
JIANG Chao*, ZHANG Yan*

(State Key Laboratory and Breeding Base of Dao-di Herbs, Institute of Chinese Materia Medica,
China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** In recent years, with the sharp decline of wild resources in *Arisaematis Rhizoma* and *Pinelliae Rhizoma* and the immaturity of medicinal cultivation technology, their adulterants have appeared frequently in the market, and the main identifying characteristics have mostly disappeared in the circulation of medicinal materials. Therefore, there is an urgent need to establish a molecular identification method that can quickly and effectively identify the specificity of *Arisaematis Rhizoma* and *Pinelliae Rhizoma*. **Method:** After comparison of the *rbcL* sequences of *Arisaematis Rhizoma*, *Pinelliae Rhizoma*, and their adulterants, the specific enzyme cleavage sites *Hae* III and *Dra* I of *Arisaematis Rhizoma* and *Pinelliae Rhizoma*, respectively, were selected and identified by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). The main system conditions of PCR-RFLP reaction were established and optimized, and their durability and the ability to detect genuine, adulterants, and mixed counterfeits were investigated. **Result:** The PCR-RFLP identification method of *Arisaematis Rhizoma* and *Pinelliae Rhizoma* was established. After specific

[收稿日期] 2022-08-20

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81891014);中国中医科学院研究生院教材和教改项目(KCSZ21001)

[第一作者] 肖建才,在读硕士,从事中药资源与栽培研究,E-mail:xjc1770557949@163.com

[通信作者] * 蒋超,博士,副研究员,从事中药分子鉴定研究,E-mail:jiangchao0411@126.com;

* 张燕,博士,研究员,从事中药资源与栽培研究,E-mail:zhangyan8669@126.com

primer amplification, *Arisaematis Rhizoma* and *Pinelliae Rhizoma* could be digested by *Hae* III and *Dra* I -restricted endonucleases respectively, at annealing temperature of 54 °C, the number of cycles of 35, and the amount of DNA template of 3-30 ng, producing two fragments or small cut fragments with a single band between 100-250 bp, whereas the mixed counterfeits were not cleaved and both showed a band at 250 bp. The method is highly accurate in identifying adulterants and mixed counterfeits of *Arisaematis Rhizoma* or *Pinelliae Rhizoma*. **Conclusion:** The PCR-RFLP method developed in this study allows for the rapid identification of *Arisaematis Rhizoma* and *Pinelliae Rhizoma*.

[Keywords] *Arisaematis Rhizoma*; *Pinelliae Rhizoma*; polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP); adulterants; molecular identification

中药天南星为天南星科植物天南星 *Arisaema erubescens*、异叶天南星 *A. heterophyllum* 或东北天南星 *A. amurense* 的干燥块茎,具有燥湿化痰、祛风止痉、散结消肿的功效^[1];半夏为天南星科植物半夏 *Pinellia ternata* 的干燥块茎,具有燥湿化痰、降逆止呕、消痞散结的功效^[1],二者虽皆为治疗湿痰寒痰、咳嗽痰多的要药,但疗效作用却有明显的侧重点,临床上常根据病证区分使用。遗憾的是,中药材作为一类特殊的商品,在产业化生产、市场流通过程中涉及到了品牌效应、社会效益及经济效益等,不少商家为提高经济效益,常利用部分药材之间外观、功能相似的特性,有意的混淆中药材商品。天南星、半夏及其同科或同属多种植物(虎掌南星、独角莲、水半夏、朝鲜天南星等)之间交叉使用是当代市场较为常见的现象^[2-4],这种现象产生的原因主要是因为目前半夏野生资源急剧减少,半夏栽培技术较天南星和其易混淆物种而言相对滞后^[5],半夏供不应求;再加上半夏与天南星、虎掌、水半夏等药材在植物形态或药材性状上较为接近,古代植物分类学尚不发达,交通、影像、书籍等传播较难,难以准确辨别,历代本草文献在转引过程中出现错引等情况^[6],为现代市场药材流通埋下了隐患^[7]。半夏与天南星的交叉使用可能受到从业人员本身专业能力受限、半夏价格偏高或半夏资源过于匮乏所影响^[8],但更严重的是,许多盈利者利用天南星、虎掌南星与半夏之间外观相似、大小不一的特点,缩短虎掌南星的栽培期,将个头偏小的虎掌南星掺伪到半夏中,而将偏大的虎掌南星作为正品天南星使用。无独有偶,与其同科的其他植物,如水半夏,常将个头较小的当作犁头尖属的独角莲或半夏使用,而体型较大的则掺伪到正品天南星中,导致天南星市场品种混乱、质量良莠不齐等现象层出不穷,严重的影响到了人民群众的用药安全问题^[9]。

中药鉴定是商品流通过程中不可或缺的一环,

可以最大程度地保障药材源头质量。但因以基原、性状、显微和理化鉴定等为主的四大传统鉴定手段受到了从业人员极大的主观局限性,且经加工炮制后,外观和显微特征会受到一定程度的破坏,许多药材特征点消失或重合,很难用传统的鉴定方法对其准确的甄别。近年来,不少研究者对天南星、半夏及其混伪品的鉴定做出了贡献,如严福林等^[10]运用傅里叶红外光谱技术能够快速鉴别天南星及其混伪品;刘利平等^[11]借助DNA条形码序列鉴别技术也能有效鉴别真伪。然而这些方法对从业人员专业知识要求较高,且耗时长,DNA测序成本高,难以满足基层快检的需求。聚合酶链式反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)技术的涌入成为了现代鉴定技术的新起之秀,该技术不受植物生长环境、发育阶段、供试部位的影响,以科学有效、客观准确、简单、用量少等优势弥补了这些方法的不足,为中药材质量控制提供了一条有效的检测途径^[12-13]。目前,PCR-RFLP技术在覆盆子^[14]、当归^[15]、木香^[16]、大青叶^[17]、天麻^[18]及其混伪品等药用植物上获得了许多实质性进展,但还未有研究者建立一个可以同时为天南星和半夏及其对应混伪品快速有效检测出来的方法。本研究拟通过从天南星、半夏及其混伪品的 *rbcL* 序列入手,获得差异限制性酶切位点,分别设计合适的引物,并利用PCR-RFLP技术探究出一种能够酶切天南星或半夏正品而出现特异性条带,其对应的混伪品无法被酶切而被检出的方法,为天南星市场的质量控制提供一个简便可行的新思路。

1 材料

1.1 仪器 PTC-100型PCR仪(美国Bio-Rad公司);ABI9700型PCR仪、Veriti型PCR仪(美国Applied Biosystems公司);PTC-100型PCR仪(Gene有限公司);TC-512型PCR仪(上海Techne公司);Tanon-4100凝胶图像处理系统(上海天能科技有限

公司); JY1000C型电泳仪(北京君意有限公司); Milli-Q型纯水仪(美国Millipore公司); Danodrop 2000型超微量紫外分光光度计、Nanodrop 2000型微量核酸定量分析仪(美国Thermo Scientific公司)。

1.2 药品与试剂 Qiagen DNeasy Plant Mini Kit(德国凯杰生物技术有限公司,批号69106); rTaq DNA聚合酶(北京全式金生物技术有限公司,批号R001A); FasPfu Taq(美国New England Biolabs公司,批号AP231-02); 2×MightyAmp Taq、

SpeedSTAR HS Taq DNA聚合酶(日本Takara公司,批号分别为R071A、RR070A); 10000×CelRed in water核酸染料(北京兰博利德生物技术有限公司,批号CR001); Trans2K DNA Marker(北京全式金生物技术有限公司,批号BM101); 琼脂糖N(批号FA22BA 0011); 其余试剂均为分析纯。实验所用样品由安徽、甘肃、湖南、河南、吉林等各地收集,经中国中医科学院中药资源中心蒋超副研究员鉴定为表1中各实验材料的干燥块茎,共110批。美国国立生物技术信息中心(NCBI)下载序列见表2。

表1 药材来源信息

Table 1 Source information of medicinal materials

编号	材料名称	拉丁名称	批数/次	来源
1	一把伞天南星	<i>Arisaema erubescens</i>	38	安徽亳州,甘肃渭源、和政,湖南桂东、涟源、保靖,重庆黔江等
2	异叶天南星	<i>A. heterophyllum</i>	6	河南洛宁、淇县,吉林东丰、安图
3	东北天南星	<i>A. amurense</i>	2	吉林东丰、双阳山河
4	朝鲜天南星	<i>A. peninsulae</i>	1	吉林安图
5	半夏	<i>Pinellia ternata</i>	47	重庆涪陵、忠县、南川,河北安国,四川荷花池,甘肃徽县,安徽青阳
6	水半夏	<i>Typhonium flagelliforme</i>	5	广西玉林、江西樟树
7	虎掌半夏	<i>P. pedatisecta</i>	6	安徽亳州
8	独角莲	<i>Typhonium giganteum</i>	5	资源普查标本库

表2 天南星、半夏及其混伪品 *rbcl* 的 GenBank 序列信息

Table 2 GenBank sequence information of *rbcl* from *Arisaematis Rhizoma*, *Pinellia ternata* and their adulterants

名称	拉丁名称	基因登录号
天南星	<i>A. erubescens</i> 、 <i>A. heterophyllum</i> 、 <i>A. amurense</i>	JF9408(87-92)、MH1160(61-62)、GQ436779、KT0257(27-29)、N0900(37-41)、NC051541、MT676834、FJ6386(18-20)、KT6340(21-23)、JF9408(97-99)、KC466586、GQ436775、KT0257(30-35)、JN0900(31-33)、MZ4244(47-48)、NC063965、ON060885、KT6340(24-29)、KC466583、DQ859161、KT0257(14-20)、JN089989、GQ436774、KT0257(21-26)、JN090030、MW000335、MN2061(49-51)、KT6340(08-14)、KT6340(15-20)
半夏	<i>P. ternata</i>	MH5369(67-69)、MN192450、MH657533、EU193198、KF0224(98-99)、GQ436686、KT0256(95-99)、JN0899(74-78)、JQ237203、NC027681、KR270823、MT193722、MH5369(70-82)、FJ638617、HQ2217(37-40)
朝鲜天南星	<i>A. peninsulae</i>	KT6340(36-42)
水半夏	<i>T. flagelliforme</i>	KT0257(10-13)、JN0900(12-14)
虎掌半夏	<i>P. pedatisecta</i>	MN192449、EU193197、GQ436691、KT0257(04-09)、JN0899(92-97)、MW013550、NC058756、MN046890、AM905807
独角莲	<i>T. giganteum</i>	EU193201、GQ436690、JN0899(90-91)、MH657548、MH657512、NC050648、MN626718

2 方法

2.1 样品基因组 DNA 提取 取表1中天南星、半夏及其近缘混伪品多种植物的干燥样品约0.5 g于研钵中,加液氮研成细粉,取0.05 g,小心快速转入1.5 mL离心管中,用植物基因组DNA提取试剂盒根据试剂说明提取植物基因组总DNA。用微量荧光分光光度计测定DNA浓度和核酸纯度的指示值。

2.2 酶切位点的选择和引物设计 通过从GenBank数据库中下载天南星、半夏及其近缘混伪

品的 *rbcl* 序列进行比对分析,选择天南星和半夏的特异性酶切位点,并用PrimerPremier 5.0(<http://www.premierbiosoft.com/primerdesign/>)软件在线设计PCR-RFLP反应鉴别引物TNX-244.F、TNX-244.R、BX-257.F、BX-257.R,调整参数使引物扩增产物包含单核苷酸多态性(SNP)位点,且位点位于扩增产物的中间区域,引物位于天南星科 *rbcl* 序列高度保守,且与其他物种具有差别区域,PCR反应条件95 °C预变性5 min;35个循环(95 °C变性30 s,

54 °C退火 30 s, 72 °C延伸 30 s); 72 °C延伸 5 min; 4 °C保存, 引物序列见表3, 引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

表3 引物序列

Table 3 Primer sequence

药材	序列(5'-3')
天南星	上游 ACCTGGTGCAGTAGCAAATC
	下游 TGCAATTAGGAGAACAACACAG
半夏	上游 ACGGTAGAGCGGTTTATGAA
	下游 TAAATAGTCATGCATTACGATAGG

2.3 PCR-RFLP反应鉴别 按照2.1项下的方法提取样品基因组DNA后,进行PCR-RFLP反应,PCR反应体系(总体积为25 μL)组成10×*Taq* Plus Buffer 2.5 μL, dNTPs (10 mmol·L⁻¹) 1.5 μL, 引物上游(10 μmol·L⁻¹) 0.4 μL, 引物下游(10 μmol·L⁻¹) 0.4 μL, *Taq* DNA聚合酶(5 U·μL⁻¹) 0.2 μL, DNA模板1 μL, 灭菌双蒸水补足至25 μL。反应结束后取PCR反应液,置于200 μL PCR管中,进行酶切反应,反应总体积20 μL,反应体系包括10×酶切缓冲液2.8 μL, *Hae* III限制性内切酶(10 U·μL⁻¹) 0.5 μL, 无菌双蒸水补足至20 μL,酶切反应在37 °C水浴反应30 min。同法另取无菌双蒸水,作为阴性对照。反应结束后,取酶切产物5 μL,用2%的琼脂糖凝胶进行电泳检测,然后利用凝胶成像分析仪拍照分析。若供试品凝胶电泳图谱中,在100~250 bp检测出单一的DNA条带,则为正品。

2.4 条件考察 PCR鉴别的准确性和稳定性受到退火温度、循环次数、DNA模板量、酶切时间等条件的影响,为避免出现假阳性结果,在确定引物后,需对上述条件进行考察。同时,还需对该方法的耐用性和适用性进行检测,以确保结果稳定。

3 结果

3.1 酶切位点选择和PCR-RFLP反应扩增引物设计 通过对天南星的*rcbL*序列比对分析,发现天南星与其他混伪品在*rcbL*序列第90 bp和第93 bp处存在2个SNP位点,其第90位均为G,93位均为C,该位点位于*Hae* III限制性内切酶识别序列上,天南星因存在GGCC的序列,可以被*Hae* III内切酶识别和酶切,而其他混伪品则分别为A和T,其序列为AGCT而不能被识别和酶切。结果见图1A;同法对半夏和其他混伪品的*rcbL*序列比对分析,发现半夏与其他混伪品在*rcbL*序列第124 bp处存在1个SNP位点,其第124位均为T,该位点位于*Dra* I限制性

内切酶识别序列上,半夏因存在TTTAAA的序列,可以被*Dra* I内切酶识别和酶切,而其他混伪品在第124位均为A,其序列为TATAAA,不能被识别和酶切。结果见图1B。

经设计鉴别引物进行PCR扩增后,天南星和半夏样品分别经*Hae* III和*Dra* I内切酶酶切后,可产生两片段或切开的小片段,而混伪品均无法酶切,呈大片段。对凝胶电泳条带进行区分,天南星和半夏分别酶切后在100~250 bp出现单一条带;其他混伪品无法酶切,在约250 bp处产生条带。结果见图2。

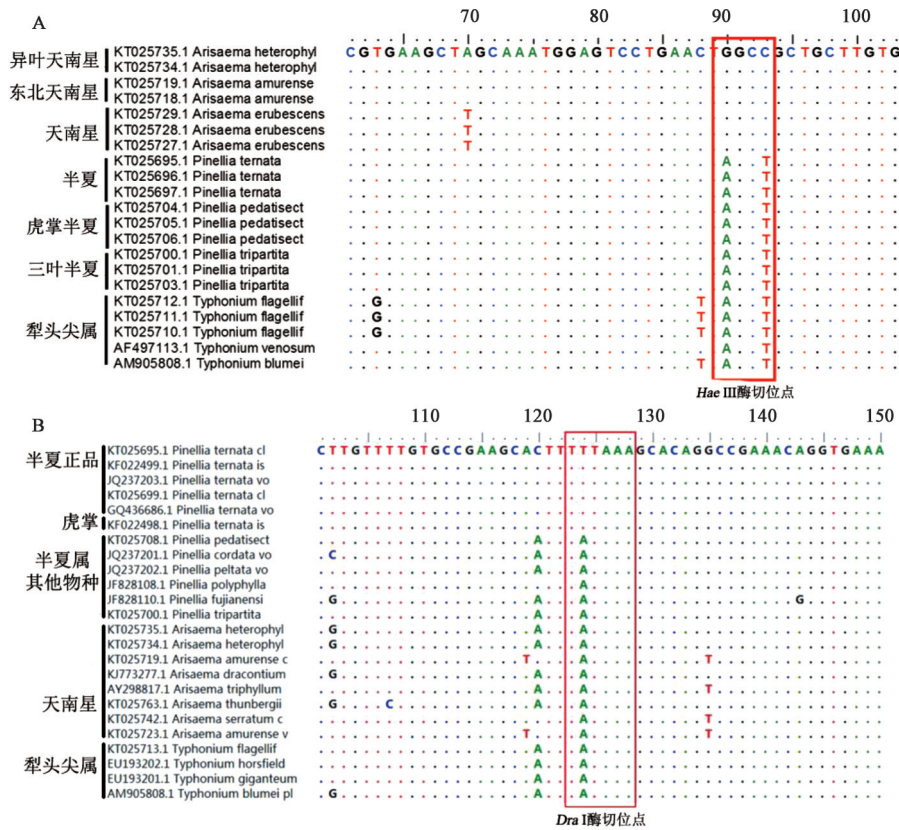
3.2 条件考察结果

3.2.1 退火温度 取天南星、半夏及其混伪品,使用特异性鉴别引物进行PCR扩增。分别设置退火温度为50、52、54、56 °C,结果表明在50~56 °C,样本均扩增获得约250 bp条带,阴性对照无条带。考虑到不同实验室PCR仪及操作可能具有差异性,选择中间的54 °C作为PCR鉴别的退火温度。结果见图3A。

3.2.2 循环次数 取天南星、半夏及其混伪品,使用特异性鉴别引物进行PCR扩增。分别设置循环次数为31、33、35、47个进行扩增,结果表明31个循环时即可看到扩增条带,但部分样品条带很弱,33~37个循环条带逐渐增强。为保证结果的准确性,并防止过高循环产生的假阳性,选择中间的35个循环作为PCR鉴别的循环次数。结果见图3B。

3.2.3 DNA模板量 取天南星、半夏及其混伪品提取的DNA,调整DNA浓度约30 mg·L⁻¹,分别设置相当于0.033、0.1、0.33及1 μL量的DNA模板。使用特异性鉴别引物进行PCR扩增,设定PCR循环次数为35个,退火温度为54 °C进行PCR扩增,DNA模板量为0.1~1 μL(相当于3~30 ng总DNA)时均能扩增,且在循环数足够(≥35个循环)的情况下,DNA浓度对扩增产物的得率影响不大,考虑到DNA浓度过低时,扩增条带过弱,难以进行下游酶切检测试验,故选择25 μL体系中加入3~30 ng总DNA作为最终模板量。结果见图3C。

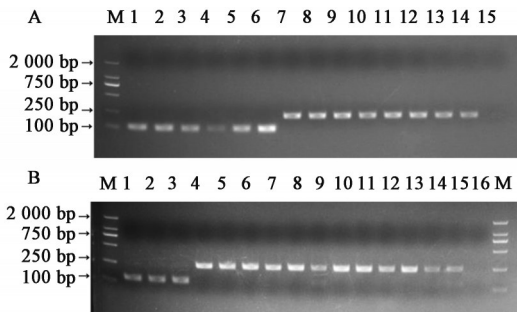
3.2.4 酶切时间 在确定PCR条件的同时,对酶切时间进行了考察,取天南星、半夏及其混伪品样品进行PCR扩增,并取扩增产物进行酶切反应,取*Hae* III限制性内切酶进行酶切,设定酶切时间为10、20、30 min、1 h,结果10 min即能酶切,30 min后能达到完全酶切,天南星酶切产生大小约为120 bp的条带,而混伪品均不能酶切,为约250 bp的单一



注:A.天南星引物设计;B.半夏引物设计

图1 天南星、半夏PCR-RFLP引物设计位点

Fig. 1 Design site of PCR-RFLP primer for *Arisaematis Rhizoma* and *P. ternata*



注:M.Marker;A1~A2、B4~B5.天南星;A3~A4、B6~B7.异叶天南星;A5~A6、B8~B9.东北天南星;A7~A8、B2~B3.半夏;A9~A10、B10~B1.虎杖半夏;A11~A12、B12~B13.水半夏;A13~A14、B14~B15.白附子;A15、B16.空白;B1.对照药材

图2 天南星(A)、半夏(B)及其混伪品的凝胶电泳条带

Fig. 2 Gel electrophoresis bands of *Arisaematis Rhizoma* (A), *P. ternata* (B) and their adulterants

条带,阴性对照无条带。为达到最佳酶切效果,取30 min作为酶切时间。结果见图3D。

3.3 方法耐用性考察

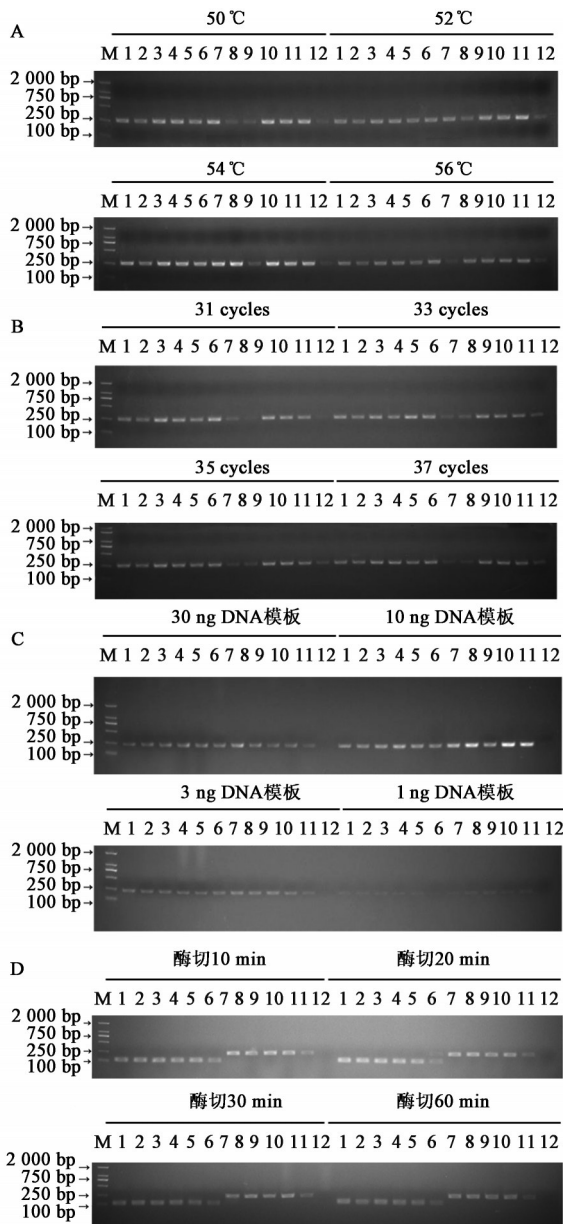
3.3.1 不同PCR仪考察 取天南星、半夏及其混伪品,用ABI9700、Veriti、TC-512及PTC-100型基因扩增仪进行PCR扩增,并用2%的琼脂糖凝胶进行电泳检测。结果表明天南星、半夏及其伪品均能扩增

得到约250 bp的亮带,阴性对照在此范围内均未扩增。不同PCR仪上扩增条带的亮度有差异,但不影响PCR鉴别结果。结果见图4A。

3.3.2 不同Taq酶考察 为测试不同保真度Taq酶对鉴别结果产生的影响,分别采用低保真的rTaq DNA、MightyAmp Taq,中度保真的SpeedSTAR Taq和高度保真的FasPfu Taq聚合酶预混液测定,结果表明采用低、中、高度保真的Taq酶均能获得正确的鉴别结果,虽扩增条带的亮度有差异,但不影响鉴别结果的判读,表明该鉴别方法对酶的要求较低。结果见图4B。

3.4 方法适用性考察

3.4.1 酶切方法有效性考察 为了考察该方法的有效性,使用建立的方法对天南星正品、半夏正品以及混伪品进行PCR-RFLP反应鉴别,结果见图5。所有天南星正品经PCR扩增后,在250 bp均扩增出一条单一的DNA条带,见图5A,经过Dra I限制性内切酶酶切后,天南星正品在100~250 bp出现单一条带,混伪品在此范围内无法被酶切而未产生条带,见图5B;同法用Hae III限制性内切酶对半夏正品和其相应的混伪品进行PCR-RFLP鉴别和酶切,



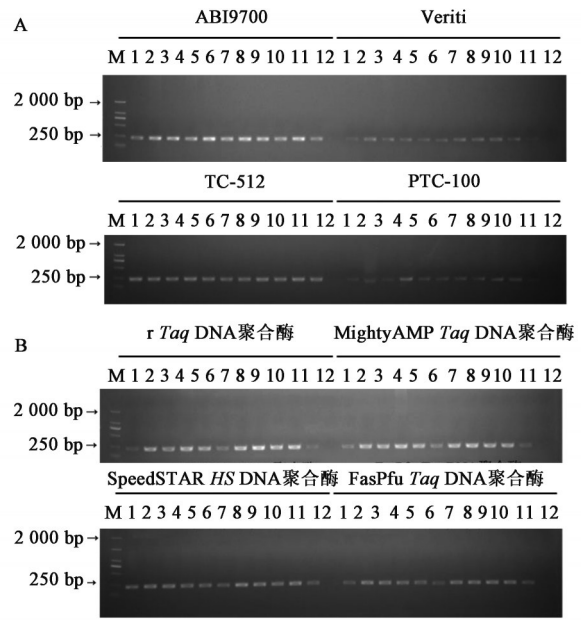
注: A. 退火温度; B. 循环次数; C. DNA 模板量; D. 酶切时间; M. Marker; 1~6. 正品天南星; 7~8. 半夏; 9. 虎掌南星; 10. 水半夏; 11. 白附子; 12. 阴性

图3 不同因素对PCR反应的影响

Fig. 3 Effect of different factors on PCR reactions

结果同上,见图5C、5D。表明该方法对天南星、半夏具有特异性。

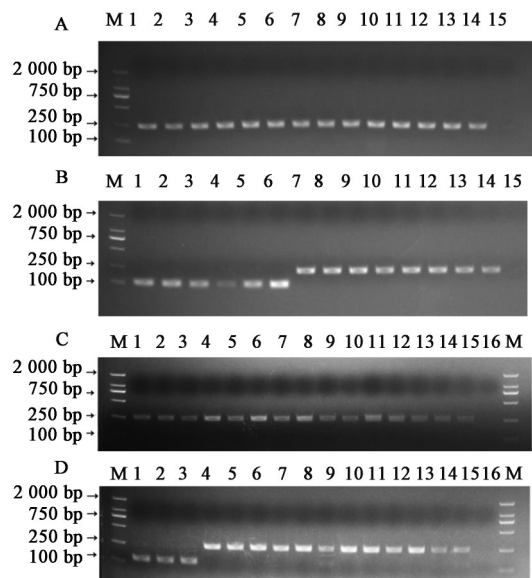
3.4.2 正品鉴定准确性考察 为了考察该方法对天南星和半夏正品鉴定的准确性,收集了46批资源普查的天南星正品药材和1批朝鲜天南星(混伪品);47批资源普查的半夏正品药材。采用2.1项的方法提取基因组DNA,使用上述优化条件体系,对天南星特异性鉴别引物进行PCR扩增,PCR产物经Hae III限制性内切酶酶切30 min后,用2%琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像系统观察结果。结果表明,天



注: A. PCR 仪对反应影响; B. Taq 酶对反应影响; M. Marker; 1~6. 正品天南星; 7~8. 半夏; 9. 虎掌南星; 10. 水半夏; 11. 白附子; 12. 阴性

图4 不同PCR仪和Taq酶对PCR反应的影响

Fig. 4 Effect of different PCR instruments and Taq enzymes on PCR reactions



注: A. 天南星 PCR 扩增产物; B. 天南星酶切产物; C. 半夏 PCR 扩增产物; D. 半夏酶切产物; A、B 顺序编号同图 1A; C、D 顺序编号同图 1B

图5 天南星和半夏及其相应混伪品的PCR-RFLP反应有效性检测

Fig. 5 Detection of validity of PCR-RFLP reactions for Arisaematis Rhizoma, P. ternata and their adulterants

南星正品均在100~250 bp出现单一条带,条带大小略>100 bp。同法用Dra I限制性内切酶对PCR产物进行酶切和电泳检测,结果表明,半夏正品均在

100~250 bp 出现单一条带。说明建立的方法可以准确鉴别天南星和半夏正品,结果见图 6A、6B。

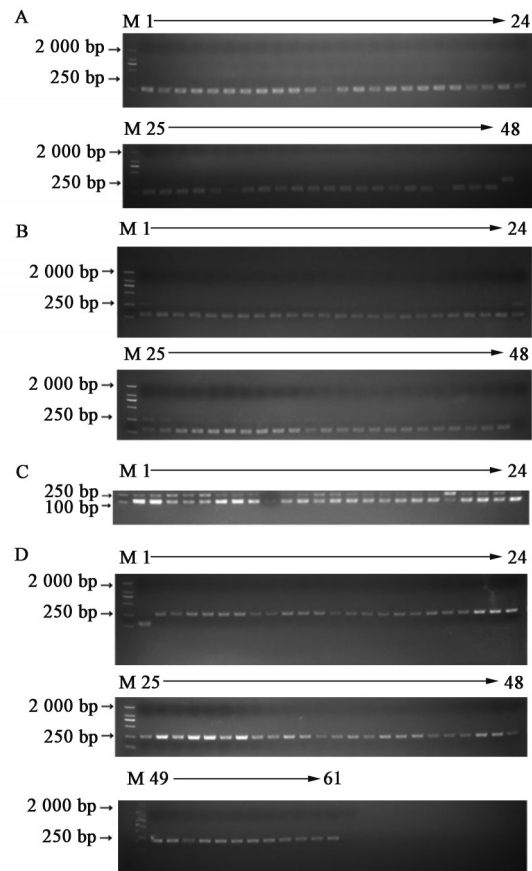
3.4.3 掺杂品鉴定准确性考察 为了考察该方法对掺伪品鉴定的准确性,随机取 5 批半夏正品,分别与 15 批天南星、3 批白附子、3 批虎掌半夏、3 批水半夏样品,经等比例混匀后采用 2.1 项方法提取基因组 DNA,使用上述优化条件体系,对半夏特异性鉴别引物进行 PCR 扩增,PCR 产物经 *Dra* I 限制性内切酶酶切 30 min 后,用 2% 琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像系统观察结果。结果表明,所有样品均出现 2 条条带,其中 1 条约 250 bp,另 1 条约 130 bp,说明该方法检测半夏可同时检出正品和混伪品,可以用于掺杂样品的检测。结果见图 6C。

3.4.4 混伪品检出能力考察 考察该方法对混伪品鉴定的准确性,收集 59 批资源普查的混伪品(包括天南星、虎掌南星、水半夏和白附子),采用 2.1 项的方法提取基因组 DNA,使用上述优化体系,对半夏特异性鉴别引物进行 PCR 扩增,PCR 产物经 *Dra* I 限制性内切酶酶切 30 min 后,用 2% 琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像系统观察结果。结果表明,所有混伪品均不能被酶切而在约 250 bp 处出现明亮单一条带,与半夏条带大小具有明显区别,说明建立的方法可以准确检出半夏混伪品。结果见图 6D。

4 讨论

中医药在抗击和防控新冠疫情中不断彰显了不可替代的国际医疗地位,中药作为中医药的重要组成部分,其药材品质及真伪直接决定了临床治疗是否有效。虽然在我国已大力打击药材掺假等行为,但药材市场浑水摸鱼的例子依然大量存在,尤其发生在形态相似或疗效存在交叉的药材之间。传统的鉴别手段对原植物的保存完整度要求较高,对于经过炮制等加工处理的药材很有可能检测不出或得到错误的检测结果,对于较复杂的混合药材粉末鉴别更是束手无策。因此,尽可能地研究出可以有效检出药材伪劣的新技术是提高用药质量、规范医疗市场的首要任务,其中以 DNA 分子标记为主的鉴定手段是当代相对完美的鉴别技术,结合传统鉴别可以在保证药材是正品的基础上,对药材商品规格进行分级,大大地提高企业或用药单位对药材质量控制的把握程度。

天南星和半夏均为 2020 年版《中华人民共和国药典》收录的品种,二者与其同科或同属植物(虎掌南星、独角莲、水半夏、白附子、朝鲜天南星等)的地下部分外观形态上极为相似,在临床用药或生产制



注:A.天南星正品鉴别;B.半夏正品鉴别;C.掺杂品鉴别;D.混伪品鉴别;M.Marker;A.1~46.正品天南星;47.朝鲜天南星;48.阴性;B.1~47.正品半夏;48.阴性;C.1~3.半夏+虎掌半夏;4~8.半夏+天南星;9~13.半夏+异叶天南星;14~18.半夏+朝鲜天南星;19~21.半夏+水半夏;22~24.半夏+白附子;D.1.正品半夏;2~44.天南星;45~49.水半夏;50~55.白附子;56~60.虎掌半夏;61.阴性

图 6 PCR 反应方法适用性考察

Fig. 6 Examination of applicability of PCR reaction methods

剂中必须严格鉴别,不可混用。但在天南星药材市场上,水半夏、虎掌南星等冒充半夏、天南星或相互掺杂混用的现象屡见不鲜,对临床用药的剂量与安全产生了严重的隐患,不利于中医药市场规范发展。不少研究者已意识到该问题并做出了一定的研究,如赵晓秋^[19]通过传统鉴别手段对天南星、半夏及其易混淆品的化学成分、含量及显微结构进行了定性和定量,但未能有效解决天南星市场掺杂混伪品的鉴别问题;张雅琴等^[5]的研究基于 DNA 条形码序列鉴别技术能够有效的将半夏正品与其他混伪品进行区分,但由于测序成本高,分析难度大,且没有单独设计鉴别天南星的 DNA 条形码,不能满足解决天南星、半夏等药材品种混乱问题的现状。PCR-RFLP 反应法的加入,通过简单灵敏的手段可以有效的缓解当下药材品种混乱与控制药材质量之间的矛盾,成为了药用植物鉴定的一大关注点。

本研究根据天南星和半夏的 *rbcL* 序列结果筛选 SNP 位点,设计出了全新 PCR-RFLP 方法,能够同时快速准确的鉴别药材为天南星、半夏或其近缘混伪品。该方法全面地对影响 PCR 体系结果的条件参数进行了优化和适用性考察,确定了当退火温度为 54 °C、循环次数为 35, DNA 模板量为 3~30 ng 等条件时,结果最有效稳定。本实验还对正品天南星和正品半夏的样品进行实验验证,对半夏与天南星的掺杂品和混伪品进行了检测,检测成功率为 100%,避免了该反应出现假阳性或假阴性的结果^[20]。本研究体系无需测序,在满足企业缩短检测时间成本要求的基础上,还能大幅度的降低经济和人力成本,快速获得准确鉴别结果,对天南星市场的生产和规范化管理具有重大意义。

考虑到鉴别方法具有多元性和最优解,本研究还对天南星、半夏及其混伪品的 ITS 序列进行下载比对分析,建立了差异限制性酶切位点,然而经实验验证 ITS 上的位点序列变异太大,无法设计出有效的 PCR-RFLP 酶切鉴别引物进行鉴别。此外,本实验建立的 PCR-RFLP 体系虽然可以准确的鉴别天南星、半夏或其近缘混伪品,但无法对其他混伪品具体为哪一种药材进行下一步鉴定,混伪品与混伪品如白附子与虎掌南星之间交叉使用的情况依然无法解决,这对完全规范天南星市场运行仍存在一定的隐患。另外,由于朝鲜天南星、独角莲等药材收集困难,样本量不足,混伪品检测的稳定性还有待进一步提高。因此,后续本研究将继续收集药材并挖掘各品种的差异限制性酶切位点,寻求更多更优的体系快速鉴别混伪品,彻底解决天南星同科或同属之间混用的市场问题,为保障中药材源头质量献力。

[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,2020:58-59,123-124.

[2] 黄雍,刘梦娇,张琴,等. 半夏与虎掌南星、天南星的鉴别研究[J]. 湖南中医药大学学报,2018,38(4):406-409.

[3] 王甫成,孟祥松,蒋磊,等. HPLC 指纹图谱法鉴别半夏及其伪品[J]. 辽宁中医药大学学报,2016,18(4):56-58.

[4] 张超,杨诗龙,胥敏,等. 基于气味指纹分析的半夏及其伪品鉴别研究[J]. 世界科学技术—中医药现代化,2015,17(11):2300-2305.

[5] 张雅琴,宋明,孙伟,等. 中药材半夏及其混伪品的 DNA 条形码鉴定研究[J]. 世界科学技术—中医药现代化,2014,16(8):1725-1729.

[6] 赵佳琛,王艺涵,金艳,等. 经典名方中半夏与天南星的本草考证[J]. 中国现代中药,2020,22(8):1361-1380.

[7] 刘永红,郭建宏,张顺仓. 天南星科 9 种易混淆药材的鉴别特征概述[J]. 扬州大学学报:农业与生命科学版,2018,39(4):45-50.

[8] 罗敏,徐广,任星宇,等. 半夏及其混伪品的鉴定方法研究进展[J]. 时珍国医国药,2018,29(11):2739-2741.

[9] 黄雍,刘梦娇,张琴,等. 半夏与虎掌南星、天南星的鉴别研究[J]. 湖南中医药大学学报,2018,38(4):406-409.

[10] 严福林,刘利平,杜富强,等. 基于 FTIR 的天南星及其混伪品鉴别[J]. 中成药,2020,42(1):128-133.

[11] 刘利平,廖华锋,严福林,等. 天南星及其易混品 DNA 条形码鉴别[J]. 中药材,2018,41(10):2323-2328.

[12] 梁宇庭,蒋超,周骏辉,等. 高卢蜜环菌 PCR-RFLP 快速鉴别方法研究[J]. 中国中药杂志,2019,44(17):3622-3626.

[13] WANG C Z, LI P, DING J Y, et al. Simultaneous identification of *Bulbus Fritillariae cirrhosae* using PCR-RFLP analysis[J]. *Phytomedicine*, 2007, 14(9):628-632.

[14] 郑诚,留钰秀,袁莉霞,等. 覆盆子及其近缘混淆品的 PCR-RFLP 鉴别研究[J]. 中国现代应用药学,2022,39(11):1458-1463.

[15] 史中飞,滕宝霞,赖晶,等. PCR-RFLP 鉴别当归药材及饮片中掺混伪品——欧当归的方法[J]. 中国实验方剂学杂志,2021,27(9):168-175.

[16] 燕梦遥,宋平顺,赖晶,等. 基于 ITS 序列 PCR-RFLP 鉴别木香、川木香和藏木香[J]. 南京中医药大学学报,2022,38(4):339-346.

[17] 黄韵璇,朱晓燕,侯惠婵,等. 基于 ITS2 条形码鉴别南大青叶的 PCR-RFLP 研究[J]. 中草药,2021,52(20):6350-6356.

[18] 谢莹,华中一,袁媛,等. 快速筛选高纯度天麻 PCR-RFLP 鉴定方法[J]. 中国实验方剂学杂志,2022,28(17):113-118.

[19] 赵晓秋. 天南星和半夏的显微及理化鉴别[J]. 现代中药研究与实践,2003,17(4):38-39.

[20] 刘阳,杨淑霞,李敏惠,等. 引物浓度与退火温度不当导致巢式 PCR 非特异性扩增[J]. 成都医学院学报,2008,3(2):111-114.

[责任编辑 顾雪竹]