

PCR-RFLP 法鉴别浙贝母及其混淆品湖北贝母

李 莉， 陈 军， 朱 浩， 陈志禹， 孙胡琳
(宁波市药品检验所，浙江宁波 315048)

摘要：目的 建立 PCR-RFLP 法鉴别浙贝母及其混淆品湖北贝母。方法 对比两者叶绿体 *ycf1* 基因，选择湖北贝母的特异性酶切位点 EcoRI 设计引物，优化反应条件，并进行方法学考察。结果 退火温度 58 °C、循环数 35 次时，湖北贝母或掺有湖北贝母的浙贝母经特异性引物扩增后能被 EcoRI 酶酶切，200~400 bp 处检出 2 条单一 DNA 条带，而浙贝母无此条带，检出限达 3%。结论 该方法方便快捷、灵敏度高，可用于浙贝母、湖北贝母及前者掺混后者的快速检测，为浙贝母质量控制提供参考。

关键词：浙贝母；湖北贝母；掺混鉴别；PCR-RFLP；*ycf1* 基因

中图分类号：R282.5

文献标志码：B

文章编号：1001-1528(2024)07-2465-05

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2024.07.056

浙贝母首载于《神农本草经》，列为中品，为百合科植物浙贝母 *Fritillaria thunbergii* Miq. 的干燥鳞茎，具有祛痰镇咳、抗菌、抗炎、消肺痈乳痈等作用^[1-2]，主产于浙江金华磐安、宁波海曙及江苏南通、盐城等地。近年来，市场上出现湖北贝母 *F. hupehensis* Hsiao et K. C. Hsia 冒充或掺入浙贝母的现象，尤其加工成饮片后性状上更易混淆。湖北贝母价格约为浙贝母的 2/3，且贝母素乙含量较高，掺入浙贝母中时有利于后者达到 2020 年版《中国药典》标准。

浙贝母和湖北贝母虽同为贝母属植物，亲缘关系较近，但两者有效成分、药理作用均有区别^[3-4]，并且均含有贝母素甲和贝母素乙，采用薄层色谱和高效液相色谱均不能有效区分^[5-6]。

聚合酶链反应-限制性片段长度多态性 (PCR-RFLP) 是在 PCR 基础上酶切一段特异性片段^[7-8]，除 2020 年版《中国药典》一部已收载的川贝母、霍山石斛外^[1]，也有利用该方法鉴别麦冬、石菖蒲、铁皮石斛等药材的报道，但尚未用于浙贝母及其混淆品^[9-12]。*ycf1* 基因是叶绿体上一个通用条形码序列，可有效鉴别植物类中药材^[13-14]，故本实验选择该基因，利用湖北贝母上的特异性酶切位点建立专属性更强、准确度更高的 PCR-RFLP 法，以期实现浙贝母和湖北贝母的有效鉴别，为前者质量控制提供参考。

1 材料

1.1 仪器 ProFlex 梯度 PCR 仪 (美国 Life Technologies 公司)；TissueLyser-II 高通量组织研磨机 (德国 IKA 公司)；QIAxpert 微量分光光度计 (德国 QIAGEN 公司)；Micro 21 微量高速离心机 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司)；MK-20 干式恒温器 (杭州奥盛仪器有限公司)；Sub Cell GT 水平

电泳系统、GelDoc xR+ 凝胶成像仪 (美国 Bio-Rad 公司)。

1.2 试剂 植物基因组提取试剂盒 (货号 D3485，美国 Omega 公司)；2x Det per Master Mix (批号 03106)、D2000 DNA Marker (批号 03906)、Marker I (批号 03430) [天根生化科技 (北京) 有限公司]；EcoRI 限制性内切酶 [纽英伦生物技术 (北京) 有限公司]；GelRed 核酸染料 (美国 Biotium 公司，批号 15G1214)；其他相关试剂均为分子生物学级别，购自天根生化科技 (北京) 有限公司。

1.3 药材 10 批浙贝母 (编号 FT1~FT10) 和 9 批湖北贝母 (编号 FH1~FH9) 均为产地趁鲜切片加工得到，经宁波市药品检验所主任中药师林海伦鉴定为正品，S1~S30 为 2023 年省级评价性考核的浙贝母，具体见表 1。浙贝母、湖北贝母对照药材 (批号 120972-201906、120962-202106) 均购自中国食品药品检定研究院。

2 方法与结果

2.1 酶切位点选择和引物设计 从 NCBI 网站下载得到浙贝母、湖北贝母的叶绿体 *ycf1* 基因序列，登录号分别为 32282446、20160011，采用 Clustal X 软件对齐后进行序列的对比分析，结果见图 1。由此可知，湖北贝母 *ycf1* 序列 (49~593 bp) 在第 273 位存在特异性酶切位点 EcoR I (5' G↓AATTC3')，而浙贝母无此位点。采用 Primer Premier 5.0 软件确定可被限制性内切酶酶切的 SNP 位点，设计正向/反向引物，正向 FT-1，5'-ACGACTGCTGTTATGGCTA-3'；反向 FT-2，5'-GTCTGGATGTAATGCTGAT-3'，PCR 扩增条件为 95 °C 4 min, 35× (95 °C 30 s, 58 °C 30 s, 72 °C 30 s), 72 °C 5 min。浙贝母、湖北贝母经 FT-1/FT-2 引物扩增后均得到 544 bp 特异性条带，经 EcoR I 酶切后湖北贝母得到 2 条大小为 244、320 bp 的特异性条带，浙贝母则无

收稿日期：2023-12-18

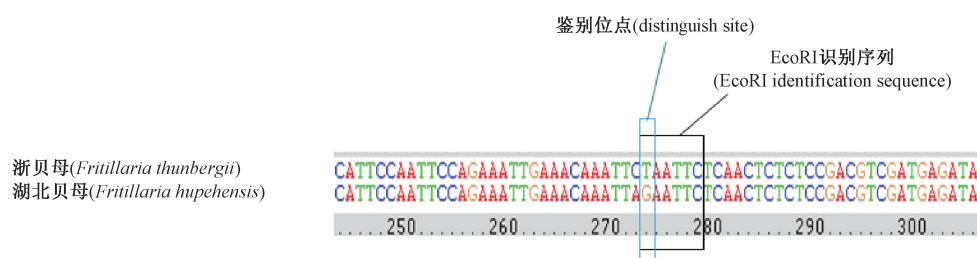
基金项目：中国食品药品检定研究院项目 (TCM2021-YJ10)

作者简介：李 莉 (1984—)，女，硕士，主管中药师，研究方向为中药质量分析。Tel：(0574) 89180378，E-mail：407719530@

qq.com

表1 样品信息

编号	名称	来源或产地	编号	名称	来源或产地
FT1	浙贝母	浙江磐安	S7	浙贝母	安徽魏武中药饮片科技有限公司
FT2	浙贝母	浙江磐安	S8	浙贝母	浙江中医药大学中药饮片有限公司
FT3	浙贝母	浙江磐安	S9	浙贝母	浙江籽麻开门中药饮片有限公司
FT4	浙贝母	浙江磐安	S10	浙贝母	浙江国新中药饮片有限公司
FT5	浙贝母	宁波樟村	S11	浙贝母	浙江桐君堂中药饮片有限公司
FT6	浙贝母	宁波樟村	S12	浙贝母	浙江珍源堂中药饮片有限公司
FT7	浙贝母	宁波樟村	S13	浙贝母	浙江景岳堂药业有限公司
FT8	浙贝母	宁波樟村	S14	浙贝母	绍兴震元中药饮片有限公司
FT9	浙贝母	江苏海门德胜	S15	浙贝母	杭州华东中药饮片有限公司
FT10	浙贝母	江苏海安角斜	S16	浙贝母	天马国药科技股份有限公司
FH1	湖北贝母	浙江磐安	S17	浙贝母	浙江三溪堂中药有限公司
FH2	湖北贝母	湖北恩施	S18	浙贝母	浙江一方制药有限公司
FH3	湖北贝母	湖北恩施	S19	浙贝母	浙江桐君堂中药饮片有限公司
FH4	湖北贝母	湖北恩施	S20	浙贝母	浙江康恩贝制药股份有限公司
FH5	湖北贝母	湖北恩施利川	S21	浙贝母	亳州市永刚饮片厂有限公司
FH6	湖北贝母	湖贝恩施利川	S22	浙贝母	安徽盛海堂中药饮片有限公司
FH7	湖北贝母	浙江磐安	S23	浙贝母	浙江康恩贝制药股份有限公司
FH8	湖北贝母	浙江磐安	S24	浙贝母	嘉兴东方国药饮片股份有限公司
FH9	湖北贝母	湖北恩施	S25	浙贝母	安徽林鑫中药饮片有限公司
S1	浙贝母	杭州华东中药饮片有限公司	S26	浙贝母	浙江华宇药业股份有限公司
S2	浙贝母	浙江佐力百草中药饮片有限公司	S27	浙贝母	嘉兴东方国药饮片股份有限公司
S3	浙贝母	浙江胡庆余堂本草药物有限公司	S28	浙贝母	绍兴震元中药饮片有限公司
S4	浙贝母	杭州民泰中药饮片有限公司	S29	浙贝母	浙江康宁医药有限公司
S5	浙贝母	杭州民泰中药饮片有限公司	S30	浙贝母	浙江贝尼菲特药业有限公司
S6	浙贝母	浙江佐力百草中药饮片有限公司			

图1 浙贝母、湖北贝母 *zf1* 序列酶切位点

法被 EcoR I 酶切。

2.2 总DNA提取 样品用75%乙醇擦洗，再用灭菌超纯水冲洗后晾干，置于球磨仪中粉碎成细粉，取粉末50 mg，置于1.5 mL离心管中，植物基因组提取试剂盒提取得到基因组总DNA；取浙贝母、湖北贝母对照药材各50 mg，同法制得对照药材模板DNA溶液，用微量分光光度计测定模板DNA浓度。

2.3 PCR-RFLP法鉴别浙贝母与湖北贝母 PCR扩增反应体系总体积为25 μL，包括12.5 μL 2x Det pcr Master Mix及0.5、1.5 μL正向/反向引物(10 μmol/L)模板，高压灭菌超纯水补至25 μL。将PCR反应液置于500 μL离心管中进行酶切反应，反应体系总体积为20 μL，包括2 μL 10×酶切

缓冲液、8 μL PCR反应液、0.5 μL EcoR I (10 U/μL)，无菌超纯水补足至20 μL，37 °C水浴中反应2 h；按照以上体系配制阳性对照的反应溶液；空白对照不含模板DNA，并用等体积高压灭菌超纯水补足。反应结束后，取酶切产物10 μL进行1.2%琼脂糖凝胶电泳检测，电泳结束后用凝胶成像仪拍照检视。若在与湖北贝母对照药材电泳图谱的相应位置，即200~400 bp处均检出2条单一DNA条带，则为掺有湖北贝母。

2.4 条件优化

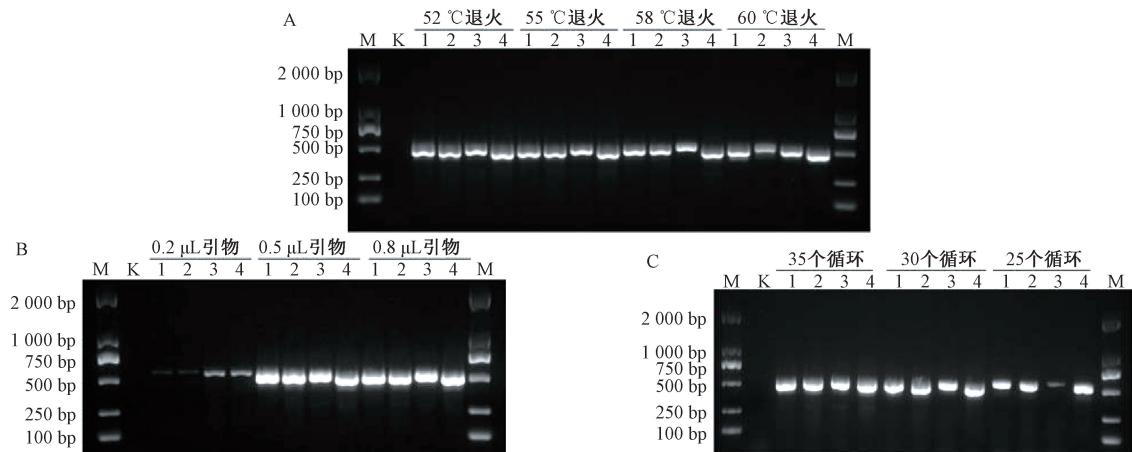
2.4.1 PCR反应 取不同产地的浙贝母(编号FT-1、FT-5)和湖北贝母(编号FH-1、FH-2)各2批，选取对PCR反应影响较大的退火温度、引物浓度、循环数，用1.2%琼

脂糖凝胶进行电泳检测，对退火温度 52、55、58、60 ℃ 进行考察，发现在 55~60 ℃ 时均获得明亮单一条带，空白对照无条带（图 2A），但 52 ℃ 退火时出现非特异性扩增，故以 58 ℃ 为退火温度。

分别加入 0.2 μL 正向/反向引物（10 μmol/L）时，浙贝母、湖北贝母扩增效率明显降低，当引物加入量为 0.5、

0.8 μL 时则均未出现非特异性扩增，且条带较亮，见图 2B。由于非特异性扩增机会随着引物浓度提高而增加，故选择正向/反向引物（10 μmol/L）各 0.5 μL。

循环数为 25 时，样品 PCR 扩增效率较低，不利于 PCR-RFLP 反应；循环数为 30、35 时，样品均未出现特异性扩增，可获得目的条带，见图 2C，故选择循环数为 35。



注：A 为退火温度，B 为引物量，C 为循环数，M 为 D2000 DNA Marker，K 为空白对照，1 为 FT-1，2 为 FT-5，3 为 FH-1，4 为 FH-2。

图 2 不同因素对 PCR 反应的影响

2.4.2 酶切反应 选择酶切反应时间和酶切反应 PCR 产物加入量进行考察。结果，酶切 0.5~2 h 内湖北贝母能被 EcoR I 酶切，得到 2 条大小分别为 244、320 bp 的特异性 DNA 条带，见图 3A；酶切体系（20 μL）中 PCR 产物分别为 6、8、10 μL 时，湖北贝母能被 EcoR I 酶切，检出 2 条条带，且亮度随着 PCR 产物加入量提高而增加，见图 3B，故选择 PCR 产物加入量 10 μL，酶切时间为 2 h。

2.5.1 适用性试验 对浙贝母、湖北贝母对照药材及调研收集的 10 份浙贝母、9 份湖北贝母进行 PCR-RFLP 反应，扩增后所有样品均在 500~600 bp 处检出单一条带，见图 4A；经 EcoR I 酶切后，湖北贝母在 200~400 bp 处检出 2 条条带，但浙贝母只在 500~600 bp 处检出 1 条条带，见图 4B，表明该方法对湖北贝母有特异性，可用于浙贝母与其鉴别。

2.5.2 专属性试验 在同一批浙贝母（FT-1）中分别掺入同一批 0、1%、3%、5%、10%、20%、50%、100% 湖北贝母（FH-2），并进行 PCR-RFLP 反应，结果见图 5。由此可知，浙贝母中掺入 1% 湖北贝母时在 200~400 bp 处检出 2 条较暗的 DNA 条带，而掺入 3% 及以上湖北贝母时均能在 200~400 bp 处检出 2 条 DNA 条带，说明该方法对浙贝母中掺混湖北贝母的检出限为 3%。

此外，本研究还在不同来源的浙贝母中分别掺入 50% 不同来源的湖北贝母进行 PCR-RFLP 鉴别，结果见图 6。由此可知，掺混样品在湖北贝母 200~400 bp 处检出 2 条 DNA 条带，表明 PCR-RFLP 法可用于检查浙贝母是否掺混湖北贝母。

2.5.3 市售样品验证 采用 PCR-RFLP 法对 30 批省级评价性抽验样品进行鉴别，结果见图 7。由此可知，S7、S21 只在湖北贝母 200~400 bp 处检出 2 条 DNA 条带，即为湖北贝母；S16 除在 200~400 bp 处检出 2 条 DNA 条带外，在 500~600 bp 处也检出 1 条 DNA 条带，即为掺有湖北贝母的浙贝母。

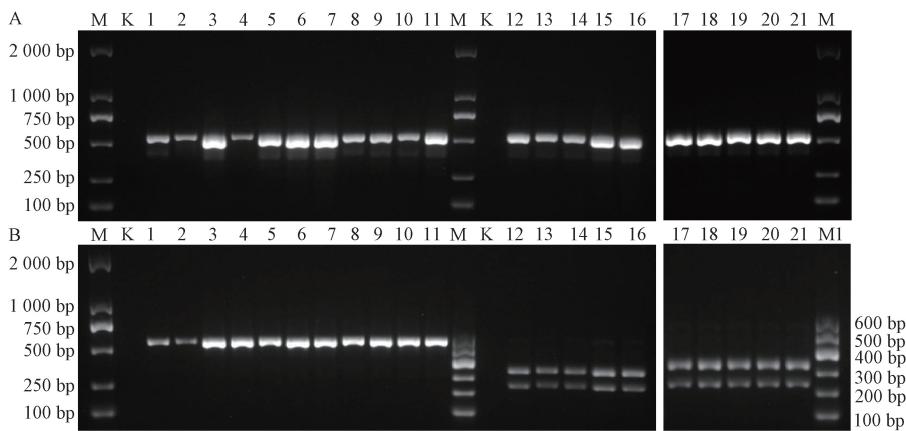
3 讨论

本研究从 NCBI 网站下载已公布的浙贝母、湖北贝母叶

注：A 为酶切反应时间，B 为 PCR 产物加入量，M 为 D2000 DNA Marker，M1 为 DNA Marker I，K 为空白对照，1 为 FT-1，2 为 FT-5，3 为 FH-1，4 为 FH-2。

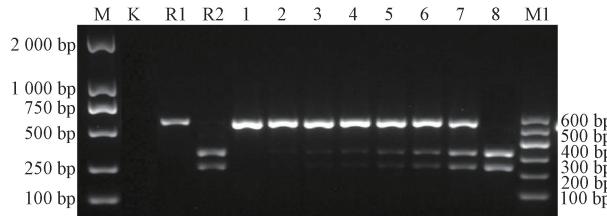
图 3 不同因素对酶切反应的影响

2.5 方法学考察



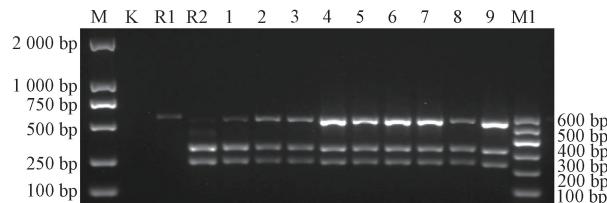
注: A 为 PCR 扩增产物, B 为酶切产物, M 为 D2000 DNA Marker, M1 为 DNA Marker I, K 为空白对照, 1 为浙贝母对照药材, 2~11 为 10 批浙贝母样品, 12 为湖北贝母对照药材, 13~21 为 9 批湖北贝母样品。

图 4 不同来源浙贝母和湖北贝母的 PCR-RFLP 鉴别结果



注: M 为 D2000 DNA Marker, M1 为 DNA Marker I, K 为空白对照, R1 为浙贝母对照药材, R2 为湖北贝母对照药材, 1 为 FT-1, 2 为 FT-1+1% FH-2, 3 为 FT-1+3% FH-2, 4 为 FT-1+5% FH-2, 5 为 FT-1+10% FH-2, 6 为 FT-1+20% FH-2, 7 为 FT-1+50% FH-2, 8 为 FT-1+100% FH-2。

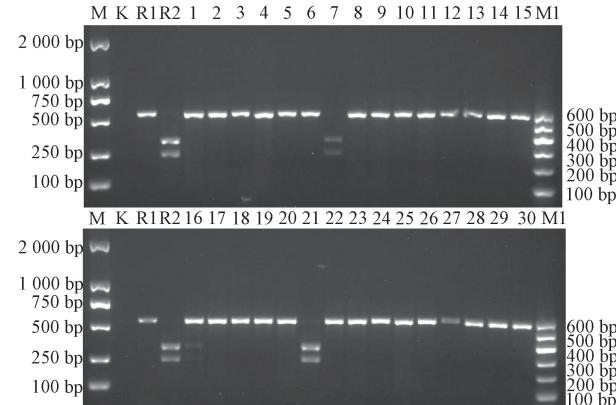
图 5 浙贝母中掺入不同比例湖北贝母的 PCR-RFLP 鉴别结果



注: M 为 D2000 DNA Marker, M1 为 DNA Marker I, K 为空白对照, R1 为浙贝母对照药材, R2 为湖北贝母对照药材, 1 为 FT-1+FH-1, 2 为 FT-2+FH-2, 3 为 FT-3+FH-3, 4 为 FT-4+FH-4, 5 为 FT-5+FH-5, 6 为 FT-6+FH-6, 7 为 FT-7+FH-7, 8 为 FT-8+FH-8, 9 为 FT-9+FH-9。

图 6 不同来源浙贝母中掺入 50% 不同来源湖北贝母的 PCR-RFLP 鉴别结果

绿体基因组序列, 曾设计多对特异性引物以找到浙贝母特有片段, 但均没有合适的, 故尝试 PCR-RFLP 法。相比于其他通用的条形码序列(如 ITS、*rbcL*、*psbA-trnH* 等), 叶绿体基因组上的 *ycf1* 序列的扩增效率、位点差异率及品种鉴定率等更佳^[15]。另外, 应用 DNA 条形码鉴定需要进行测序, 但很多实验室还未达到这方面条件, 如果只需要检查浙贝母与湖北贝母是否冒充或掺伪, 则本实验建立的



注: M 为 D2000 DNA Marker, M1 为 DNA Marker I, K 为空白对照, R1 为浙贝母对照药材, R2 为湖北贝母对照药材, 1~30 为样品 S1~S30。

图 7 30 批省级抽验浙贝母样品 PCR-RFLP 鉴别结果

PCR-RFLP 法更快捷、有效, 可应用于浙贝母的监督和评价检验。

药材相比于鲜品提取难度大, 课题组前期曾采用新型植物基因组 DNA 提取试剂盒, 但浙贝母 DNA 浓度低, 无法用于 PCR 扩增, 而改用 D3485 植物基因组提取试剂盒提取的 DNA 能成功扩增, 亮度大。为拓宽 PCR-RFLP 技术在浙贝母与湖北贝母鉴别中的应用面, 本实验收集了 10 批浙贝母、9 批湖北贝母和 30 批省考样品, 利用软件分析浙贝母、湖北贝母 *ycf1* 序列, 设计正、反向引物, 再采用 D3485 植物基因组提取试剂盒提取总 DNA, 筛选最优的实验条件, 同时还探索了同一批浙贝母掺入同一批湖北贝母的不同比例、不同来源浙贝母中分别掺入 50% 不同来源湖北贝母的掺混鉴别实验, 结果显示该方法灵敏度高, 稳定性好, 可有效区分浙贝母和湖北贝母。

当前, 中药 DNA 鉴定手段越来越多^[16~17]。基于遗传物质稳定性, 分子生物学技术的灵敏度、微量量化除应用于药材饮片外, 还可应用于中药原粉^[18]、含原粉的中成药^[19]及配方颗粒^[20~22], 但还要考虑饮片在炮制过程、中成药在加

工过程中对 DNA 的破坏情况, PCR-RFLP 法是否适用于含浙贝母原粉的中成药还需进一步研究。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2020 年版一部 [S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020.
- [2] 孙贝贝, 杜伟峰, 康显杰, 等. 浙贝母的本草考证及产地变迁[J]. 中华中医药杂志, 2022, 37(9): 5142-5146.
- [3] 金 鑫, 李春楠, 张 辉. 贝母属药材中生物碱类化学成分及其药理活性研究进展[J]. 中药材, 2022, 45(9): 2273-2279.
- [4] 卢 琦, 薛淑静, 杨 德, 等. 湖北贝母与浙贝母的成分及理化性质对比分析[J]. 食品工业科技, 2023, 44(3): 49-55.
- [5] 林 娜, 张晓芹, 蓝 艳, 等. 浙贝母质量控制的研究进展[J]. 中国药房, 2017, 28(9): 1289-1291.
- [6] 梁月仪, 李振雨, 吕渭升, 等. 基于 HPLC-ELSD 指纹图谱和多成分定量的浙贝母与湖北贝母质量差异研究[J]. 天然产物研究与开发, 2023, 35(7): 1101-1111.
- [7] 陈士林, 姚 辉, 韩建萍, 等. 中药材 DNA 条形码分子鉴定指导原则[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(2): 141-148.
- [8] 袁 媛, 蒋 超, 黄璐琦. 中药材分子鉴别现场运用的策略与实践[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(16): 2553-2555.
- [9] 张林祥, 倪 琳, 赖 晶, 等. 麦冬药材及饮片中掺混山麦冬的 PCR-RFLP 鉴别方法研究[J]. 药物分析杂志, 2023, 43(4): 712-720.
- [10] 杜晓伟, 宋平顺, 倪 琳. 石菖蒲药材及饮片掺混藏菖蒲 PCR-RFLP 鉴别方法研究[J]. 中国中医药信息杂志, 2023, 30(5): 121-126.
- [11] 王孟颖, 万林春, 赵 雯, 等. 铁皮石斛的 PCR-RFLP 鉴别方法[J]. 药物分析杂志, 2023, 43(3): 509-515.
- [12] 刘 流, 邵顺章, 支荣荣. PCR-RFLP 法鉴别罗布麻与混淆品白麻及其 *psbA-trnH* 序列分析[J]. 药学与临床研究, 2021, 29(6): 411-415.
- [13] 倪梁红, 赵志礼, 米 玛. 药用植物叶绿体基因组研究进展[J]. 中药材, 2015, 38(9): 1990-1994.
- [14] 卫永乐, 温志芳, 刘 芳, 等. 椿属 *ycf1* 基因生物信息学分析[J]. 山西农业科学, 2018, 46(8): 1244-1247; 1333.
- [15] 胡一凡, 张雪梅, 石乃星, 等. 云南草果种质资源 DNA 条形码序列分析[J]. 中草药, 2019, 50(24): 6091-6097.
- [16] 辛天怡, 娄 千, 郝利军, 等. 市售中药饮片 DNA 条形码鉴定研究[J]. 药学学报, 2021, 56(3): 879-889.
- [17] 黄 琳, 罗达龙, 黄林杰. 中药材浙贝母的实时荧光定量 PCR 方法研究[J]. 轻工科技, 2016, 32(8): 33-34.
- [18] 王 丽, 金 艳, 蒋 超, 等. 猪胆粉及其中成药的特异性 PCR 鉴别方法[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(17): 136-141.
- [19] 朱高倩, 王 丽, 殷子喻, 等. 含灯盏花中成药 DNA 提取及其分子鉴定[J]. 中国现代中药, 2023, 25(9): 1878-1886.
- [20] 张 伟, 孙叶芬, 金传山, 等. 中药配方颗粒研究现状与展望[J]. 中草药, 2022, 53(22): 7221-7233.
- [21] 李国卫, 魏 梅, 罗宇琴, 等. 用于金钱白花蛇药材、标准汤剂及中药配方颗粒 PCR 鉴别的引物组合及其应用、鉴别方法: 中国, CN114657256A[P]. 2022-06-24.
- [22] 赵玉洋, 秦 雯, 李源森芋, 等. 紫河车饮片干浸膏粉及配方颗粒的位点特异性 PCR 鉴别[J]. 中国现代中药, 2022, 24(3): 493-499.