

实时荧光定量 PCR 法鉴别川贝母掺伪

杨 健^{1,4}, 李 靖^{2,4}, 薛维娜³, 王爱民², 何 彬², 王永林¹, 李勇军², 席晓岚^{1*}, 刘 亭^{1*}

(1. 贵州医科大学, 贵州省药物制剂重点实验室/省部共建药用植物功效与利用国家重点实验室, 贵州 贵阳 550004; 2. 贵州医科大学, 民族药与中药开发应用教育部工程研究中心, 贵州 贵阳 550004; 3. 贵州医科大学医药卫生管理学院, 贵州 贵阳 550025; 4. 贵州医科大学药学院, 贵州 贵阳 550025)

摘要: **目的** 建立实时荧光定量 PCR 法检测川贝母样品中掺伪程度。**方法** 利用川贝母 ITS1 区序列的特点, 设计 4 条用于特异性鉴别川贝母的正向引物 1~4。同时, 设计相应的反向引物, 配合正向引物组成引物对, 进行实时荧光定量 PCR 扩增。利用川贝母、浙贝母、平贝母、伊贝母和湖北贝母对照品以及市售川贝母样品, 通过 PCR 扩增来考察引物对 1~4 鉴别川贝母的准确性。通过实时荧光定量 PCR 法, 考察引物检测川贝母掺伪程度的准确性。**结果** 引物对 1~4 可以准确检测川贝母的真伪; 通过荧光定量 PCR 法, 可准确检测出川贝母样品中的伪品的掺伪程度。**结论** 该方法简便、快捷、准确, 可用于川贝母样品中掺伪程度的定量鉴别。

关键词: 川贝母; 掺伪; 荧光定量 PCR

中图分类号: R282.5 文献标志码: A 文章编号: 1001-1528(2020)05-1262-07

doi: 10. 3969/j. issn. 1001-1528. 2020. 05. 030

Identification adulteration in *Fritillariae Cirrhosae* by real-time fluorescence quantitative PCR method

YANG Jian^{1,4}, LI Jing^{2,4}, XUE Wei-na³, WANG Ai-min², HE Bin², WANG Yong-lin¹, LI Yong-jun², XI Xiao-lan^{1*}, LIU Ting^{1*}

[1. Guizhou Provincial Key Laboratory of Pharmaceutics / State Key Laboratory of Functions and Applications of Medicinal Plants, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China; 2. Engineering Research Center for the Development and Application of Ethnic Medicine and TCM (Ministry of Education), Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China; 3. School of Medicine and Health Management, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, China; 4. School of Pharmacy, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, China]

KEY WORDS: *Fritillariae Cirrhosae* Bulbus; adulteration; real-time fluorescence quantitative PCR

川贝母 *Fritillariae Cirrhosae* Bulbus 是百合科贝母属川贝母 *Fritillaria cirrhosa* D. Don、甘肃贝母 *Fritillaria przewalskii* Maxim.、暗紫贝母 *Fritillaria unibracteata* Hsiao et K. C. Hsia、瓦布贝母 *Fritillaria unibracteata* Hsiaoet K. C. Hsia var. wabuensis (S. Y. Tang et S. C. Yue) Z. D. Liu, S. Wang et S. C. Chen、梭砂贝母 *Fritillaria delavayi* Franch. 或太白

贝母 *Fritillaria taipaiensis* P. Y. Li 的干燥鳞茎^[1-2], 有化痰止咳、清热润肺、散结消痈之功效^[3-5]。由于川贝母的药用价值高、疗效显著、市场需求量大, 故常有用其他贝母类药材混充川贝母的现象, 如浙贝母、平贝母、伊贝母、湖北贝母等。

目前川贝母鉴别中最常用且最准确的是由 2015 年版《中国药典》收录的 PCR-RFLP 法, 该

收稿日期: 2019-03-26
基金项目: 国家自然科学基金项目 (U1812403); 贵州省科技计划项目 (黔科合基础 [2019] 1280); 中央引导地方科技专项项目 (黔科中引地 [2018] 4006); 贵州省科学技术厅人才团队项目 (黔科合平台人才 [2016] 5613 \ 5677)
作者简介: 杨 健 (1994—), 男, 硕士生, 从事中药药效物质基础及质量控制研究。E-mail: 1586740@qq.com
* 通信作者: 席晓岚 (1963—), 女, 硕士生导师, 从事中药新药研发及质量控制研究。Tel: (0851) 86908468, E-mail 970088464@qq.com
刘 亭 (1981—), 男, 博士, 硕士生导师, 从事中药药理研究。Tel: 14785563829, E-mail: t-liu@163.com

法是一种鉴别单个川贝母真伪的方法，并不能反应样品的整体情况，不能准确反应样品的掺伪程度^[6-7]。按制药企业一次购买川贝母 200 kg 以上计算，按 2015 年版《中国药典》规定^[8-9]，至少需要抽取 25~50 g 左右川贝母样品进行检测，需要进行 50~100 次 PCR-RFLP 反应，工作量较大，耗时较长且成本高昂。所以在生产中，常常只取 10 g 左右川贝母进行真伪鉴别，但是这种取样方法并不能反应样品的整体情况，不能准确反应样品的掺伪程度。尤其是在临床上，川贝母常以粉末形式使用，这更方便了不法分子使用混伪品冒充或掺入川贝母；而混合样品由于 DNA 不纯，很难用药典 PCR-RFLP 法来检测混合粉末样品中的掺伪程度。

实时荧光定量 PCR 法是一种基于特异性基因序列的快速准确、灵敏度高的定性定量方法^[10]。本研究利用川贝母 ITS1 区序列的特点^[11-13]，设计了 2 条特异性鉴别真川贝母的正向引物以及 2 条特异性鉴别常见的伪川贝母的正向引物，配合设计的反向引物分别组成引物对进行实时荧光定量 PCR 扩增，以期开发一种可检测川贝母样品掺伪程度的实时荧光定量 PCR 法。

1 材料

表 1 引物序列

Tab. 1 Primer sequences

名称		引物序列
鉴别川贝母真品引物	正向引物 1	5' GGCACATATGCTAGCCCTCCC 3'
	正向引物 2	5' GGCACATATGCTAGCCCTTCC 3'
鉴别川贝母伪品引物	正向引物 3	5' GGCACATATGCTAGCCCTCCT 3'
	正向引物 4	5' GGCACATATGCTAGCCCTTCT 3'
	反向引物	5' AGAGCCGAGATATCCGTTGC 3'
PCR-RFLP 引物	正向引物	5'CGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAA 3'
	反向引物	5' GCTACGTTCTTCATCGAT 3'

2 方法

2.1 基因组 DNA 提取 称取样品粉末 0.5 g 于 5 mL 离心管中，按基因组提取试剂盒说明提取 DNA，最后加入 20 μL 双蒸水洗脱，得到样品基因组 DNA，-20 ℃保存备用。

2.2 PCR-RFLP 反应 引物使用 PCR-RFLP 引物，按 2015 年版《中国药典》方法进行操作。30 μL PCR 体系为 10 × PCR 缓冲液 3 μL，MgCl₂（25 mmol/L）2.4 μL，dNTP（10 mmol/L）0.6 μL，正向引物（30 μmol/L）0.5 μL，反向引物（30 μmol/L）0.5 μL，基因组 DNA 200 ng，KOD-plus 酶（5 U/μL）0.2 μL，无菌双蒸水补足至 30 μL。PCR 反应程序为 95 ℃预变性 4 min；扩

DNA 提取试剂盒（货号 AP-MN-MS-GDNA-50）购自美国 Axygen 公司；GelRed（货号 41003）购自美国 Biotium 公司；DNA Marker I（货号 MD101）和 50 bp DNA Ladder（货号 MD108）均购自北京天根生化科技有限公司；SYBR 荧光定量 PCR 试剂（货号 RR820Q）、6×Loading Buffer（货号 9156）均购自日本 Takara 公司；KOD-plus 酶（货号 F0 934 K）均购自日本 Toyobo 公司；Sma I 酶（货号 ER0661）购自美国 Thermo 公司。G：BOX ChemiXL1.4 型凝胶成像仪（英国 Syngene 公司）；CFX-96 型荧光定量 PCR 仪、PowerpacTM Basic 电泳仪型（美国 BIO-RAD 公司）；Fresco 17 型高速冷冻离心机（美国 Thermo 公司）；TMC 振荡恒温孵育器（合肥艾本森科学仪器有限公司）。PCR 引物由英潍捷基（上海）贸易有限公司合成，信息见表 1。

对照品川贝母（批号 121000-201108）、平贝母（批号 120924-201410）、伊贝母（批号 120929-201005）、湖北贝母（批号 120962-201005）、浙贝母（批号 120972-201405）均购自中国食品药品检定研究院。市售川贝母 10 批，分别于贵阳市各药店购买，标号依次为 CBM-1 至 CBM-10。

增 30 个循环（95 ℃变性 30 s，55 ℃退火 30 s，72 ℃延伸 30 s）；72 ℃延伸 5 min。

取 PCR 反应液置于 1.5 mL 离心管中，利用 Sma I 酶对其进行酶切。反应体系为 10×酶切缓冲液 2 μL，PCR 反应液 6 μL，Sma I 酶（10 U/μL）0.5 μL，无菌水补足至 20 μL。反应在 30 ℃水浴中进行 2 h。样品利用 1.5% 琼脂糖凝胶进行电泳，电压 5 V/cm；电泳时间 30 min，使用凝胶成像仪拍照并保存图像。

2.3 荧光定量 PCR 反应 2×SYBR PCR 缓冲液 2 μL，正向引物（10 μmol/L）0.3 μL，反向引物（10 μmol/L）0.3 μL，基因组 DNA 200 ng，无菌双蒸水补足至 20 μL。94 ℃预变性 4 min；扩增 40

个循环，每个循环包括以下步骤，94 ℃ 30 s，68 ℃ 30 s，读板获取荧光信息。

2.4 考察引物对 1~4 鉴别川贝母的准确性

2.4.1 鉴别川贝母、平贝母、湖北贝母、浙贝母、伊贝母 取川贝母、平贝母、湖北贝母、浙贝母和伊贝母对照品的基因组 DNA。分别用引物对 1~4，按“2.3”项下方法进行 PCR 扩增，并用琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。电泳条件为恒压，电压为 5 V/cm；电泳时间 30 min。结果与 PCR-RELP 法进行比较。

2.4.2 鉴别市售川贝母 取市售川贝母样品（CBM-1 至 CBM-10）各 50 g，依次用灭菌水、75% 乙醇和双蒸水清洗，置于超净工作台晾干，转至另一个研钵中，研磨成细粉。按“2.1”项下方法提取基因组 DNA。分别用引物对 1~4，按“2.3”项下方法进行 PCR 扩增，并用琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。电泳条件为恒压，电压为 5 V/cm；电泳时间为 30 min。结果与 PCR-RELP 法进行比较。

2.5 川贝母样品掺伪程度检测

2.5.1 对照品混合样品制备 取川贝母、浙贝母、平贝母、伊贝母和湖北贝母对照品（粉末），分别按表 2 混合川贝母真品和伪品。

2.5.2 市售样品混合样品制备 分别取市售川贝母样品中鉴别为川贝母真品和川贝母伪品的样品，在研钵中研磨成细粉，分别按表 2 混合川贝母真品和伪品。

2.5.3 PCR 检测 利用真川贝母鉴别引物（引物 1 或引物 2），进行实时荧光定量 PCR 扩增，得到 C_t 值（ $C_{t真}$ ）^[14]；利用伪川贝母鉴别引物（引物 3 或引物 4）配合反向引物，进行实时荧光定量 PCR 扩增，得到 C_t 值（ $C_{t伪}$ ），则川贝母混合样品的掺伪比例 = $1 / [(1 + 2^{-(C_{t真} - C_{t伪})})] \times 100\%$ 。

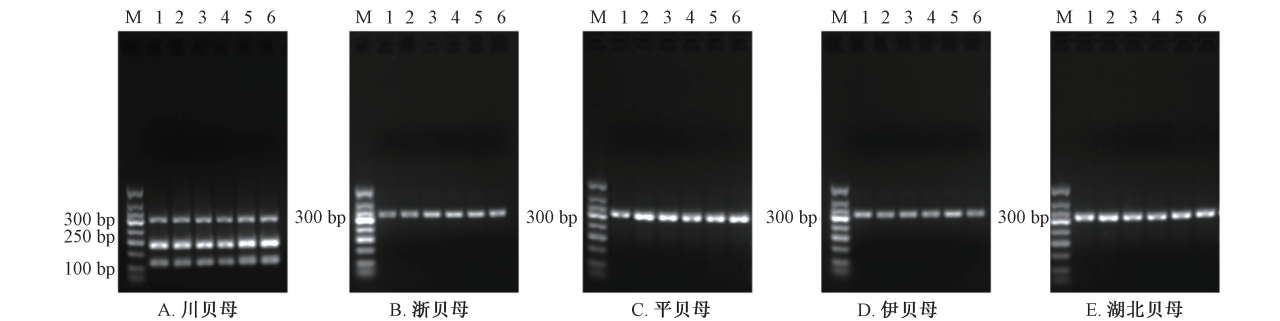
进行荧光定量 PCR 反应时，引物对 1 和引物对 3 配合使用，引物对 2 和引物对 4 配合使用。

表 2 川贝母和伪品混合比例

Tab. 2 Mixed proportion of <i>F. Cirrhosae</i> and counterfeit			
混合样品	川贝母质量/ mg	伪品质量/ mg	伪品含量 /%
1	50	450	90
2	100	400	80
3	150	350	70
4	200	300	60
5	250	250	50
6	300	200	40
7	350	150	30
8	400	100	20
9	450	50	10

3 结果

3.1 PCR-RFLP 反应鉴别 利用 PCR-RFLP 引物，按《中国药典》方法对川贝母、平贝母、湖北贝母、浙贝母和伊贝母对照品进行 PCR-RFLP 反应，结果见图 1。经 Sma I 酶切后，川贝母对照品在 100~250 bp 之间出现了 2 条酶切条带，与药典规定相符；浙贝母、平贝母、伊贝母和湖北贝母对照品在 100~250 bp 之间没有酶切条带，均符合药典。



注：M 为 DNA marker，泳道 1~6 分别为贝母对照品的 6 个批次。

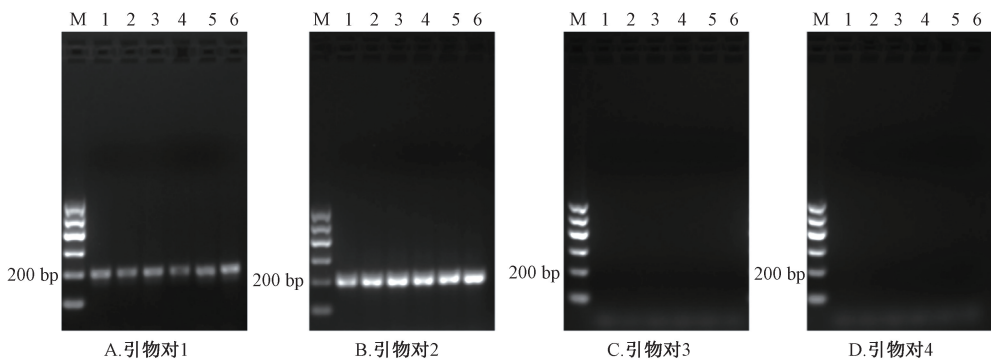
图 1 各对照品 PCR-RFLP 反应电泳图谱

Fig. 1 PCR-RFLP electrophoresis of various reference samples

3.2 PCR 鉴别结果 利用特异性引物对 1~4，对川贝母对照品的基因组 DNA 进行 PCR 扩增，结果见图 2。在引物对 1~2 的作用下，川贝母对照品扩增出了 200 bp 左右的条带，而引物对 3~4 不能引发 PCR 扩增，符合理论预期。这一检测结果与药典 PCR-RFLP 结果相符，表明当 PCR 反应模板为

川贝母真品时，本研究所的引物对 1~2 可以引发 PCR 扩增，得到 200 bp 左右的产物；而引物对 3、4 不能引发 PCR 扩增。

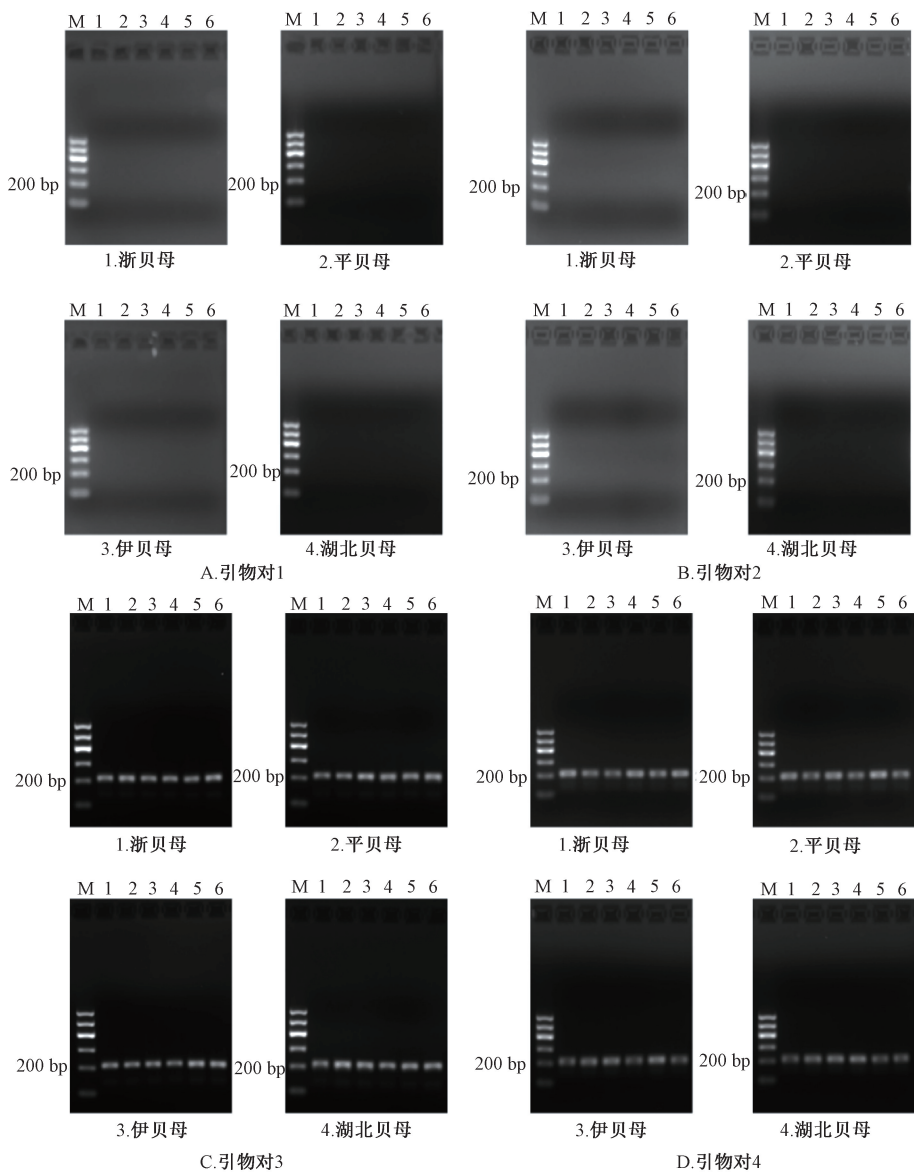
3.3 引物对 1~4 鉴别 利用特异性引物对 1~4，对浙贝母、平贝母、伊贝母、湖北贝母的基因组 DNA 进行 PCR 扩增，结果见图 3。当 PCR 反应模



注：M 为 DNA marker，泳道 1~6 分别为 6 个不同批次的川贝母对照品。

图 2 引物对 1~4 对川贝母对照品进行 PCR 扩增的电泳图谱

Fig. 2 PCR electrophoresis of primers pairs 1-4 of *F. Cirrhosae* reference samples



注：M 为 DNA marker，泳道 1~6 分别为对应贝母对照品的 6 个批次。

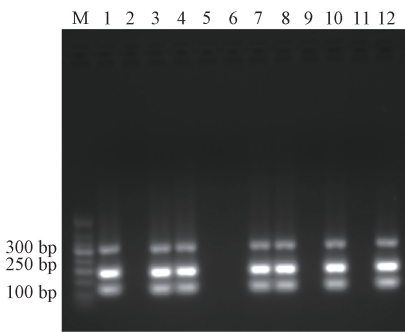
图 3 引物对 1~4 对各样品进行 PCR 扩增的电泳图谱

Fig. 3 Electrophoresis of PCR amplification of various samples with primers 1-4

板为川贝母伪品（浙贝母、平贝母、伊贝母和湖北贝母）时，本研究所的引物对 1~2 不能引发 PCR 扩增；本研究所的引物对 3~4 能引发 PCR 扩增，得到 200 bp 左右的产物。

3.4 PCR-RFLP 反应鉴别市售川贝母 按 2015 年版《中国药典》规定，川贝母真品经 Sma I 酶切后，产生 2 条新的条带且大小在 100~250 bp 之间。由酶切后的电泳图见图 4，CBM-1、CBM-2、CBM-5、CBM-6、CBM-8、CBM-10 6 批药材和川贝母对照品一样，在 100~250 bp 之间有 2 条带，表明均为真品；而 CBM-3、CBM-4、CBM-7、CBM-9 4 批药材和平贝母对照品一样没有条带，表明均为伪品。

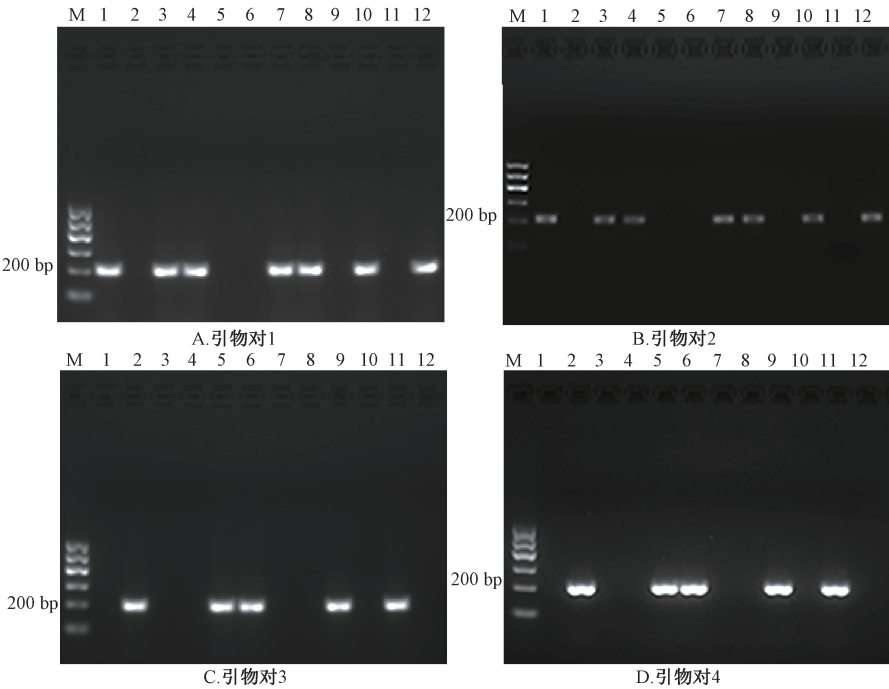
3.5 引物对 1~4 鉴别市售川贝母 根据本研究所得出结论，川贝母真品经引物对 1~2 PCR 扩增后，应该出现一条 200 bp 左右的条带；而川贝母伪品经引物对 3~4 PCR 扩增后，应该出现一条 200 bp



注：M 为 DNA marker，泳道 1~2 分别为川贝母对照品、平贝母对照品；泳道 3~12 分别为市售川贝母 CBM-1~ CBM-10。

图 4 PCR-RFLP 法鉴别市售川贝母的电泳图谱
Fig. 4 Electrophoresis of *F. Cirrhosae* samples identified by PCR-RFLP

左右的条带。结果见图 5，市售川贝母样品经引物对 1~4 扩增后的实验结果与“3.4”项一致，表明本研究所设计的特异性引物可用于鉴别川贝母真伪。



注：M 为 DNA marker，泳道 1~2 分别为川贝母对照品、平贝母对照品；泳道 3~12 分别为市售川贝母 CBM-1~ CBM-10。

图 5 市售川贝母样品荧光定量 PCR 产物电泳图谱
Fig. 5 Electrophoresis of PCR samples of *F. Cirrhosae*

3.6 荧光定量 PCR 法鉴别川贝母及常见伪品的混合样品掺伪 川贝母对照品及常见川贝母伪品对照品的混合样品经真川贝母鉴别引物对 1~2 进行实时荧光定量 PCR 扩增得到 C_t 值记为 $C_{t真}$ ；经伪川贝母鉴别引物对 3~4 进行实时荧光定量 PCR 扩增得到 C_t 值记为 $C_{t伪}$ ，经计算得到相应的混合样品的掺伪比例，结果见表 3~4。结果显示，计算所得

川贝母掺伪比例与实际的伪品含有量接近。
3.7 荧光定量 PCR 法检测市售川贝母混合样品掺伪 市售川贝母混合样品经引物对 1~4 进行实时荧光定量 PCR 扩增后，分别得到 $C_{t真}$ 和 $C_{t伪}$ ，经计算得到相应的混合样品的掺伪比例，结果见表 5。计算所得川贝母掺伪比例与实际的伪品含有量接近。

表 3 引物对 1~3 混合川贝母样品的掺伪程度检测结果

Tab.3 Degree results of detecting the adulteration of mixed samples by primers 1-3

混合样品	浙贝母			平贝母			伪品含有量/%
	引物对 1	引物对 3	计算值/%	引物对 1	引物对 3	计算值/%	
	C _t 值 _(真)	C _t 值 _(伪)		C _t 值 _(真)	C _t 值 _(伪)		
1	28.56	25.41	89.0	28.23	25.10	89.7	90
2	27.51	25.58	79.2	27.19	25.22	79.7	80
3	26.98	25.74	70.3	26.68	25.49	69.5	70
4	26.45	25.90	59.4	27.30	26.73	59.8	60
5	26.21	26.17	50.7	26.94	26.93	50.2	50
6	25.84	26.44	39.8	26.61	27.23	39.4	40
7	25.51	26.77	29.5	26.41	27.64	29.9	30
8	25.32	27.34	19.8	26.12	28.13	19.9	20
9	25.62	28.75	10.3	26.10	29.26	10.1	10

表 4 引物对 2~4 检测混合川贝母样品的掺伪程度结果

Tab.4 Degree results of detecting the adulteration of mixed samples by primers 2-4

混合样品	浙贝母			平贝母			伪品含有量/%
	引物对 2	引物对 4	计算值/%	引物对 2	引物对 4	计算值/%	
	C _t 值 _(真)	C _t 值 _(伪)		C _t 值 _(真)	C _t 值 _(伪)		
1	27.98	24.84	89.8	28.19	25.02	90.0	90
2	27.04	25.09	79.8	27.21	25.18	80.3	80
3	26.51	25.29	70.0	26.56	25.36	69.7	70
4	26.05	25.47	59.9	6.14	25.59	59.5	60
5	25.71	25.74	49.5	25.83	25.85	49.7	50
6	25.55	26.09	40.8	25.61	26.17	40.5	40
7	24.34	25.52	30.6	25.37	26.58	30.2	30
8	24.11	26.08	20.3	25.14	27.11	20.3	20
9	24.29	27.47	9.9	25.33	28.51	9.9	10

表 5 引物对 1、3、2、4 检测市售川贝母混合样品掺伪程度结果

Tab.5 Degree results of detecting the adulteration of mixed samples by primers 1, 3 and primers 2, 4

混合样品	引物对(C_t 值)		计算值 (伪品含有量)/%	引物对(C_t 值)		计算值 (伪品含有量)/%	伪品含有量 /%
	1	3		2	4		
1	28.17	25.06	89.6	28.16	24.94	90.3	90
2	27.27	25.26	80.1	27.56	25.54	80.2	80
3	26.61	25.45	69.1	27.04	25.81	70.1	70
4	26.46	25.84	60.6	26.67	26.04	60.7	60
5	26.14	26.11	50.5	26.26	26.31	49.1	50
6	25.91	26.47	40.4	26.07	26.63	40.4	40
7	25.70	26.91	30.2	25.82	27.05	29.9	30
8	25.47	27.43	20.4	25.65	27.63	20.2	20
9	25.64	28.83	9.9	25.73	28.92	9.9	10

4 讨论

本研究设计的真川贝母鉴别引物以川贝母 ITS1 区的第 75 位碱基“C”为 3′末端，伪川贝母鉴别引物以伪川贝母 ITS1 区的第 75 位碱基“T”为 3′末端^[11]。2 种引物的 3′端的第 3 个碱基处，都引入了碱基错配，增加了鉴别的特异性和准确性。本研究所述的引物对 1~4 可以用于鉴别川贝母真品和浙贝母、平贝母、伊贝母、湖北贝母等常见川贝母伪品，准确率与 2015 年版《中国药典》收录的 PCR-RELP 法一致，不会出现假阳性扩增；且可用于市售川贝母的真伪鉴别，同样，无假阳性扩增出现。

本研究首次利用荧光定量 PCR 法实现对川贝母掺伪品的相对定量检测，利用设计的川贝母真品鉴别引物对 1~2，进行实时荧光定量 PCR 扩增，得到 Ct 值（Ct_真）；利用川贝母伪品鉴别引物对3~4，进行实时荧光定量 PCR 扩增，得到 Ct 值（Ct_伪）。只需同时进行 2 次实时荧光定量扩增，再通过简单计算即可检测川贝母样品中常见伪品的掺伪程度，无需进行酶切，且该法允许大量取样，这极大减少了工作量，缩短了检测时间，并且准确度高，从而能更好的推广川贝母的分子鉴定。与传统的 PCR-PFLP 法相比，消除了有毒有害试剂对试验人员的影响，并且能够实时监测试验结果，操作更加便捷，大大缩短检测周期^[15]，以期为川贝母的检测提供参考。

参考文献：

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典：2015 年版一部[S]. 北京：中国医药科技出版社，2015.

[2] 鲍方名, 薛 满. 川贝母分子鉴别方法的应用及改进[J]. 安徽医药, 2016, 20(10)：1872-1875.

[3] 张志勇, 杨 洁, 齐泽民. 川贝母的研究进展[J]. 江苏农业科学, 2017, 45(24)：9-13.

[4] 孙 涛, 彭 成. 川贝母止嗽颗粒的平喘作用研究[J].

时珍国医国药, 2013, 24(7)：1575-1577.

[5] 颜晓燕, 彭 成. 川贝母药理作用研究进展[J]. 中国药房, 2011, 22(31)：2963-2965

[6] 胡 伟, 陈伟盛, 林秀旋, 等. 聚合酶链式反应-限制性片段长度多态性（PCR-RFLP）鉴定川贝母药材的方法优化[J]. 药物分析杂志, 2017, 37(9)：1716-1720.

[7] 辛天怡, 李西文, 姚 辉, 等. 中药材二维 DNA 条形码流通监管体系研究[J]. 中国科学：生命科学, 2015, 45(7)：695-702.

[8] 周亭亭. 川贝母鉴定方法进展研究[J]. 现代交际, 2017 (11)：191-192.

[9] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典：2015 年版四部[S]. 北京：中国医药科技出版社，2015.

[10] 吴 迪, 郭 青. TaqMan 实时荧光定量 PCR 法检测紫河车掺伪的研究[J]. 中药材, 2017, 40(1)：38-41.

[11] 徐传林, 李会军, 李 萍, 等. 川贝母药材分子鉴定方法研究[J]. 中国药科大学学报, 2010, 41(3)：226-230.

[12] 王冲之. 中药质量控制的分子生物学方法研究[D]. 南京：中国药科大学，2003.

[13] 张文娟, 刘 薇, 魏 锋, 等. 聚合酶链式反应-限制性片段长度多态性法用于检定川贝母掺伪情况的研究[J]. 药物分析杂志, 2014, 34(10)：1830-1835.

[14] 易健明, 屈武斌, 张成岗. 实时荧光定量 PCR 的数据分析方法[J]. 生物技术通讯, 2015, 26(1)：140-145.

[15] 周朝东, 黄哲甦. 荧光定量 PCR 技术在药品检验领域中的应用[J]. 天津药学, 2018, 30(2)：65-71.