

- [19] 蔡泽荣, 胡玉梅, 刘文君, 等. UPLC-Q-TOF-MS/MS 和 GC-MS 法分析银翘清热片化学成分[J]. 南京中医药大学学报, 2025, 41(9): 1198-1212.
- [20] Sookying S, Pekthong D, Oo-Puthinan S, et al. Quantitation of bacopaside I in rat biological samples by LC-QTOF-MS/MS and its pharmacokinetic application[J]. *Nat Prod Commun*, 2017, 12(6): 893-896.
- [21] Liu Q B, Li W, Huang L, et al. Identification, structural modification, and dichotomous effects on human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) replication of ingenane esters from *Euphorbia kansui*[J]. *Eur J Med Chem*, 2018, 156(8): 618-627.
- [22] 颜 昱, 李 军, 宋月林, 等. 利用 HPLC-IT-TOF-MS 表征 通关藤化学轮廓[J]. 中草药, 2018, 49(21): 5051-5060.
- [23] 周道堂, 段 慧, 彭 潇, 等. 基于 UPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS 技术的飞龙掌血叶化学成分研究[J]. 中南药学, 2025, 23(11): 3189-3197.
- [24] 何 钦, 颜干明, 殷海霞, 等. 基于 UPLC-Q/TOF-MS 结合多元统计学方法分析不同来源乳香的化学成分[J]. 南京中医药大学学报, 2025, 41(5): 668-677.
- [25] 苟晓玲, 丁 银, 罗玉婷, 等. 基于超高效液相色谱-四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱的藏药圆柏子化学成分分析研究[J]. 成都中医药大学学报, 2023, 46(3): 22-30.

## 以茯苓为例建立中成药 LPCR 分子鉴定方法

田艳秋<sup>1</sup>, 黄灵鹤<sup>1</sup>, 徐德宏<sup>1</sup>, 谭朝阳<sup>1,2\*</sup>

(1. 湖南中医药大学药学院生物工程实验室, 湖南长沙 410208; 2. 湖南丹检医药科技有限公司, 湖南长沙 410208)

**摘要:** 目的 以茯苓为例, 建立一种适合中成药的全新分子鉴定技术——连接依赖 PCR (LPCR)。方法 根据茯苓的单核苷酸多态性 (SNP) 位点, 设计荧光探针和 PCR 引物。基于 Ct 值对检测条件进行优化, 考察方法特异性, 并对市售含茯苓的中成药进行检测。**结果** LPCR 具有良好的特异性、耐用性和灵敏度, 茯苓及六味地黄制剂 (丸、胶囊、滴丸、颗粒)、藿香正气制剂 (水、合剂、口服液、滴丸) 中均成功检测出相应条带, 并且缺茯苓阴性样品对检测结果无干扰。最低 10 个拷贝数时, 采用电泳法仍可检出茯苓。**结论** LPCR 可准确检测出不同剂型中成药中茯苓的特异性 DNA, 适用于高度降解 DNA 样品的检测, 通用性强, 可为该类制剂质量控制提供新的技术手段。

**关键词:** 中成药; 茯苓; 连接依赖 PCR (LPCR); 单核苷酸多态性 (SNP); 分子鉴定

**中图分类号:** R284.1

**文献标志码:** A

**文章编号:** 1001-1528(2026)05-1738-07

**doi:** 10.3969/j.issn.1001-1528.2026.05.046

近年来, 分子生物学技术广泛应用于中药鉴定中<sup>[1]</sup>, 其中 DNA 条形码技术已被收入 2020 年版《中国药典》<sup>[2]</sup>, 成为中药材鉴定的法定方法<sup>[3-5]</sup>, 但需进行测序分析, 难以用于日常检测。限制性内切酶长度多态性 (PCR-RFLP) 已用于川贝母、霍山石斛等中药的鉴定中<sup>[6]</sup>, 特异性、重复性良好, 但要求检测所需差异位点正好是某种限制性内切酶的识别序列, 只适用于少数品种。位点特异性 PCR 在蛇类药材中得到应用, 在配方颗粒中也有大量报道<sup>[7-9]</sup>, 但其检测条件要求严格, 条件稍微改变就会产生不稳定的结果<sup>[10]</sup>。此外, 荧光定量

PCR (qPCR)、多重连接探针扩增法 (MLPA)、高分辨率熔解曲线 (HRM)、环介导等温扩增 (LAMP)、多重 PCR<sup>[11-17]</sup> 等分子检测技术在中药鉴定中均有应用, 但所需靶 DNA 序列较长, 一般为 100~500 bp。中成药中大多数药味经长时间高温提取、浓缩、干燥等程序处理后 DNA 降解严重、含量低微, 除粉末入药的药味外现有分子检测方法难以用于其质量控制<sup>[18]</sup>, 也鲜有分子鉴定的报道。

课题组前期创建了连接依赖 PCR (LPCR) 分子检测技术, 可对短至 10 bp 的靶 DNA 进行检测, 适用于严重降解的 DNA, 解决了中成药中药味分

收稿日期: 2025-10-11

基金项目: 湖南省自然科学基金面上项目 (2025JJ50100, 2025JJ80122); 湖南中医药大学“十四五”重点学科——生物工程学科 [校行发规字 [2023] 2号]; 湖南中医药大学研究生科研创新项目资助 (2024CX181)

作者简介: 田艳秋 (2001—), 女, 硕士, 从事中药资源及其质量研究。E-mail: tianyanqiu@stu.hnucm.edu.cn.

\* 通信作者: 谭朝阳 (1970—), 男, 博士, 副教授, 硕士生导师, 从事中药资源及其质量研究。E-mail: tomtzy@hnucm.edu.cn.

子鉴定难题。本研究采用LPCR对茯苓及中成药中的该药材进行检测, 以期为其质量控制提供全新的技术手段。

## 1 材料

1.1 药物 样品购自中国食品药品检定研究院、各大药房和电商平台, 具体见表1。

表1 样品信息

| 编号   | 名称            | 产地 | 来源              | 批号            |
|------|---------------|----|-----------------|---------------|
| FL01 | 茯苓            | 湖南 | 湖南中医药大学第一附属医院   | CK19040901    |
| FL02 | 茯苓            | 湖南 | 湖南中医药大学第一附属医院   | CK21063001    |
| FL03 | 茯苓            | 湖南 | 湖南药王堂医药有限公司     | —             |
| FL04 | 茯苓            | 湖北 | 河北楚风中药饮片有限公司    | B2404070101   |
| FL05 | 茯苓(对照)        | —  | 中国食品药品生物制品检定院   | 121117-201910 |
| FL06 | 茯苓            | 安徽 | 亳州市鲲鹏药业有限公司     | 231118039     |
| FL07 | 茯苓            | 安徽 | 康美药业股份有限公司      | 240505091     |
| FL08 | 茯苓皮           | 安徽 | 康美药业股份有限公司      | 240500671     |
| FL09 | 茯神            | 湖南 | 康美药业股份有限公司      | 240601831     |
| FL10 | 茯苓            | 安徽 | 安徽普仁中药饮片有限公司    | 2310071       |
| FL11 | 茯苓            | 云南 | 湖南中医药大学第一附属医院   | XH25011707    |
| ZL   | 猪苓            | 陕西 | 康美药业股份有限公司      | 240500741     |
| LW01 | 六味地黄丸         | —  | 九芝堂股份有限公司       | 201902059     |
| LW02 | 六味地黄丸         | —  | 山西旺龙药业集团有限公司    | 20220501      |
| LW03 | 六味地黄丸         | —  | 上海宝龙安庆药业有限公司    | 221187        |
| LW04 | 六味地黄胶囊        | —  | 吉林省民泰制药股份有限公司   | 240309        |
| LW05 | 六味地黄胶囊        | —  | 吉林敖东洮南制药股份有限公司  | 2311022       |
| LW06 | 六味地黄胶囊        | —  | 吉林省民泰制药股份有限公司   | 220904        |
| LW07 | 六味地黄胶囊        | —  | 广东万方制药有限公司      | 231201        |
| LW08 | 六味地黄胶囊        | —  | 吉林省通化博祥药业股份有限公司 | 230701        |
| LW09 | 六味地黄胶囊        | —  | 吉林市鹿王制药股份有限公司   | 221002        |
| LW10 | 六味地黄滴丸        | —  | 江西济民可信药业有限公司    | 230603        |
| LW11 | 六味地黄滴丸        | —  | 江苏颐海药业有限责任公司    | 240801        |
| LW12 | 六味地黄颗粒        | —  | 保和堂(焦作)制药有限公司   | 20220701      |
| HX01 | 藿香正气水         | —  | 湖南时代阳光药业股份有限公司  | 20170602      |
| HX02 | 藿香正气合剂        | —  | 恩威(江西)制药有限公司    | 200711        |
| HX03 | 藿香正气口服液       | —  | 太极集团重庆涪陵制药厂有限公司 | 21071039      |
| HX04 | 藿香正气滴丸        | —  | 天士力制药集团股份有限公司   | 161010        |
| SL   | 参苓口服液         | —  | 湖南九典制药股份有限公司    | 211006        |
| XY   | 逍遥丸           | —  | 九芝堂股份有限公司       | 201903004     |
| BH   | 保和丸           | —  | 仲景宛制药股份有限公司     | 200302        |
| LWYX | 六味地黄制剂缺茯苓阴性样品 | —  | 自制              | —             |
| HXYX | 藿香正气制剂缺茯苓阴性样品 | —  | 自制              | —             |
| SLYX | 参苓口服液缺茯苓阴性样品  | —  | 自制              | —             |
| XYXX | 逍遥丸缺茯苓阴性样品    | —  | 自制              | —             |
| BHYX | 保和丸缺茯苓阴性样品    | —  | 自制              | —             |

1.2 仪器 Gentier 96E 荧光定量PCR仪(西安天隆科技有限公司); T100 PCR仪(德国Bio-Rad公司); AG5404台式冷冻离心机、D30核酸蛋白分析仪[艾本德(上海)国际贸易有限公司]; TG-MC-4K迷你离心机(南京安杰优生物科技有限公司); DZKW-D-2电热恒温水浴锅(北京市永光明

医疗仪器有限公司); MINI SPACE 1000凝胶成像分析仪、VE-186水平电泳槽(上海天能科技有限公司); PL203电子称量天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司]。

1.3 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, 货号DP-305]; 9°N

DNA Ligase (哈尔滨新海基因检测有限公司, 货号D3003); Accurate Taq HS DNA 聚合酶 ( $Mg^{2+}$ -)、GL DNA Marker 500 (湖南艾科瑞生物工程有限公司, 货号AG11206、AG11905)。引物、探针均由湖南艾科瑞生物工程有限公司合成。

## 2 方法

2.1 实验原理及方法设计 从 GenBank 数据库中下载茯苓及近缘物种的 ITS 序列, 通过序列比对来筛选出茯苓的 SNP 位点, 见图 1 (序列 5'-CCCTCAACTCCGTCGCGCTTTGTT-3', 第 12 位 G), BLAST 分析显示此位点具有良好的特异性, 即在其他物种中未检出, 而在茯苓中均可检出; 在 GenBank 数据库中共检出 64 条茯苓序列含此位点, 而且未发现无此 SNP 的茯苓相关序列; 在除茯苓外的其他物种中只检出 1 条序列 (MW751766.1) 含此 SNP, 但与茯苓相似度最高 (达 99.92%), 可靠性存疑, 可能是物种鉴定错误。



图 1 茯苓 SNP 位点

基于上述 SNP 位点设计左右杂交探针, 分别与其左右序列互补。检测时当左右探针与靶 DNA 杂交后可通过连接酶来相连 (图 2), 再设计引物, 采用 PCR 方法对其进行扩增检测。

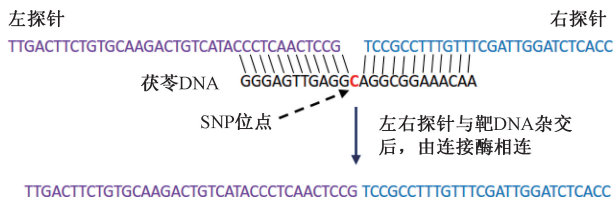


图 2 LPCR 检测原理

杂交探针和引物序列分别为左探针 FLLP-T:5'-(FAM) TTAGACTTCTGTGCAAGACTGTCAT (BHQ1) ACCCTCAACTCCG-3', 右探针 FLRP: 5'-(P) TCCGCCTTTGTTTCGATTGGATCTCAC CATTCCGCT C-3'; 正向引物同左探针; 反向引物 FL-RR: 5'-

GAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGTGCTTAGCC AATGGTGAGATCCAATCGAAACAAAGGCGGA-3'; 检测模板 FLMB-2: 5'-AACAAAGCGGACGGAGT TGAGGG-3'; 检测阴性对照模板 FLYX-2: 5'-AAC AAAGCGGAGGGAGTTGAGGG-3'。

左探针设计时连接了荧光基团 FAM 以及猝灭基团 BHQ1, 为单链 DNA 状态时由于 DNA 链的卷曲, 荧光基团和猝灭基团相互靠近, 从而荧光被猝灭; PCR 扩增后由于形成 DNA 双螺旋结构, 链得到延伸, 荧光基团和猝灭基团远离, 荧光增强, 可对 PCR 产物进行荧光检测, 测定循环阈值 (Ct 值)。在 qPCR 方法中, 通常以 Ct 值 < 35 为靶 DNA 的检出限度<sup>[19]</sup>, 可见明显的扩增曲线, Ct 值越小, PCR 产物越多, 可用于对检测参数进行比较, 优化 LPCR 检测条件。

2.2 样品 DNA 提取 药材粉碎成细粉后称取 100 mg, 加入 0.7 mL GP1 缓冲液, 56 °C 水浴过夜, 65 °C 水浴 20 min; 固体制剂取 2 g, 加入 10 mL 水溶解, 56 °C 水浴过夜, 65 °C 水浴 20 min, 4 000 r/min 离心 5 min, 取 1.5 mL 上清液; 液体制剂取 2 mL。按照天根植物基因组 DNA 提取试剂盒说明书, 从第 3 步开始提取 DNA, 缺茯苓阴性样品 DNA 提取方法同上, 置于 -20 °C 冰箱中保存。

### 2.3 LPCR 条件优化

2.3.1 退火温度 连接反应体系为模板 DNA 8.3 μL, 9°N DNA Ligase (40 U/μL) 0.5 μL, 10× 9°N DNA Ligase Buffer 1 μL, 10 μmol/L 左右探针各 0.1 μL, 加水至 10 μL。反应条件为 95 °C 变性 1 min, 50 °C 反应 30 min, 得连接产物。

PCR 反应体系为连接产物 5 μL, Taq HS DNA 聚合酶 0.1 μL, 10× buffer 2 μL, 50 mmol/L  $MgCl_2$  溶液 0.8 μL, dNTP 溶液 0.4 μL, 10 μmol/L 左探针 FLLP-T 0.8 μL, 10 μmol/L 反向引物 FL-RR 0.8 μL, 加水至 20 μL。PCR 反应程序为 95 °C 预变性 5 min, 95 °C 变性 10 s, 68~72 °C 退火延伸 30 s, 循环 40 次, 退火温度分别为 68、69、70、71、72 °C。再进行荧光检测, 测定 Ct 值。

2.3.2 引物浓度 PCR 反应体系引物的终浓度分别为 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0 μmol/L, 退火温度为 70 °C, 其余条件同“2.3.1”项。再测定 Ct 值。

2.3.3  $Mg^{2+}$  浓度 PCR 反应体系的  $MgCl_2$  终浓度分别为 1、1.5、2、2.5、3、3.5 μmol/L, 引物浓度为 0.4 μmol/L, 其余条件同“2.3.2”项。再测

定 Ct 值。

2.3.4 连接反应温度 连接反应温度分别为 45、50、55、60、65、70 °C，MgCl<sub>2</sub> 浓度为 2.5 μmol/L，其余条件同“2.3.3”项。再测定 Ct 值。

2.3.5 连接次数 在 30 min 内分别进行 1、5、10、20、30 次连接，反应温度为 45 °C，其余条件同“2.3.4”项。再测定 Ct 值。

2.3.6 探针浓度 左右探针终浓度分别为 0.05、0.1、0.15、0.2、0.25、0.3 μmol/L，在 30 min 内进行 30 次反应，其余条件同“2.3.5”项。再测定 Ct 值。

2.4 灵敏度考察 取检测模板 FLMB-2，以 10 倍稀释法进行稀释，直至拷贝数为 10 Copies/μL，按照优化后的反应体系和条件进行 LPCR 荧光检测。再测定 Ct 值，并对 PCR 产物进行 3% 琼脂糖凝胶电泳检测。

2.5 特异性考察 取茯苓、六味地黄制剂、藿香

正气制剂、参苓口服液、逍遥丸、保和丸及各制剂相应的缺茯苓阴性样品适量，按照优化后的反应体系和反应条件进行 LPCR 荧光检测。再测定 Ct 值。

2.6 样品检测 采用优化后的 LPCR 条件，对六味地黄制剂、藿香正气制剂、参苓口服液、逍遥丸、保和丸进行荧光检测。再测定 Ct 值，并对 PCR 产物进行 3% 琼脂糖凝胶电泳检测。

### 3 结果

#### 3.1 LPCR 条件优化

3.1.1 退火温度 由表 2 可知，退火温度为 68~72 °C 时均可扩增，根据最小 Ct 值确定为 70 °C。

表 2 退火温度考察结果

| 退火温度/°C | 68     | 69     | 70     | 71     | 72     |
|---------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Ct 值    | 18.059 | 18.090 | 16.793 | 18.301 | 17.449 |

3.1.2 引物浓度 由表 3 可知，引物浓度在 0.3~0.8 μmol/L 范围内均可扩增，根据最小 Ct 值确定为 0.4 μmol/L。

表 3 引物浓度考察结果

| 引物浓度/(μmol·L <sup>-1</sup> ) | 0.1 | 0.2 | 0.3    | 0.4    | 0.5    | 0.6    | 0.7    | 0.8    | 0.9 | 1.0 |
|------------------------------|-----|-----|--------|--------|--------|--------|--------|--------|-----|-----|
| Ct 值                         | —   | —   | 17.412 | 17.402 | 19.941 | 23.137 | 18.637 | 18.223 | —   | —   |

注：—表示无 Ct 值。

3.1.3 Mg<sup>2+</sup>浓度 由表 4 可知，Mg<sup>2+</sup>浓度在 1.0~3.5 μmol/L 范围内均可扩增，根据最小 Ct 值确定

为 2.5 μmol/L。

表 4 Mg<sup>2+</sup>浓度考察结果

| Mg <sup>2+</sup> 浓度/(μmol·L <sup>-1</sup> ) | 1.0    | 1.5    | 2.0    | 2.5    | 3.0    | 3.5    |
|---|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Ct 值  | 18.980 | 19.207 | 20.043 | 18.402 | 20.145 | 18.926 |

3.1.4 连接温度 由表 5 可知，连接温度在 45~70 °C 范围内均可扩增，根据最小 Ct 值确定为 45 °C。

表 5 连接温度考察结果

| 连接温度/°C | 45     | 50     | 55     | 60     | 65     | 70     |
|---------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Ct 值    | 28.191 | 29.012 | 29.301 | 28.777 | 29.629 | 28.996 |

3.1.5 连接次数 由表 6 可知，根据最小 Ct 值确定为 30 次。

表 6 连接次数考察结果

| 连接次数/次 | 1      | 5      | 10     | 20     | 30     |
|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Ct 值   | 28.699 | 28.488 | 27.848 | 27.418 | 26.777 |

3.1.6 探针浓度 由表 7 可知，探针浓度在 0.05~0.3 μmol/L 范围内均可扩增，根据最小 Ct 值确定为 0.1 μmol/L。

表 7 探针浓度考察结果

| 探针浓度/(μmol·L <sup>-1</sup> ) | 0.05   | 0.1    | 0.15   | 0.2    | 0.25   | 0.3    |
|------------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Ct 值                         | 26.566 | 26.152 | 27.754 | 28.043 | 27.277 | 27.988 |

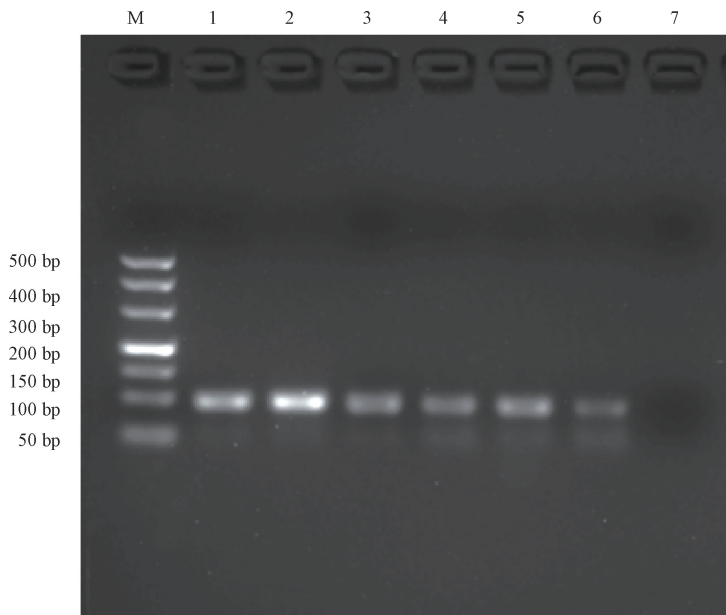
根据上述结果，得到最佳连接体系为 9° N DNA Ligase 0.5 μL，10×9° N buffer 1 μL，样品 DNA 8.3 μL，10 μmol/L 左探针 FLLP-T 0.1 μL，10 μmol/L 右探针 FLRP 0.1 μL，用 ddH<sub>2</sub>O 补足至 10 μL。连接反应条件为 95 °C 60 s，95 °C 10 s，45 °C 50 s，30 个循环。PCR 体系为连接产物 5 μL，Taq HS DNA 聚合酶 0.1 μL，10×buffer 2 μL，50 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 溶液 1.0 μL，dNTP 溶液

0.4 μL，10 μmol/L 左探针 FLLP-T 0.8 μL，10 μmol/L 反向引物 FL-RR 0.8 μL，用 ddH<sub>2</sub>O 补足至 20 μL。PCR 条件为 95 °C 5 min，95 °C 10 s，70 °C 30 s（收集荧光信号），40 个循环。

3.2 灵敏度考察 结果见表 8，电泳图见图 3，可知该方法灵敏度高，最低可检出 10 Copies/μL 样品 DNA。

表8 灵敏度考察结果

| 拷贝数/(Copies·μL <sup>-1</sup> ) | 10 <sup>6</sup> | 10 <sup>5</sup> | 10 <sup>4</sup> | 10 <sup>3</sup> | 10 <sup>2</sup> | 10 |
|--------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|----|
| Ct 值                           | 22.236          | 25.837          | 29.548          | 33.379          | 30.361          | -  |



注：M 为 GL500 DNA marker，1~6 分别为拷贝数 10<sup>6</sup>、10<sup>5</sup>、10<sup>4</sup>、10<sup>3</sup>、10<sup>2</sup>、10 Copies/μL，7 为空白（水）。

图3 灵敏度考察电泳图

3.3 特异性考察 由图4可知，茯苓及5种含茯苓制剂均可获得扩增曲线，而缺茯苓阴性样品、阴性对照模板、空白（水）均未获得，说明LPCR特异性良好，阴性无干扰。

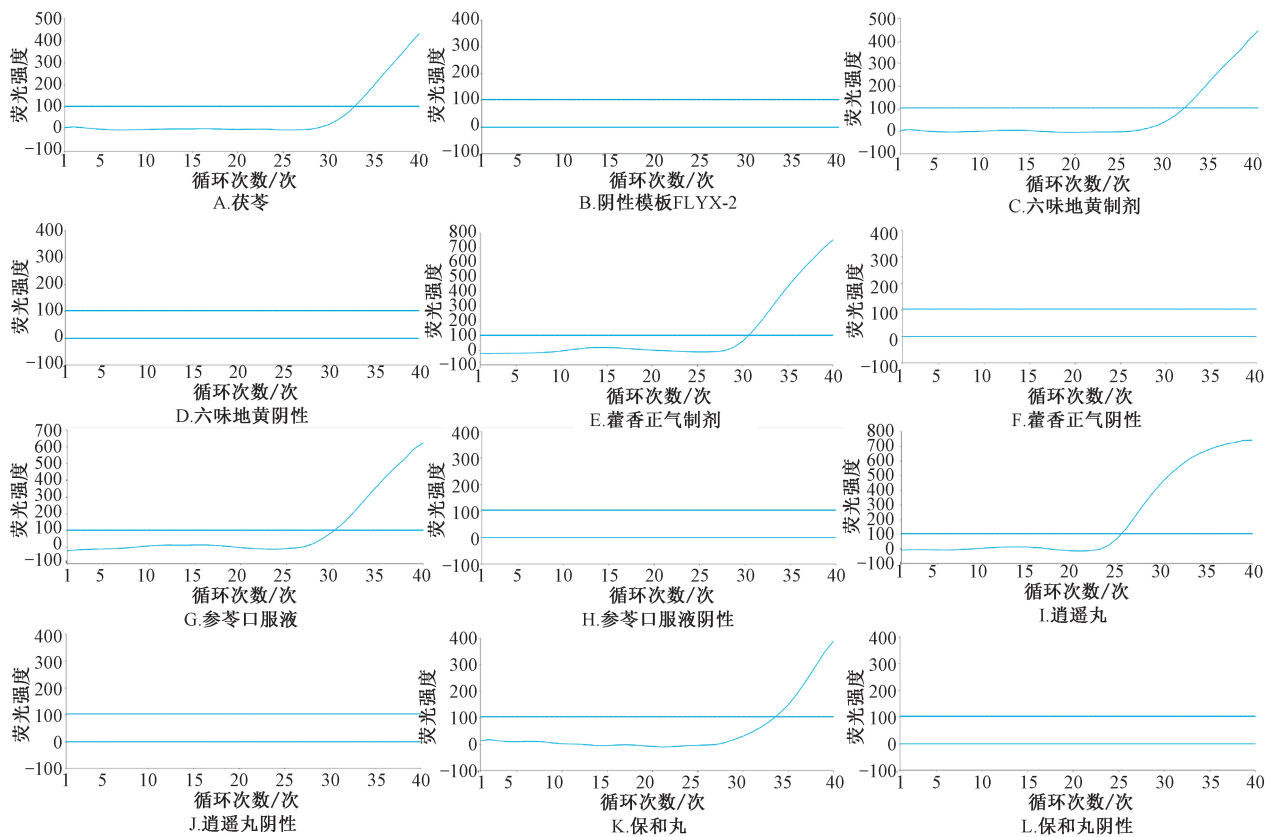
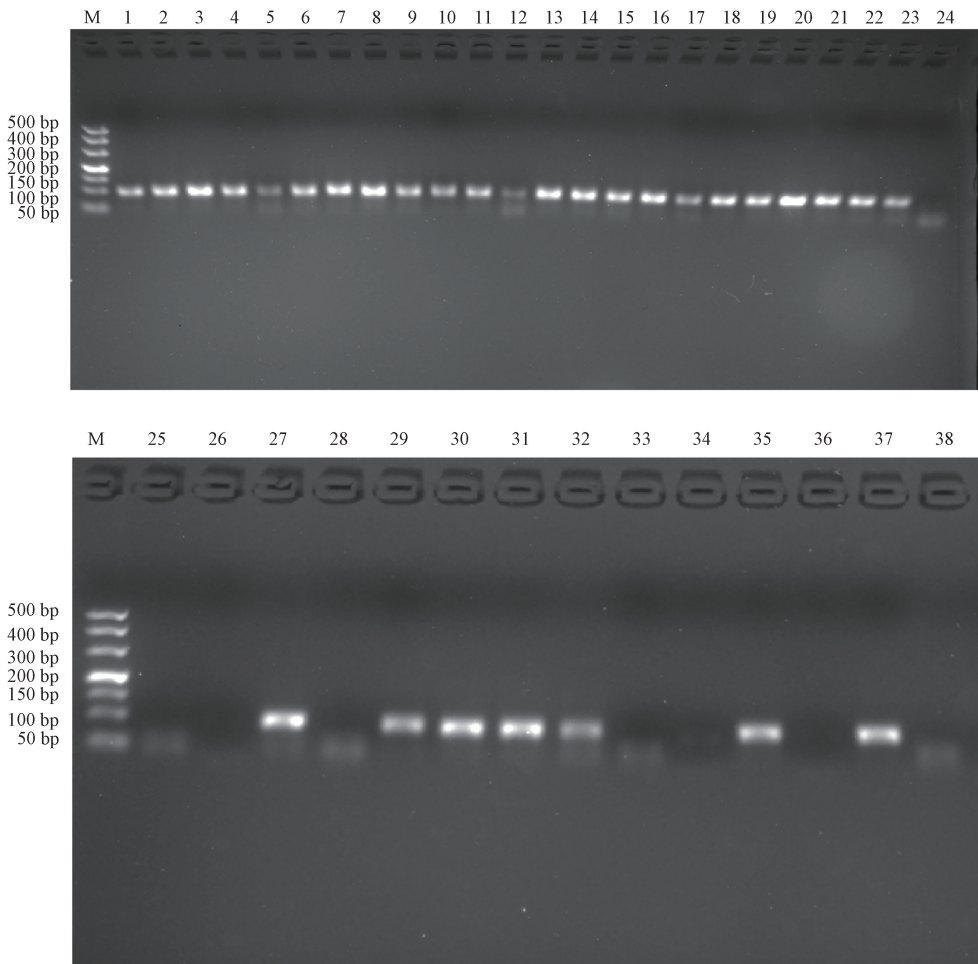


图4 特异性考察扩增曲线

3.4 样品考察 电泳图见图5, 结果见表9, 可知 丸、保和丸均检出茯苓 DNA。  
六味地黄制剂、藿香正气制剂、参苓口服液、逍遥



注: M 为 GL500 DNA marker, 1~11 为茯苓 (FL01~FL11), 12~23 为六味地黄制剂 (LW01~LW12), 24 为六味地黄阴性样品, 25 为猪苓, 26 为阴性对照模板, 27 为保和丸, 28 为保和丸阴性样品, 29~32 为藿香正气制剂 (HX01~HX04), 33 为藿香正气制剂阴性样品, 34 为空白 (水), 35 为参苓口服液, 36 为参苓口服液阴性样品, 37 为逍遥丸, 38 为逍遥丸阴性样品。

图5 各样品电泳检测图

表9 各样品 Ct 值测定结果

| 编号   | Ct 值   | 编号    | Ct 值   | 编号     | Ct 值   |
|------|--------|-------|--------|--------|--------|
| FL01 | 31.270 | LW-01 | —      | HX-01  | 31.559 |
| FL02 | 31.730 | LW-02 | 31.426 | HX-02  | 30.723 |
| FL03 | 30.059 | LW-03 | 32.246 | HX-03  | 29.754 |
| FL04 | 31.871 | LW-04 | 31.973 | HX-04  | —      |
| FL05 | —      | LW-05 | 29.371 | SL     | 30.348 |
| FL06 | 33.676 | LW-06 | 33.902 | XY     | 28.699 |
| FL07 | 29.965 | LW-07 | 30.613 | BH     | 25.465 |
| FL08 | 31.624 | LW-08 | 32.293 | LWYX   | —      |
| FL09 | 32.887 | LW-09 | 28.965 | HXYX   | —      |
| FL10 | 32.809 | LW-10 | 32.309 | SLYX   | —      |
| FL11 | 34.113 | LW-11 | 31.965 | XYXX   | —      |
| ZL   | —      | LW-12 | 34.566 | BHYX   | —      |
|      |        |       |        | FLYX-2 | —      |

注: —表示无 Ct 值。

## 4 讨论与结论

LPCR 将探针与靶 DNA 杂交, 所需靶 DNA 可短至 10 bp, 但其序列特异性较差, 许多物种可能也会存在。本实验所用茯苓靶 DNA 为 24 bp, BLAST 分析显示具有良好的特异性, 可有效区别于其他物种。另外, 由于检测所需的靶 DNA 很短, 特别适用于中药制剂等 DNA 严重降解样品的检测。

DNA 连接酶具有很强的特异性, 在 SNP 位点处只有完全互补才能将左右探针相连, 故基于 DNA 连接酶的 LPCR 法特异性良好, 基本无非特异性扩增的干扰。最佳 LPCR 分子鉴定方法建立后, 后续可采用琼脂糖凝胶电泳进行检测, 不再需要昂贵的荧光探针和荧光 PCR 仪, 有效降低了检测成本。本实验设计的左右探针相连后长度仅为 64 bp, 不利于电泳检测, 因此在设计反向引物时进行了延伸设计, 使其达到 103 bp, 与可能产生的引物二聚体分离, 有利于观察电泳条带。

本实验采用优化的 LPCR 检测条件对 5 种含茯苓中成药, 即六味地黄制剂 (丸、胶囊、滴丸、颗粒)、藿香正气制剂 (水、合剂、口服液、滴丸) 进行检测, 结果均可检出茯苓 DNA, 并且缺茯苓阴性样品无干扰, 说明其技术可有效检测出中成药中严重降解的 DNA 分子, 特异性良好。

LPCR 方法耐用性良好, 引物浓度在 0.3~0.8  $\mu\text{mol/L}$  范围内均可进行 PCR 扩增, 其他检测条件在考察的范围内也能进行有效检测, 并且不易导致非特异性扩增。在灵敏度考察时, 模板起始拷贝数在  $10^3 \sim 10^6$  Copies/ $\mu\text{L}$  范围内, 浓度越大, Ct 值越小, 而且相邻数值相差 3.3 左右, 基本符合 qPCR 扩增规律, 但拷贝数低于  $10^3$  Copies/ $\mu\text{L}$  后由于受连接效率的影响, 不再符合此规律; 拷贝数为 10 Copies/ $\mu\text{L}$  时可能由于起始拷贝数较少, 未得到荧光扩增曲线, 但电泳中仍可观察到微弱条带。同样, FL05、LW01、HX04 样品也未得到荧光扩增曲线和 Ct 值, 但电泳检测出微弱条带, 说明其灵敏度更高。

综上所述, 本研究建立的 LPCR 具有特异性强、灵敏度高、耐用性好、可检测短片段 (10~36 bp) 等优点, 可对遗传物质 DNA 进行检测, 具有良好的通用性, 同时除茯苓外, 地黄、阿胶等几十味中药均成功建立了该方法, 为中成药质量控制提供了全新的技术手段。但该方法是对遗传物质 DNA 进行检测, 故 LPCR 不足在于无法区分非药

用部分投料。

## 参考文献:

- [1] 周士琳, 张艳梅, 周 婷, 等. 分子鉴定技术在中成药组方药味鉴定中的应用研究进展[J]. 中国现代中药, 2025, 27(6): 1183-1189.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2020 年版四部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 490-492.
- [3] 姜雪萍, 陈艳君, 朱富成, 等. 百合药材的 DNA 条形码鉴定[J]. 园艺与种苗, 2019, 39(9): 1-3; 6.
- [4] 常晶茹, 姚莹航, 张雪薇, 等. 黄芪属植物 DNA 条形码与聚类分析的研究[J]. 中草药, 2022, 53(22): 7201-7206.
- [5] 王洪越, 王迎春, 江 丽, 等. 采用 DNA 条形码技术鉴别面膜粉中常用的药妆同源植物源性成分[J]. 日用化学工业, 2021, 51(6): 528-534.
- [6] 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: 38; 80.
- [7] 范耀耀, 谭斯尹, 宋 叶, 等. 蝉蜕配方颗粒的位点特异性 PCR 鉴别[J]. 中药材, 2024, 47(11): 2724-2729.
- [8] 段宝丽, 陈天韵, 施丹丹, 等. 全蝎分子鉴定及其配方颗粒的位点特异性 PCR 鉴别[J]. 中国中药杂志, 2024, 49(4): 942-950.
- [9] 胡 力, 陈梓媛, 赵玉洋, 等. 五倍子配方颗粒的位点特异性 PCR 鉴别[J]. 中国现代中药, 2023, 25(8): 1668-1675.
- [10] 张文娟, 魏 锋, 马双成. 中药 DNA 分子鉴定法标准研究有关问题探讨及建议[J]. 药物分析杂志, 2020, 40(12): 2250-2255.
- [11] 杨 健, 李 靖, 薛维娜, 等. 实时荧光定量 PCR 法鉴别川贝母掺伪[J]. 中成药, 2020, 42(5): 1262-1268.
- [12] 莫 静, 王文斌, 程华春, 等. 多重连接探针扩增技术鉴别半夏及其常见混伪品[J]. 医药导报, 2023, 42(3): 322-328.
- [13] 李小芳, 王文斌, 莫 静, 等. 多重连接探针扩增结合溶解曲线法鉴别南、北板蓝根掺杂[J]. 中成药, 2022, 44(4): 1204-1208.
- [14] 朱海兰. 基于 MLPA-HRM 法检测川贝母掺伪的研究[D]. 武汉: 湖北中医药大学, 2021.
- [15] 陈伟韬, 李养学, 江洁怡, 等. 地鳖的环介导等温扩增快速鉴别[J]. 药物分析杂志, 2024, 44(9): 1529-1534.
- [16] Yang L, Wu W R, Zhou H, et al. Rapid identification of *Dendrobium officinale* using loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method[J]. *Chin J Nat Med*, 2019, 17(5): 337-345.
- [17] 刘富艳, 袁 媛, 金 艳, 等. 多重 PCR 同时鉴别 5 种药用海马[J]. 中国中药杂志, 2018, 43(23): 4562-4568.
- [18] Lou Q, Xin T Y, Xu W J, et al. TaqMan probe-based quantitative real-time PCR to detect *Panax notoginseng* in traditional Chinese patent medicines[J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 828948.
- [19] 周朝东, 黄哲魁. 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.