

药用贝母属系统发育关系分析及多重实时荧光 PCR 检测方法的建立

刘艳艳¹, 张全芳^{1#}, 范阳阳¹, 谭晴晴¹, 姜欣欣¹, 汪冰², 葛付存³, 林永强², 步迅^{1*}, 张永清^{4*}

1. 山东农业科学院 生物技术研究中心 中药分子鉴定公共服务平台, 山东 济南 250100

2. 山东省食品药品检验研究院, 山东 济南 250101

3. 山东百味堂中药饮片有限公司, 山东 济南 250108

4. 山东中医药大学药学院 天然药物研究所, 山东 济南 250355

摘要: **目的** 探讨多重实时荧光 PCR 检测方法对川贝母及伪品鉴别的可行性。**方法** 通过对常见贝母属植物的 ITS、psbA-trnH、rbcL 和 matK 基因序列种间变异、遗传距离及系统发育关系分析, 选择进化速率快、种间变异大、种内变异小的基因作为靶基因, 设计川贝母及伪品贝母的特异性引物和 Taqman 探针, 建立一种多重实时荧光 PCR 检测方法。通过特异性、灵敏度及混合样本检测与测序方法比较进行方法评估。**结果** 贝母属 ITS 和 psbA-trnH 变异位点高于 rbcL 和 matK, 通过遗传距离分析 rbcL 和 matK 基因显著低于 ITS 和 psbA-trnH 基因, 以 ITS 作为靶基因, 建立多重实时荧光 PCR 检测方法特异性强, 灵敏度达 0.01 ng, 对 18 份样本抽查检出 4 份伪品贝母, 检测结果与构建的 NJ 树聚类分析结果完全一致。**结论** 基于 ITS 区域序列为靶基因建立多重实时荧光 PCR 检测方法能够成功鉴定川贝母及其混伪品, 为川贝母真伪鉴别提供依据。

关键词: ITS; psbA-trnH; rbcL; matK; 多重实时荧光 PCR; 川贝母; 混伪品

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)09-2172-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.09.024

Phylogenetic relationship analysis of common medicinal submetals and multiple real-time fluorescence PCR identification of *Fritillariae Cirrhosae Bulbus*

LIU Yan-yan¹, ZHANG Quan-fang¹, FAN Yang-yang¹, TAN Qing-qing¹, JIANG Xin-xin¹, WANG Bing², GE Fu-cun³, LIN Yong-qiang², BU Xun¹, ZHANG Yong-qing⁴

1. Bio-Tech Research Center, Key Laboratory of Life Science Application, Shandong Academy of Agricultural Sciences, Jinan 250100, China

2. Shandong Insistute for Food and Drug Control, Jinan 250101, China

3. Shandong BaiWeiTang Chinese Herbal Medicine Drinks Slice Co., Ltd., Jinan 250108, China

4. Insistute of Natural Medicine, School of Pharmacy, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China

Abstract: Objective To investigate the feasibility of multiple real-time PCR for the detection of *Fritillariae Cirrhosae Bulbus* and adulterants. **Methods** Based on the analysis of interspecies variation, genetic distance and phylogenetic relationship of ITS, psbA-trnH, rbcL and matK gene sequences, the genes with fast evolution rate, big interspecies variation and small intraspecies variation were selected as target genes. *Fritillariae Cirrhosae Bulbus* and adulterants specific primers and Taqman probes were designed to establish a multiplex real-time PCR assay. Methods were evaluated by comparison of specificity, sensitivity and mixed sample detection and sequencing. **Results** The ITS and psbA-trnH mutations were higher than rbcL and matK, and rbcL and matK were significantly lower than ITS and psbA-trnH genes by genetic distance analysis. And the sensitivity of the establish multiple real-time PCR using ITS as the target gene was 0.01 ng. Four samples of adulterants were detected in 18 samples, and the results were consistent with the results of NJ tree clustering analysis. **Conclusion** Based on the ITS region sequence as the target gene to establish multiple real-time fluorescence PCR detection method

收稿日期: 2018-12-09

基金项目: 山东省创新公共服务平台: 中药分子鉴定公共服务平台 (2018JGX111); 山东省农业科学院农业科技创新工程: 山东道地药材产业关键技术创新与应用 (CXGC2018D3); 山东省高等学校对接产业类协同创新中心: 中药质量控制与全产业链建设协同创新中心; 山东省重点研发计划: 30 种柴胡 SNP 指纹图谱芯片的开发及利用 (2018GSF11902)

作者简介: 刘艳艳 (1982—), 山东泰安人, 硕士, 研究方向为中药分子鉴定。Tel: 15866752039 E-mail: 0000liuyanyan@163.com

***通信作者** 步迅 (1964—), 上海人, 研究员, 研究方向为分子生物学。Tel: (0531)66655033 E-mail: sherry6423@126.com

张永清 (1962—), 山东省平邑人, 教授, 博士生导师, 研究方向为中药资源、中药栽培、中药质量控制。E-mail: zyk622003@126.com
#并列第一作者 张全芳 (1978—), 甘肃酒泉人, 博士, 助理研究员, 研究方向为植物分子生物学。Tel: (0531)66655033 E-mail: zhquanfang@163.com

can successfully identify *Fritillariae Cirrhosae Bulbus* and its counterfeit goods, which provides a new basis for the authenticity of identification.

Key words: ITS; psbA-trnH; rbcL; matK; multiple real-time fluorescent PCR; *Fritillariae Cirrhosae Bulbus*; adulterants

百合科 (Liliaceae) 中的贝母属 *Fritillaria* L. 是中药贝母的主要来源, 此属植物全世界约有 130 种^[1], 国产贝母属的种名达到 80 个, 变种名称 52 个, 变型名称 6 个, 综合研究整理, 将中药贝母划分为 6 个类型: 浙贝母 *F. thunbergii* Miq.、川贝母 *F. cirrhosa* L.、伊犁贝母 *F. pallidiflora* Schrenk、湖北贝母 *F. hupehensis* Hsiao、平贝母 *F. ussuriensis* Maxim 和安徽贝母 *F. anhuiensis* S. C. Chen et S. F. Yin^[2]。川贝母是中药贝母中药用价值最高的类群, 为川贝母 *F. cirrhosa* D. Don、暗紫贝母 *F. unibracteata* Hsiao、甘肃贝母 *F. przewalskii* Maxim.、梭砂贝母 *F. delavayi* Maxim.、太白贝母 *F. taipaiensis* Maxim. 及瓦布贝母 *F. wabuensis* Maxim. 的干燥鳞茎^[3]。按药材性状不同分别习称“川贝”“青贝”和“炉贝”^[4]。川贝母具有清热润肺、止咳化痰、散结、降压解痉等功效, 药用价值极高^[5]。随着需求量的增加, 川贝母的混伪品频繁出现, 其中伊犁贝母、新疆贝母、平贝母、轮叶贝母等作为川贝母的混伪品频繁出现, 甚至葫芦科有毒植物土贝母 *Bolbostemma paniculatum* (Maxim.) Franquet 的鳞茎也被发现冒充川贝母出售^[6]。药材质量极不稳定, 直接影响到川贝母的用药安全。因此进行川贝母药材更深入的鉴定研究对于保证川贝母药材的质量及用药安全具有重要意义。

DNA 条形码 (DNA barcoding) 由加拿大动物学家 Hebert 等^[7]首次提出, 具有不受个体形态限制、不受个体发育阶段影响、从基因水平上客观区分物种、操作方法相对简便等特点, 是目前国内外最主要的分子检测技术^[8-10]。近年来, ITS、ITS2、psbA-trnH、rbcL、matK、rbcL + matK 这几个候选序列或序列组合由于通用性较好, 扩增成功率、有效序列获得率和物种鉴定成功率较高, 是植物条形码研究中重点推荐的候选序列^[11-14]。俞超等^[15]、徐传林等^[16]通过 ITS1 和 ITS2 DNA 条形码序列来鉴别贝母属, DNA 测序技术虽然是检测方法的金标准, 但操作步骤复杂, 仪器配套成本高, 局限性大, 聚合酶链式反应酶切琼脂糖凝胶电泳 (PCR-RFLP) 法开管操作, 需要通过酶切跑琼脂糖凝胶电泳来判读结

果, 正品与伪品混合在一起则难以区分。本研究旨在通过对常见贝母属的 ITS、psbA-trnH、rbcL 和 matK 基因序列种间变异及系统发育关系分析, 选择进化速率快、长度适中稳定、种间变异大、种内变异小的基因作为靶基因, 设计川贝母及伪品贝母的特异性引物和 Taqman 探针, 建立一种多重实时荧光 PCR 快速检测方法, 为药用贝母的快速准确鉴定及开发利用提供科学依据。

1 材料与仪器

1.1 材料

对照药材 (批号 121000-201108) 购自中国食品药品检定研究院, 经笔者鉴定为川贝母 *F. cirrhosa* L., 其余 18 份待检样本 (编号为 B1~15、C1~3) 分别由山东省食品药品检验研究院及四川千方中药饮片有限公司提供, 样本类型均为干燥鳞茎, 室温干燥环境下保存。为了更准确地评价贝母属 ITS、psbA-trnH、rbcL 及 matK 4 个基因的鉴定能力, 在 GenBank 数据库中下载平贝母、东贝母、伊贝母 (新疆贝母)、浙贝母、湖北贝母、暗紫贝母、梭砂贝母、太白贝母、川贝母、甘肃贝母、轮叶贝母、瓦布贝母、及土贝母等 18 种常见贝母属的 4 种基因的序列, 其序列信息见表 1。

1.2 试剂与仪器

植物 DNA 提取试剂盒, DNA 分子量 MakerDL2000、电泳上样缓冲液等 PCR 反应试剂购自宝生物工程 (大连) 有限公司; 引物与探针由生工生物工程 (上海) 有限公司负责合成; 2×TaqMan Master Mix 为 DBI Bioscience 品牌; DNA 测序由山东省农业科学院生物技术研究中心测序中心完成; ABI 7500 荧光定量 PCR 仪为 ABI 公司产品; Takara PCR 仪为宝生物工程 (大连) 有限公司产品; 5424 D 型高速离心机为 Eppendorf 公司产品; 凝胶成像仪为 Bio-Rad 公司产品。

2 方法

2.1 数据分析

采用 DNASTar 软件包中 SeqMan 程序对 DNA 测序结果校对拼接, 去除低质量峰区序列; 使用 MEGA 7.0 计算贝母属种内序列变异和种间序列变异, 采用相似性搜索法 (BLAST1) 和最小距离法 (nearest distance)^[17]考察贝母属的 4 个基因序列

的鉴定成功率, 构建 neighbor-joining (NJ) 进化树评估 4 个基因在各物种之间的亲源性。

2.2 DNA 提取、PCR 扩增及测序

称取烘干的鳞茎样品 80~100 mg, 直接研磨成粉末。使用天根生化科技(北京)有限公司的植物基因组 DNA 提取试剂盒提取总 DNA。PCR 扩增体系 25 μ L 体系, 体系内包含: 2 $\times$ Taq

mastermix 12.5 μ L、DNA 模板 2 μ L、正反向引物 10 μ mol/L 各取 1 μ L, ddH₂O 8.5 μ L。引物序列见表 2。扩增程序: 94 $^{\circ}$ C 变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 54 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s (进行 40 个循环); 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。选择 PCR 扩增成功的样品, 切胶纯化后测序, 由山东省农科院生物技术研究中心测序中心完成。

表 1 贝母种类、凭证信息和 GenBank 登录号

Table 1 Voucher information and GenBank accession numbers of *Fritillaria* species used in this study

编号	中文名	拉丁名	GenBank 号			
			ITS	psbA-trnH	rbcL	matK
1	暗紫贝母	<i>F. unibracteata</i>	KT861542.1	GQ434876.1	KP711923.1	KF906225.1
2	平贝母	<i>F. ussuriensis</i>	DQ191622.1	—	JN417432.1	JN417343.1
3	大金贝母	<i>F. dajinensis</i>	GQ205114.1	—	—	GQ205133.1
4	梭砂贝母	<i>F. delavayi</i>	KP711999.1	—	KP711916.1	KP711865.1
5	甘肃贝母	<i>F. przewalskii</i>	GQ205115.1	—	—	KF906227.1
6	湖北贝母	<i>F. hupehensis</i>	KF906199.1	—	—	KF906220.1
7	轮叶贝母	<i>F. maximoviczii</i>	HM045471.1	—	KP711917.1	AY624444.1
8	新疆贝母	<i>F. walujewii</i>	KP712008.1	KJ956409.1	LM993018.1	LM993133.1
9	瓦布贝母	<i>F. wabuensis</i>	GQ205131.1	—	—	GQ205147.1
10	黑百合	<i>F. camtschatcensis</i>	AY616714.1	—	LM992925.1	AY624431.1
11	川贝母	<i>F. cirrhosa</i>	KP711998.1	HQ662561.1	KM085476.1	KM085602.1
12	厚叶贝母	<i>F. crassifolia</i>	AY616717.1	—	LM992988.1	LM993105.1
13	滩贝母	<i>F. karelini</i>	AY616727.1	—	LM992957.1	LM993082.1
14	阿尔泰贝母	<i>F. meleagris</i>	AY616730.1	—	AY395537.1	KM085608.1
15	伊犁贝母	<i>F. pallidiflora</i>	KC801072.1	KJ956421.1	LM992984.1	AY624450.1
16	太白贝母	<i>F. taipaiensis</i>	HM045470.1	—	KP711919.1	KP711868.1
17	浙贝母	<i>F. thunbergii</i>	KT030247.1	KF850862.1	KP711920.1	JQ724626.1
18	土贝母	<i>Bolbostemma paniculatum</i>	FJ980305.1	GQ162966.1	GQ436397.1	DQ469139.1

表 2 引物及序列

Table 2 Primer and sequences

序列	引物名称	序列 (5'→3')	退火温度/ $^{\circ}$ C	参考文献
ITS	ITS-Leuf	GTCCACTGAACCTTATCATTTAG	52	15
	ITS4r	TCCTCCGCTTATTGATATGC		
rbcL	rbcL F	ATGTCACCACAAACAGAAAC	50	16
	rbcL R	TCGCATGTACCTGCAGTAGC		
psbA-trnH	psbA-rtnHF	GTTATGCATGAACGTAATGCTC	53	17
	psbA-rtnHR	CGCGCATGGTGGATTACAAATC		
matK	matK F	CGATCTATTCAATCAATATTC	50	16
	matK R	TCTAGCACACGAAAGTCGAAGT		

2.3 川贝母特异引物及 TaqMan 探针的设计及外源性内标重组质粒构建

通过对贝母属序列分析比较, 选择最优 DNA 条形码作为靶基因, 设计贝母通用引物及通用探针、川贝母特异探针及平贝母、新疆贝母、伊犁贝母、轮叶贝母等伪品贝母的特异探针(表 3)。使用随机序列 DNA 生成工具 DNAux 3.0 产生一段 DNA 序列, 在 NCBI 中 BLAST 无与之同源的 DNA 片段, 在这段随机 DNA 序列上下游分别连

接上贝母属的通用引物序列(上游为原序列, 下游为反向互补序列), 从而形成 106 bp 的阳性扩增内标 DNA 序列, 将这段扩增内标序列委托人工基因合成, 合成片段连接到 PMD18-T 载体上, 转化感受态 DH5-a, 质粒提取, 利用 ABI3730XL 测序仪对重组质粒进行测序验证, 结果与目的片段一致。采用 4 种不同发光基团如 FAM、JOE、ROX、CY5 对各个探针的 5'端进行荧光素修饰, 3'端的淬灭基团用 Dabcyl 或 BHQ1 或 BHQ2 修饰。

表 3 引物与探针序列
Table 3 Primers and probe sequences

引物名称	引物与探针序列 (5'→3')	片段/bp
特异上游引物	GCAGAATCCCGTGAACCATC	219
特异下游引物	TCCGTCCACCACTCGTCG	
川贝母特异探针 (P)	FAM: CCAATGACCCTTCGGGTGCG-BHQ1	106
伪品川贝母特异探针 (WP)	ROX: ACTGGCCCTCCGTGCCTCGT-BHQ2	
贝母属通用探针 (UP)	JOE: CTCGTGTGCGGCGGGCTT-BHQ2	
外源质控探针 (IMP)	CY5: AAGTACGCTCCATTGGTGACCTCA-BHQ2	
外源性内标序列	GCAGAATCCCGTGAACCATAATACAGCACGCCGTAAGCTTAACC-	

2.4 多重荧光 PCR 检测方法的建立

通过对单一荧光定量 PCR 反应体系中的 Taq 酶用量、引物浓度、探针浓度和退火温度的优化,建立川贝母、伪品贝母的单重荧光定量 PCR 方法。其中上下游引物以 1.0、2.0、5.0、10.0 μmol/L 为浓度梯度,探针浓度在 1.0~5.0 μmol/L,以 1.0 μmol/L 浓度梯度递增,每个浓度梯度做 5 个平行样品,使用 ABI7500 定量 PCR 仪器,PCR 反应条件:95 ℃、2 min 预变性;95 ℃、10 s,56 ℃、35 s (收集荧光信号),40 个循环。在体系中引物和探针浓度优化后将退火温度设置为 56~66 ℃,以 2 ℃为 1 个梯度,共 6 个退火温度进行实时荧光定量 PCR 扩增,同一模板做 5 个平行样品 3 次重复实验,对扩增所得数据进行分析,除了以产生 C_t 值最小、荧光信号强度最高、 C_t 值标准偏差最小综合指数最高为依据外,还要考虑既保证扩增效率的同时又要确保探针的特异性等条件,最终确立最佳的退火温度。

在单一荧光 PCR 建立的最优体系和确保实验特异性及稳定性的基础上,在同一反应体系中加入贝母通用引物、通用探针、川贝母特异探针、伪品贝母探针和内标质控探针,并根据阈值 (即 C_t 值) 和荧光增量,对各引物、探针浓度及循环参数进行调整优化,确定多重实时荧光 PCR 检测体系和方法。

2.5 多重实时荧光 PCR 方法评估

分别从暗紫贝母、梭砂贝母、甘肃贝母、川贝母、瓦布贝母、平贝母、新疆贝母、伊犁贝母、湖北贝母、轮叶贝母、浙贝母、土贝母、麦冬、百合、薏米仁、山慈姑、人参、黄精等植物中提取基因组 DNA 为模板,按照上述优化的反应体系和反应条件进行荧光定量 PCR,检测引物和

探针的特异性。

2.6 DNA 灵敏度评估

将川贝母、伊贝母的基因组适当稀释,测定并记录其在 260 nm 和 280 nm 的紫外光吸光度 (A) 值,即 A_{260} 和 A_{280} 值,用 A_{260}/A_{280} 来计算 DNA 的纯度,当纯度在 1.8~2.0 说明样品 DNA 质量满足实验要求,将 DNA 定量到 5~10 ng/μL 后 5 倍逐级稀释作为标准品。每个反应加量为 2 μL,各浓度梯度样品均设置 6 平行,使用优化好的多重实时荧光 PCR 体系及条件进行扩增,评价 DNA 灵敏度。

2.7 混合样本检测评估

在川贝母中分别掺入 1%、5%、10%、25%、50% 的伊贝母,对上述样品充分混匀,提取基因组 DNA, DNA 质量浓度在 10~50 ng/μL,进行多重实时荧光 PCR 检测,每个样品设 3 个平行,每个样品重复 3 次,每次实验的结果一致才能确定该方法的掺假检出限,通过 5 次实验,分析同一个样本的方差来评价多重荧光定量 PCR 方法。

2.8 实际样本检测

利用建立的多重实时荧光 PCR 检测方法对 18 份未知样品进行源性成分检测,与测序方法对比以验证方法的准确性、可行性。

3 结果与分析

3.1 贝母属中药材 ITS、psbA-trnH、rbcL 及 matK 序列遗传变异分析

18 份样本 ITS、psbA-trnH、rbcL 及 matK 4 个基因的 PCR 产物经正、反 2 个方向引物测序,所获得的序列与 Gnebank 数据库中下载的序列利用 MEGA 7.0 软件分析。分析结果 (表 4) 表明,ITS 区序列 GC 平均含量约 64.4%,高于其他 3 个基因,psbA 基因 GC 平均含量最低 31.8%,序列中含有连续 polyA (T) 结构这对测序结果造成一定

表 4 ITS、psbA-trnH、rbcL 及 matK 序列信息

Table 4 ITS, psbA-trnH, rbcL, and matK sequence information

基因	片段大小/bp	GC 量/%	保守位点	变异位点	信息位点	转换/颠换	鉴定效率/%	K2P 距离
ITS	658	64.4	332	305	69	2.34	100.00	0.127 609
mat K	1 279	40.2	1 205	56	48	1.22	44.50	0.199 253
rbcL	1 167	43.5	1 066	32	17	3.87	26.25	0.006 299
psbA	451	31.8	163	263	196	0.94	100.00	0.436 131

影响,降低其成功率。psbA-trnH 基因变异位点为 263, ITS 变异位点为 305, rbcL 和 matK 基因变异位点仅为 32 和 56。理想的条形码序列种间差异明显大于种内差异。通过对贝母属各条形码候选序列的种内变异、种间变异、种间最小变异和种内最大变异分析,结果表明 psbA 序列种间差异最大, ITS 次之, rbcL 和 matK 最小。种内差异情况同样是 psbA 序列差异最大, ITS 种内差异较小, rbcL 和 matK 最小。在物种水平上通过 BLAST1 分析, ITS、psbA-trnH 鉴定效率均为 100%, 而 rbcL 和 matK 均不足 50%。因此综合分析 ITS 区作为贝母属最理想的 DNA 条形码, 基于对比 NJ 树(图 1)聚类分析结果认为 ITS 在其物种鉴定及聚类分析效果上具有简单、准确、高效的特点, 在大量样本的物种鉴定中, 具有一定的优势。

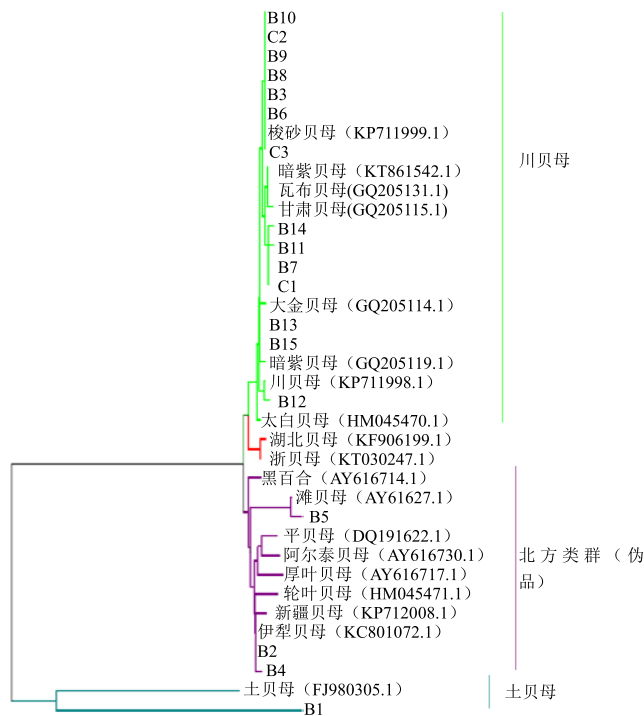


图 1 基于 ITS 序列构建的贝母属及近缘物种 NJ 树

Fig. 1 NJ tree based on ITS sequences from *Fritillaria* and its closely related species

3.2 多重荧光 PCR 检测方法的建立

提取的基因组 DNA 经紫外分光光度计测定其纯度和浓度, 测定 A_{260}/A_{280} 值均在 1.8~2.0, 质量浓度在 10 ng/μL 以上, 说明 DNA 纯度较高, 浓度适中, 符合 PCR 扩增要求。通过对引物浓度和探针浓度优化, 确定最佳引物混合物终浓度为 5.0 μmol/L, 总反应体系为 20 μL, 包括 2×TaqManMaster Mix 10.0 μL, 引物(正向和反向, 10.0 μmol/L) 1.0 μL, 探针混合物(5.0 μmol/L) 1.0~2.0 μL, DNA Template (1~20 ng/μL) 2.0 μL, ddH₂O 6.0 μL (表 5)。PCR 最佳反应条件: 95 °C、2 min; 95 °C、10 s; 58 °C、35 s; 40 个循环, 在此收集信号。待测样本检测结果判定: 在同时进行的空白、阳性对照实验结果正常的情况下, 被检测样品应有相应荧光信号检出, 且相应荧光通道出现明显的扩增曲线, C_t 值≤35, 说明 DNA 提取是有效的。

3.3 多重荧光 PCR 特异性实验

按照“2.4”项方法针对川贝母和伪品贝母的引物和特异性探针进行特异性验证, 当 FAM、JOE、CY5 荧光修饰探针有扩增曲线时, 且满足 C_t 值≤35 说明待检样本检出川贝母源性成分(图 2); 当 ROX、

表 5 PCR 反应体系

Table 5 PCR reaction system

试剂名称	工作浓度	用量/μL	终量
TaqMan Master Mix	2×	10	1×
引物 F/R	10 μmol·L ⁻¹	1	0.50 μmol·L ⁻¹
P	5 μmol·L ⁻¹	1	0.25 μmol·L ⁻¹
WP	5 μmol·L ⁻¹	1	0.25 μmol·L ⁻¹
UP	5 μmol·L ⁻¹	2	0.50 μmol·L ⁻¹
IMP	5 μmol·L ⁻¹	1	0.25 μmol·L ⁻¹
外源性内标质粒	10 copys	1	10 copys
DNA 模板	20 ng·μL ⁻¹	2	20 ng
ddH ₂ O		20	

JOE、CY5 荧光修饰探针有扩增曲线时，且满足 C_t 值 ≤ 35 说明待检样本检出伪品贝母源性成分（图 3）；当只有 CY5 荧光修饰探针有扩增曲线时，且满足 C_t 值 ≤ 35 说明待检样本中不含有贝母类源性成分（图 4）。通过表 6 可以进一步验证，川贝母和伪品贝母的引物与探针具有很好的物种特异性。

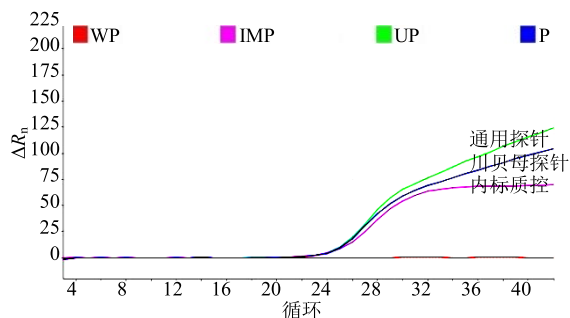


图 2 川贝母探针 P 特异性扩增曲线

Fig. 2 Specific amplification curve of *Fritillaria* probe P

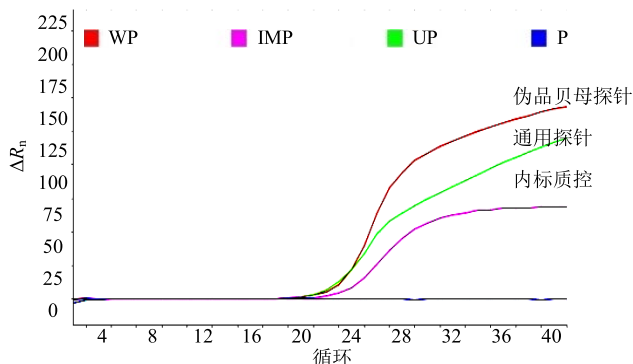


图 3 伪品贝母探针 WP 特异性扩增曲线

Fig. 3 Specific amplification curve of fake *Fritillaria* probe WP

表 6 川贝母、伪品贝母引物及探针特异性实验 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 6 Primers and probe specificity test of *Fritillariae Cirrhosae Bulbus* and adulterants ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

物种	C_t 值				结果判定
	川贝母特异 (FAM)	伪品川贝母特异 (ROX)	贝母属通用 (JOE)	外源质控 (CY5)	
暗紫贝母	21.95 ± 0.12	阴性	19.71 ± 0.05	20.94 ± 0.51	川贝母
梭砂贝母	25.19 ± 0.14	阴性	22.41 ± 0.15	20.05 ± 0.18	川贝母
甘肃贝母	25.96 ± 0.44	阴性	23.61 ± 0.36	20.18 ± 0.46	川贝母
瓦布贝母	22.27 ± 0.06	阴性	19.66 ± 0.36	20.90 ± 0.50	川贝母
平贝母	阴性	29.41 ± 0.26	19.97 ± 0.05	20.94 ± 0.58	伪品贝母
新疆贝母	阴性	18.62 ± 0.05	18.52 ± 0.49	20.01 ± 0.09	伪品贝母
伊贝母	阴性	19.22 ± 0.24	19.36 ± 0.09	20.60 ± 0.22	伪品贝母
轮叶贝母	阴性	21.22 ± 0.31	21.58 ± 0.17	20.19 ± 0.46	伪品贝母
湖北贝母	阴性	20.50 ± 0.23	20.58 ± 0.07	19.09 ± 0.12	伪品贝母
浙贝母	阴性	阴性	21.58 ± 0.17	20.19 ± 0.46	贝母属
土贝母	阴性	阴性	阴性	18.25 ± 0.27	阴性
人参	阴性	阴性	阴性	18.72 ± 0.55	阴性
百合	阴性	阴性	阴性	19.19 ± 0.42	阴性
麦冬	阴性	阴性	阴性	18.17 ± 0.37	阴性
薏米仁	阴性	阴性	阴性	20.69 ± 0.06	阴性
山慈姑	阴性	阴性	阴性	21.19 ± 0.55	阴性
黄精	阴性	阴性	阴性	19.32 ± 0.36	阴性

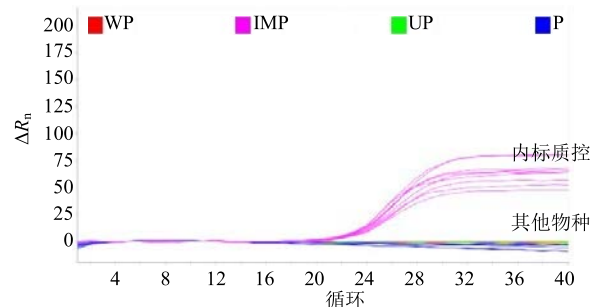


图 4 非贝母属物种扩增曲线

Fig. 4 Other non-*Fritillaria* species amplification curve

3.4 多重实时荧光 PCR 灵敏度及扩增效率分析

对川贝母和伊犁贝母的不同质量浓度梯度扩增 C_t 值统计见表 7，根据数据分析显示本方法的 DNA 灵敏度设定为 0.01 ng。在检出限范围内，所建立的多重实时 PCR 检测方法具有良好的重复性，PCR 扩增效率为 99.726%、102.77%，可见多重实时荧光 PCR 对扩增效率没有造成影响。

3.5 混合样检测结果分析

在川贝母中分别掺入 1%、5%、10%、25%、50% 的伊贝母，对上述样品充分混匀，提取基因组 DNA，进行多重实时荧光 PCR 检测，评估本研究的掺假检出限。分析结果显示，川贝母中掺入 1% 的伊贝母，也可以被检出。结果见表 8 和图 5。

3.6 样品检测

采用优化后的多重实时荧光 PCR 方法对山东省食品药品研究院及四川千方中药饮片有限公司提供的 18 份贝母样品进行检测，检测结果见表 9，

表 7 不同质量浓度 DNA 实时荧光 PCR 检测结果

Table 7 Detection results of different concentrations of DNA real-time fluorescent PCR

质量浓度/(ng·μL ⁻¹)	川贝母		质量浓度/(ng·μL ⁻¹)	伊犁贝母	
	C _t 值平均值	方差		平均值	方差
6.420 000	22.61	0.37	6.893 333	22.54	0.34
1.284 000	24.65	0.54	1.378 667	24.74	0.29
0.256 800	26.63	0.51	0.275 733	26.75	0.44
0.051 360	28.64	0.57	0.055 147	28.73	0.62
0.010 272	30.12	0.79	0.011 029	30.93	0.81
0.005 136	34.30	1.17	0.005 515	39.93	1.58
0.002 568	40.50	0.19	0.002 757	40.00	0.00

表 8 混合样本实时荧光 PCR 检测结果 ($\bar{x} \pm s, n=3$)Table 8 Mixed sample real-time fluorescent PCR detection results ($\bar{x} \pm s, n=3$)

样本混合比例	C _t 值				结果判定
	FAM	ROX	JOE	CY5	
100%川贝	21.74±0.05	阴性	19.70±0.02	22.40±0.04	只检出川贝母源性成分
川贝中掺入 1%的伊犁贝母	22.87±0.12	28.11±0.08	19.90±0.25	19.20±0.06	检出川贝母和伪品贝母源性成分
川贝中掺入 5%的伊犁贝母	23.11±0.32	25.21±0.14	20.50±0.44	22.80±0.02	检出川贝母和伪品贝母源性成分
川贝中掺入 10%的伊犁贝母	22.63±0.73	21.98±0.42	19.60±0.11	20.30±0.55	检出川贝母和伪品贝母源性成分
川贝中掺入 25%的伊犁贝母	22.74±0.36	20.43±0.12	19.00±0.07	19.80±0.02	检出川贝母和伪品贝母源性成分
川贝中掺入 50%的伊犁贝母	23.15±0.22	20.19±0.28	18.30±0.39	21.50±0.42	检出川贝母和伪品贝母源性成分
100%伊贝母	阴性	20.37±0.42	19.10±0.06	22.50±0.36	只检出伪品贝母源性成分

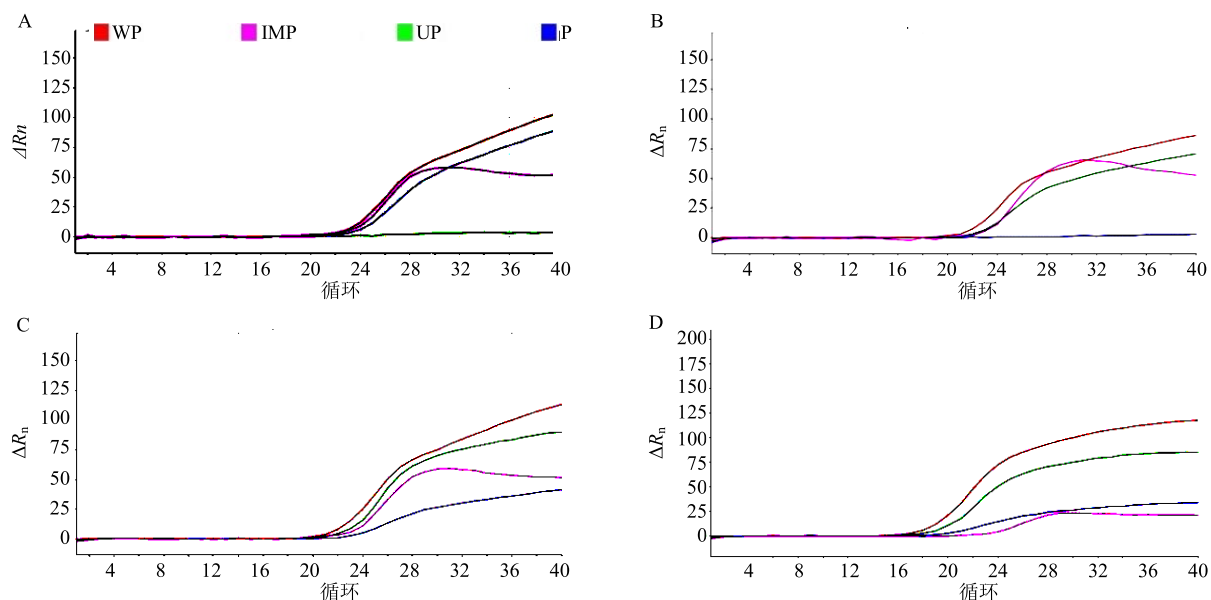


图 5 川贝母扩增曲线 (A)、伪品贝母扩增曲线 (B)、川贝母掺入 25%伊犁贝母扩增曲线 (C)、川贝母掺入 50%伊犁贝母扩增曲线 (D)

Fig. 5 Amplification curve of *F. cirrhosa* (A), adulterants (B), *F. cirrhosa* incorporation 25% *F. pallidiflora* amplification curve (C), *F. cirrhosa* incorporation 50% *F. pallidiflora* (D)

表 9 实际样本测试 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Table 9 Actual sample test ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

样品名称	来源	C _t 值				结果判定
		P	WP	JOE	CY5	
B1	山东省食品药品检验研究院	阴性	29.41±0.06	28.87±0.07	21.31±0.5	伪品贝母
B2	山东省食品药品检验研究院	阴性	17.67±0.80	20.86±0.61	20.43±0.58	伪品贝母
B3	山东省食品药品检验研究院	25.45±0.41	阴性	28.18±0.11	20.31±0.18	川贝母
B4	山东省食品药品检验研究院	阴性	16.59±0.74	20.97±0.82	21.08±0.46	伪品贝母
B5	山东省食品药品检验研究院	阴性	17.16±0.96	21.06±0.04	20.45±0.46	伪品贝母
B6	山东省食品药品检验研究院	24.57±0.32	阴性	26.84±0.37	20.59±0.50	川贝母
B7	山东省食品药品检验研究院	20.31±0.41	阴性	24.08±0.96	19.59±0.58	川贝母
B8	山东省食品药品检验研究院	25.95±0.08	阴性	21.55±0.37	20.04±0.18	川贝母
B9	山东省食品药品检验研究院	23.37±0.61	阴性	23.16±0.60	19.54±0.46	川贝母
B10	山东省食品药品检验研究院	22.87±0.80	阴性	24.78±0.34	20.32±0.43	川贝母
B11	山东省食品药品检验研究院	23.43±0.62	阴性	25.66±0.81	19.84±0.22	川贝母
B12	山东省食品药品检验研究院	19.36±0.01	阴性	21.96±0.08	19.52±0.37	川贝母
B13	山东省食品药品检验研究院	17.06±0.45	阴性	22.27±0.04	20.16±0.06	川贝母
B14	山东省食品药品检验研究院	17.79±0.88	阴性	20.52±0.86	19.69±0.46	川贝母
B15	山东省食品药品检验研究院	19.10±0.43	阴性	21.84±0.76	20.19±0.09	川贝母
C1	四川千方中药饮片有限公司	19.35±0.61	阴性	21.77±0.45	19.52±0.22	川贝母
C2	四川千方中药饮片有限公司	16.95±0.34	阴性	20.13±0.12	20.06±0.55	川贝母
C3	四川千方中药饮片有限公司	22.03±0.96	阴性	22.88±0.28	19.74±0.06	川贝母

其中有 4 份检测出伪品贝母的源性成分, 其余 14 份均为川贝母, 其鉴定结果与所测序列构建 NJ 树聚类分析结果 (图 1) 完全一致。

4 讨论

《中国药典》2015 年版共收载贝母类药材 6 种, 分别为土贝母、川贝母、平贝母、伊贝母、浙贝母、湖北贝母。除属于葫芦科的土贝母外其他均属于百合科。川贝母收载 6 种基原植物, 即川贝母、暗紫贝母、甘肃贝母、梭砂贝母、太白贝母或瓦布贝母的干燥鳞茎。本研究通过对 ITS、psbA-trnH、rbcL 及 matK 序列遗传变异分析发现: 贝母属 ITS 变异位点比例占 46.35%, psbA-trnH 基因变异位点占 58.31%, rbcL 基因和 matK 基因相对保守仅占 3.0%和 4.65%。ITS、psbA-trnH、rbcL 及 matK 基因 K2P 遗传距离分别为 0.127 0、0.436 0、0.006 3、0.199 0。可见 rbcL 和 matK 种间差异基因显著低于 psbA-trnH 和 ITS 基因。由于 psbA-trnH 基因 GC 含量低, 存在 polyA 或 PolyT 结构鉴定效率明显低于 ITS 区域序列。

通过系统发育树对 18 个品种的贝母属植物 ITS 基因序列进行聚类分析, 构建 NJ 系统发育树发现物种的聚类情况分析准确度高, 能在一定程度上准确区分川贝母类群、浙贝母类群、北方高纬度地区贝母类群 (伊犁贝母)、湖北贝母和土贝母 5 个中国贝母主要类群。但是对于新疆地区贝母和东北地区的平贝母无明显区分能力。原因新疆地区贝母和东北地区的平贝母的 ITS、psbA-trnH、rbcL 及 matK 基因序列差异均很小。

目前利用 PCR-RFLP 法鉴别川贝母方法已纳入《中国药典》2015 年版, 该方法基于 DNA 条形码技术专属性强, 可准确有效鉴别川贝母真伪, 但也存在周期长, 开管操作易污染等缺点; 李敏等^[18]利用特异性 PCR 法鉴别浙贝母, 应用此方法虽然不需要经过测序, 直接通过特异性条带进行检测, 但是该方法操作容易出现假阳性, 相对误差大。目前也有 SYBR Green I 法用于鉴定川贝母^[19], 但该方法产生的非特异性产物较多, 会导致高背景和假阳性。而本研究通过综合

分析评价 ITS、psbA-trnH、rbcL 及 matK 4 种基因的在贝母属植物中的鉴定能力后, 选择 ITS 区域序列作为靶基因, 设计川贝母及伪品的特异引物及特异探针, 同时设计贝母的通用探针, 并通过人工设计合成一段阳性扩增内标可有效排除 PCR 体系中存在抑制成分而造成假阴性^[20]。利用多重多色实时荧光 PCR 技术, 一管反应同时鉴别川贝母、伪品贝母以及川贝与伪品贝母的混合品, 大大提高了检测效率和实用性。通过对市场上川贝母样品的抽样检测, 其 4 份检出为伪品贝母, 检测结果与所测序列构建 NJ 树聚类分析结果完全一致, 说明此方法对于鉴别川贝母专属性强, 准确率高, 具有操作简单、时间短、无污染、应用广泛等优点, 为川贝母真伪鉴别提供新依据。

参考文献

- [1] Türктаş M, Aslay M, Kaya E, *et al.* Molecular characterization of phylogenetic relationships in *Fritillaria* species inferred from chloroplast trnL-trnF sequences [J]. *Turkish J Biol*, 2014, 36(5): 552-560.
- [2] 肖培根, 姜 艳, 李 萍, 等. 中药贝母的基原植物和药用亲缘学的研究 [J]. *植物分类学报*, 2007, 45(4): 473-487.
- [3] 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.
- [4] 罗达龙, 黄林杰, 黄 琳. 实时荧光定量 PCR 对川贝母的鉴别应用 [J]. *中国药师*, 2016, 19(6): 1068-1070.
- [5] 崔国静, 石思佳, 宋桂英. 川贝母的来源与鉴别 [J]. *首都医药*, 2012, 19(9): 44.
- [6] 罗 焜, 马 培, 姚 辉, 等. 基于 ITS2 序列鉴定川贝母及其混伪品基原植物 [J]. *世界科学技术—中医药现代化*, 2012, 14(1): 1153-1158.
- [7] Hebert P D N, Cywinska A, Ball S L, *et al.* Biological identifications through DNA barcodes [J]. *Proc R Soc Lond Ser B Biol Sci*, 2003, 270(1512): 313-321.
- [8] 陈士林, 庞晓慧, 姚 辉, 等. 中药 DNA 条形码鉴定体系及研究方向 [J]. *世界科学技术—中医药现代化*, 2011, 13(5): 747-754.
- [9] 陈士林, 宋经元, 姚 辉, 等. 药用植物 DNA 条形码鉴定策略及关键技术分析 [J]. *Chin J Nat Med*, 2009(5): 322-327.
- [10] 任保青, 陈之端. 植物 DNA 条形码技术 [J]. *植物学报*, 2010, 45(1): 1-12.
- [11] 李 妮, 陈士林, 刘义梅, 等. 葫芦科植物通用 DNA 条形码的筛选 [J]. *中草药*, 2011, 42(7): 1396-1401.
- [12] Wang Q Z. Phylogenetic inference of the genus *Bupleurum* (Apiaceae) in Hengduan Mountains based on chromosome counts and nuclear ribosomal DNA ITS sequences [J]. *J System Evol*, 2008, 46(2): 142-154.
- [13] Cuenoud P, Savolainen V, Chatrou L W, *et al.* Molecular phylogenetics of Caryophyllales based on nuclear 18S rDNA and plastid rbcL, atpB, and matK DNA sequences [J]. *Amer J Bot*, 2002, 89(1): 132-144.
- [14] Steven G N, Subramanyam R. Testing plant barcoding in a sister species complex of pantropical *Acacia* (Mimosoideae, Fabaceae) [J]. *Mol Ecol Res*, 2009, 9(1): 172-180.
- [15] 俞 超, 梁孝祺, 陈金金, 等. DNA 条形码技术鉴定贝母属植物 [J]. *中草药*, 2014, 45(11): 1613-1619.
- [16] 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.
- [17] Ross H A, Murugan S, Li W L. Testing the reliability of genetic methods of species identification via simulation [J]. *System Biol*, 2008, 57(2): 216.
- [18] 李 敏, 黄龙妹, 赵 欣, 等. 浙贝母特异性 PCR 鉴定方法研究 [J]. *中草药*, 2014, 45(12): 1754-1757.
- [19] 罗达龙, 黄林杰, 黄 琳. 实时荧光定量 PCR 对川贝母的鉴别应用 [J]. *中国药师*, 2016, 18(6): 1068-1070.
- [20] 李 燕, 刘艳艳, 卞如如, 等. 多重实时荧光 PCR 鉴别金钱白花蛇源性方法研究 [J]. *食品与药品*, 2016, 18(4): 246-251.