

基于特异性 PCR 鉴别维药蜘蛛香及其混淆品

李德华^{1,2}, 程波², 叶力夏提·达那别克², 何江^{2*}

1. 新疆大学生命科学与技术学院, 新疆 乌鲁木齐 830017

2. 新疆维吾尔自治区药物研究院, 新疆 乌鲁木齐 830004

摘要: **目的** 建立一种快速鉴别蜘蛛香 *V. jatamansi* 和混淆品欧细辛 *A. europaeum*、细辛 *A. heterotropoides* 的特异性聚合酶链式反应 (PCR) 方法。**方法** 通过 Mega 6.0 软件对蜘蛛香、欧细辛和细辛的 ITS2 序列进行对比, 寻找差异位点设计特异性引物, 优化 PCR 反应条件, 并对该方法的专属性和适用性进行考察。**结果** 蜘蛛香特异性 PCR 鉴别方法, 采用引物对 F-T/R-T、退火温度 58 °C、循环次数 28 次, 经 PCR 扩增和凝胶电泳后蜘蛛香在约 151 bp 处得到特异性条带, 而混淆品无此条带, 此外该方法最低可检测出 DNA 质量浓度为 0.1 ng/μL 的样品。**结论** 所建立的特异性 PCR 方法可准确、快速对蜘蛛香及其混淆品进行鉴别, 为维药蜘蛛香的用药安全提供保障。

关键词: 蜘蛛香; 欧细辛; 细辛; 特异性 PCR; ITS2

中图分类号: R286.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2025)24-9165-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.24.026

Identification of uighur medicine *Valeriana jatamansi* and its adulterants by specific PCR

LI Dehua^{1,2}, CHENG Bo², YELXAT Danabek², HE Jiang²

1. College of Life Sciences and Technology, Xinjiang University, Urumqi 830017, China

2. Xinjiang Uygur Autonomous Region Institute of Pharmaceutical Research, Urumqi 830004, China

Abstract: Objective To establish a specific polymerase chain reaction (PCR) method for the rapid identification of *Valeriana jatamansi* and its adulterants *Asarum europaeum* and *Asarum heterotropoides*. **Methods** The ITS2 sequences of *V. jatamansi*, *A. europaeum* and *A. heterotropoides* were compared by Mega 6.0 software to find differential sites to design specific primers, optimise the PCR reaction conditions and examine the specificity and applicability of the method. **Results** *V. jatamansi* specific PCR identification method, using primer pair F-T/R-T, annealing temperature of 58 °C, the number of cycles 28 times, after PCR amplification and gel electrophoresis *V. jatamansi* specific bands at about 151 bp, while the adulterants have no bands, in addition, the method can detect samples with a minimum DNA concentration of 0.1 ng/μL. **Conclusion** The established specific PCR method can accurately and rapidly identify *V. jatamansi* and its adulterants, and provide a guarantee for the safety of the medication of traditional Uighur *V. jatamansi*.

Key words: *Valeriana jatamansi* Jones; *Asarum europaeum* L.; *Asarum heterotropoides* F. Schmidt; specific polymerase chain reaction; ITS2

蜘蛛香 *Valeriana jatamansi* Jones 为忍冬科 (Caprifoliaceae) 缬草属 *Valeriana* L. 植物, 收录于《中国药典》2015 年版^[1], 是新疆维吾尔医药中常用药材^[2]。其药性为二级干热, 具有补脑、安神、健胃、舒肝、燥湿利水、止咳平喘的功效, 常用于治疗胸闷气结、神经衰弱、失眠、高血压、咳嗽气喘、心脏病、肠胃疼痛和尿闭诸症。蜘蛛香以干燥根茎

入药, 主要分布于我国河南、湖北、四川、云南、贵州等省, 同时在巴基斯坦、印度等国也有分布^[3]。

在新疆维吾尔医药中, 由于药材大部分依赖进口, 药材来源不确定以及多语言环境下的名称翻译不准确, 导致药材名称的混乱^[4-5]。特别是蜘蛛香药材与马兜铃科 (Aristolochiaceae) 的欧细辛 *Asarum europaeum* L. 和其代用品细辛 *A. heterotropoides* F.

收稿日期: 2025-06-02

基金项目: “天山英才”-青年拔尖人才项目 (2022TSYCCX0022); 新疆维吾尔自治区重点研发项目 (2022B03007-2); 国家中医药管理局项目 (GZY-KJS-2024-012)

作者简介: 李德华 (1999—), 女, 硕士研究生, 研究方向为生物与医药。E-mail: 1137750023@qq.com

*通信作者: 何江 (1979—), 研究员, 研究方向为生药与药用植物资源。Tel: (0991)2320292 E-mail: hj_1211@163.com

Schmidt 的混用现象尤为突出。尽管三者在维语中均称为“*Asarum*”，但它们分属不同的科和属，具有不同的药性、功能主治、药理作用和化学成分，因此不可互相替代。此外，三者植株外形相似，需要专业人员进行鉴别，然而，其市场混用根源在于几个药材名称混用，干燥根茎的描述与药材名称往往不符，极大阻碍了蜘蛛香和欧细辛、细辛的有效鉴别。因此，为改善蜘蛛香与欧细辛、细辛的混淆现象，亟需建立一种科学、快速、简便的鉴别方法^[6-8]。

近年来，药材基原鉴定技术发展迅速，其中特异性聚合酶链式反应(PCR)技术已成为一种成熟的药材基原鉴别方法。该技术具备简单快速、灵敏度高、特异性强的优势，无需测序即可实现高效鉴别，广泛应用于中药材、中药饮片及中药配方颗粒基原鉴定^[9-12]。基于此，对蜘蛛香和欧细辛、细辛的 ITS2 序列进行分析，依据三者的差异位点片段设计特异性引物对，建立蜘蛛香的特异性 PCR 鉴别方法，以确保维药蜘蛛香药材的用药准确性和安全性。

1 材料

1.1 仪器

DYY-6C 型电泳仪(北京市六一仪器厂); Gel Doc XR+型凝胶成像仪(美国 Bio-Rad 公司); TProfessional 型梯度 PCR 扩增仪(德国 Biometra 公司); C-1000TM 型 PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司); Gentier 96E 型梯度 PCR 扩增仪(中国天隆科技公司); N60 型超微量紫外分光光度计(德国 Implen 公司); JM1000 型电子天平(余姚纪铭称重校验设备有限公司); 5424 型低温冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司)，UPC-I-10T 型纯水仪(中国优普公司)。

1.2 试剂及样品

Easy Taq DNA 聚合酶(批号 AP111-11，北京全式金生物技术股份有限公司)、Ex Taq(批号 RR001A，TaKaRa 公司)，Taq DNA 聚合酶(批号 ET101-01-01，北京天根生化科技有限公司)，DNA 凝胶快速纯化试剂盒(批号 EG101，北京全式金生物技术股份有限公司)、CTAB(批号 DS950，白鲨生物)，琼脂糖(批号 162135，上海贝晶生物技术有限公司)，DNA 提取酚试剂(批号 T0250，北京索莱宝科技有限公司)，0.5 mol/L EDTA 溶液(批号 E1170，北京索莱宝科技有限公司)，1 mol/L Tris-HCl 缓冲液(批号 T1150，北京索莱宝科技有限公司)，Ezup 柱式植物基因组 DNA 提取试剂盒(批号

B518261，生工生物工程有限公司)，蜘蛛香对照药材(批号 121179-201002)购自中国食品药品检定研究院，引物由生工生物工程上海股份有限公司合成，其他试剂均为国产分析纯。样品收集来自药店购买、野外采集，由新疆维吾尔自治区药物研究所国家青年岐黄学者何江研究员鉴定为蜘蛛香 *V. jatamansi* Jones、欧细辛 *A. europaeum* L.、细辛 *A. heterotropoides* F. Schmidt、凭证标本保存于新疆维吾尔自治区药物研究所(表 1)。

表 1 不同产地蜘蛛香及欧细辛、细辛等相关药材样品信息

Table 1 Information sheet on samples of *V. jatamans*, *A. europaeum*, *A. heterotropoides* and other related herbs of different origins

编号	药材名	来源	产地
VJ0	蜘蛛香	标本	中国云南
VJ1	蜘蛛香	干燥药材根	中国
VJ2	蜘蛛香	干燥药材根	中国四川
VJ3	蜘蛛香	干燥药材根	中国新疆
VJ4	蜘蛛香	干燥药材根	伊朗
VJ5	蜘蛛香	干燥药材根	伊朗
VJ6	蜘蛛香	干燥药材根	伊朗
VJ7	蜘蛛香	干燥药材根	伊朗
VJ8	蜘蛛香	干燥药材根	伊朗
VJ9	蜘蛛香	干燥药材根	中国新疆
VJ10	蜘蛛香	干燥药材根	巴基斯坦
VJ11	蜘蛛香	干燥药材根	巴基斯坦
VJ12	蜘蛛香	干燥药材根	巴基斯坦
VJ13	蜘蛛香	干燥药材根	巴基斯坦
VJ14	蜘蛛香	干燥药材根	巴基斯坦
VJ15	蜘蛛香	干燥药材根	巴基斯坦
VJ16	蜘蛛香	干燥药材根	巴基斯坦
VJ17	蜘蛛香	干燥药材根	巴基斯坦
VJ18	蜘蛛香	干燥药材根	巴基斯坦
VJ19	蜘蛛香	干燥药材根	巴基斯坦
VJ20	蜘蛛香	干燥药材根	巴基斯坦
VJ21	蜘蛛香	干燥药材根	巴基斯坦
VJ22	蜘蛛香	干燥药材根	巴基斯坦
VJ23	蜘蛛香	干燥药材根	巴基斯坦
VJ24	蜘蛛香	干燥药材根	巴基斯坦
VJ25	蜘蛛香	干燥药材根	巴基斯坦
VJ26	蜘蛛香	干燥药材根	巴基斯坦
VJ27	蜘蛛香	干燥药材根	巴基斯坦
VJ28	蜘蛛香	干燥药材根	巴基斯坦
VJ29	蜘蛛香	干燥药材根	巴基斯坦
VJ30	蜘蛛香	干燥药材根	中国新疆
VJ31	蜘蛛香	干燥药材根	中国四川
AE1	欧细辛	干燥叶、根	英国
AE2	欧细辛	干燥叶、根	英国
AE3	欧细辛	干燥叶、根	英国
AE4	欧细辛	干燥叶、根	英国
AH0	细辛	标本	中国辽宁
AH1	细辛	干燥药材根	中国辽宁
AM	荜叶细辛	干燥药材根	中国四川
AH2	细辛	野外采集	中国辽宁
AS	汉城细辛	野外采集	中国辽宁

2 方法

2.1 DNA 提取

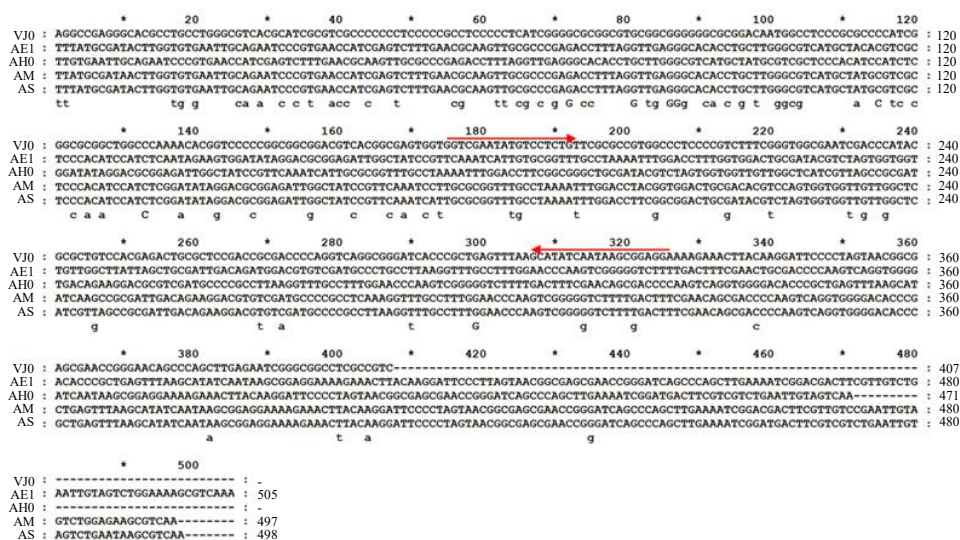
取样品, 用 75%乙醇擦拭表面, 晾干, 加入液氮用研钵研磨成细粉, 取约 20 mg。参考改良的 CTAB 法提取样品 DNA^[13], 该方法将 CTAB 法与天根试剂盒相结合进行 DNA 提取, 对该方法进行改动, 步骤 3~5 为改动步骤, 具体步骤如下: (1) 加入 800 μ L 核分离液, 静置 3 min 后 12 000 r/min 离心 5 min, 弃上清; (2) 加入 800 μ L 55 $^{\circ}$ C 预热的 2 \times CTAB 缓冲溶液、25 μ L 的 10 mg/mL 蛋白酶 K、10 μ L 的 20 mg/mL RNaseA, 于 55 $^{\circ}$ C 水浴 2 h; (3) 取出样品 12 000 r/min 离心 5 min, 取水相加入 600 μ L 氯仿混匀后 12 000 r/min 离心 5 min, 取水相; (4) 加入等体积的氯仿-酚 (1:1) 混匀后 12 000 r/min 离心 5 min, 取水相; (5) 加入等体积的氯仿-异戊醇 (24:1) 混匀后 12 000 r/min 离心 5 min, 取水相; 后续步骤按照生工 Ezup 柱式植物基因组 DNA 提取试剂盒中的 4~8 步进行提取。所得 DNA 用微量紫外分光光度计测定浓度和纯度, 将得到的 DNA 溶液于 4 $^{\circ}$ C 冰箱保存。

2.2 ITS2 序列扩增及特异性引物设计

对样品的 ITS2 序列进行 PCR 扩增。ITS2 序列

引物选择陈士林主编的《中药 DNA 条形码分子鉴定指导原则》中植物药 DNA 条形码 ITS2 序列通用引物^[14], 名称分别为 ITS2-F (5'-ATGCGATA-CTTGGTGTGAAT-3')、ITS2-R (5'-GACGCTT-CTCCAGACTACAAT-3')。PCR 反应体积 25 μ L, 包括 2 μ L DNA 模板, 0.25 μ L DNA 聚合酶 (全式金), 2.5 μ L 10 \times buffer, 2 μ L dNTP, 上下游引物各 0.5 μ L (10 μ mol/L), 用 ddH₂O 补足。扩增程序: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 55 $^{\circ}$ C 退火 90 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 90 s, 运行 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。产物经 1.5%琼脂糖凝胶电泳检测, 在 130 V 电压的条件下电泳 30 min, 将有明亮条带的扩增产物纯化并送至上海生工进行双向测序。

将蜘蛛香及其混淆品测序所得的 ITS2 序列用 Mega 6.0 软件进行多序列对比, 发现蜘蛛香与欧细辛、细辛之间存在大量的差异位点见图 1, 基于差异位点利用 Primer Premier 6.0 软件设计蜘蛛香特异性引物。上游引物: 5'-GGTCGAATATGTCCTC-TGT-3'; 下游引物: 5'-CCTCCGCTTATTGATATGC-3', 目标序列为 151 bp。引物由上海生工合成。



箭头为特异性正反引物。

Arrows denote specific forward and reverse primers.

图 1 蜘蛛香 (VJ0)、欧细辛 (AE1)、细辛 (AH0)、荜叶细辛 (AM)、汉城细辛 (AS) ITS2 基因序列比对结果

Fig. 1 Results of ITS2 gene sequence comparison of *V. jatamansi* (VJ0), *A. europaeum* (AE1), *A. heterotropoides* (AH0), *A. maximum* (AM), and *A. sieboldii* (AS)

2.3 PCR 扩增条件优化

PCR 扩增采用 25 μ L 体系, 包括 1 μ L DNA 模板, 0.25 μ L DNA 聚合酶, 2.5 μ L 10 \times buffer, 2 μ L

dNTP, 上下游引物各 0.5 μ L 特异引物, 用 ddH₂O 补足, 进行扩增, PCR 扩增程序: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 min, 55 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延

伸 30 s, 运行 30 个循环; 72 °C 延伸 5 min。产物取 5 μL 与 1 μL 6×loading buffer 混匀后于染色的 1.5% 琼脂糖凝胶进行电泳检测, 并记录结果。

对影响 PCR 特异性的主要因素如退火温度 (50~64 °C)、循环次数 (27~32 次)、DNA 模板浓度 (0.05~20 ng/μL) 进行优化。为确保实验的准确性, 每组实验均设置空白对照, 用蜘蛛香对照药材为模板进行条件优化, 并对引物的特异性和不同电压进行考察确保方法的准确性。

2.4 方法耐受性考察

分别使用不同厂家的 Taq 酶: TRANS®、TIANGEN®、TAKARA®; 以及不同厂家的 PCR 仪: Biometra®、Bio-Rad®、TIANLONG®对优化后的蜘蛛香特异性 PCR 鉴别方法进行耐受性考察; 检查不同厂家 Taq 酶以及仪器对方法的影响。

2.5 方法适用性考察

对样品进行特异性 PCR 扩增, 并进行适用性检测, 检测所建立方法的稳定性和准确性。

3 结果与分析

3.1 测序结果分析及邻接法树构建

测序结果用 CExpress 软件进行校对拼接, 去除低质量序列及引物区。基于隐马尔可夫模型的注释方法将所有序列去除两端的 5.8 S 和 28 S 区段^[15], 获得 ITS2 间隔区序列, 由于样品并非全部测序成功, 因此选择其中测序质量较好的 14 批代表性样品的序列在 Mega 6.0 软件中进行对比。用邻接法 (neighbor-joining, NJ) 构建系统聚类树, 设置 bootstrap1000 次重复, 检验各分支支持率。由图 2 可知 ITS2 序列将蜘蛛香与欧细辛、细辛分成 2 类, 符合前者与后者属于不同科的植物学分类结果, 此

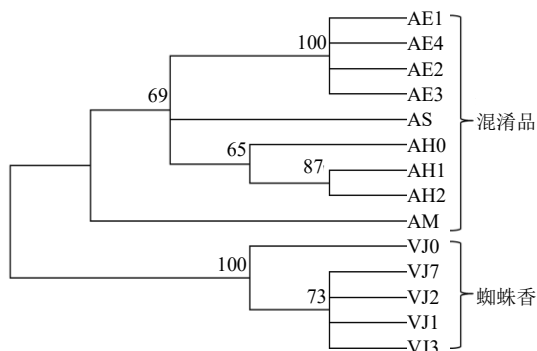


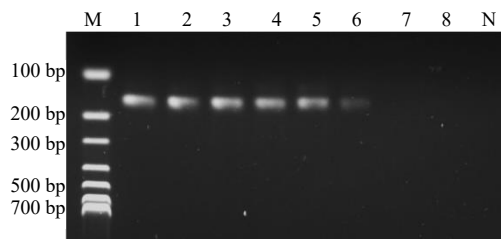
图 2 基于 ITS2 序列构建 NJ 树

Fig. 2 N-J tree constructed based on ITS2 sequences

外细辛属下的欧细辛和细辛也被分成 2 类, 分支支持率均大于 65%, 表明 ITS2 序列对蜘蛛香、欧细辛以及细辛有较好的区分效果。

3.2 特异性 PCR 鉴别反应条件的确定

3.2.1 退火温度考察结果 分别设置退火温度为 50、52、54、56、58、60、62 °C, 以质量浓度为 10 ng/μL 的蜘蛛香对照药材为模板进行扩增, 结果见图 3。当退火温度在 50~60 °C 时蜘蛛香对照药材在 151 bp 处出现条带, 空白无条带, 且未出现非特异性扩增。考虑退火温度越高特异性越强, 故选择 58 °C 为最佳退火温度。

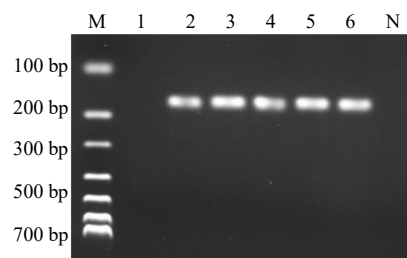


M-Marker; 1-50 °C; 2-52 °C; 3-54 °C; 4-56 °C; 5-58 °C; 6-60 °C; 7-62 °C; 8-64 °C; N-空白对照。
M-Marker; 1-50 °C; 2-52 °C; 3-54 °C; 4-56 °C; 5-58 °C; 6-60 °C; 7-62 °C; 8-64 °C; N-blank control.

图 3 退火温度对蜘蛛香特异性 PCR 鉴别的影响

Fig. 3 Effect of annealing temperature on specific PCR identification of *V. jatamansi*

3.2.2 循环次数考察结果 在退火温度为 58 °C 时, 分别设置循环次数为 27、28、29、30、31、32 次, 以质量浓度为 10 ng/μL 的蜘蛛香对照药材为模板, 对循环次数进行考察, 结果见图 4。当循环次数为 28~32 次时均可扩增出目标序列, 低于 28 次则会扩增失败, 故选择 28 次循环为最佳循环次数。

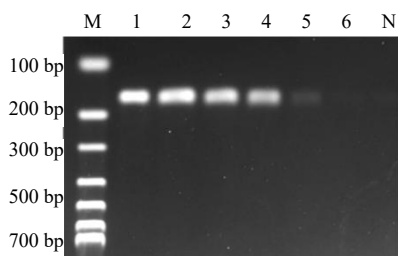


M-Marker; 1-27 循环; 2-28 次循环; 3-29 次循环; 4-30 次循环; 5-31 次循环; 6-32 次循环; N-空白对照。
M-Marker; 1-27 cycle; 2-28 cycle; 3-29 cycle; 4-30 cycle; 5-31 cycle; 6-32 cycle; N-blank control.

图 4 循环次数对蜘蛛香特异性 PCR 鉴别的影响

Fig. 4 Effect of number of cycles on specific PCR identification of *V. jatamansi*

3.2.3 模板浓度考察结果 按上述考察后方法,将蜘蛛香对照药材的 DNA 产物稀释为 20、10、2、1、0.1、0.05 ng/ μ L 作为模板进行扩增,结果见图 5。结果表明蜘蛛香对照药材 DNA 在低于 0.1 ng/ μ L 时会检测不到产物,且当质量浓度大于 1 ng/ μ L 时条带明亮清晰,因此在使用该方法时推荐 DNA 模板质量浓度大于 1 ng/ μ L。



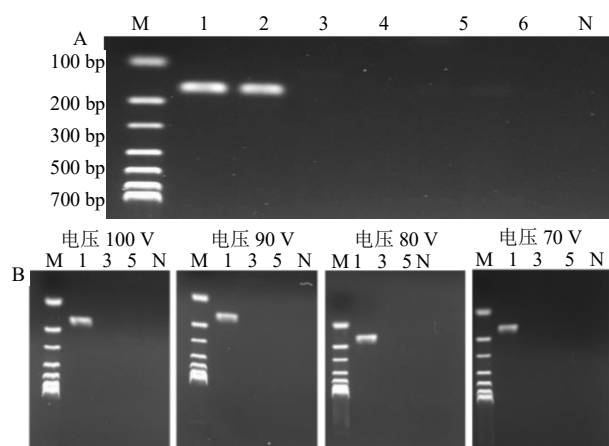
M-Marker; 1-20 ng· μ L⁻¹; 2-10 ng· μ L⁻¹; 3-2 ng· μ L⁻¹; 4-1 ng· μ L⁻¹; 5-0.1 ng· μ L⁻¹; 6-0.05 ng· μ L⁻¹; N-空白对照。

M-Marker; 1-20 ng· μ L⁻¹; 2-10 ng/ μ L; 3-2 ng· μ L⁻¹; 4-1 ng· μ L⁻¹; 5-0.1 ng· μ L⁻¹; 6-0.05 ng· μ L⁻¹; N-blank control.

图 5 DNA 模板量对蜘蛛香特异性 PCR 鉴别的影响

Fig. 5 Effect of DNA template usage on specific PCR identification of *V. jatamansi*

3.2.4 准确性考察结果 按建立的特异性 PCR 方法,以 10 ng/ μ L 的蜘蛛香对照药材为阳性对照,对浓度均为 10 ng/ μ L 的蜘蛛香、欧细辛、细辛药材进行检测,固定电泳时间为 30 min,对不同电压进行考察,结果见图 6。结果显示在建立的特异性 PCR



M-Marker; 1~2-蜘蛛香; 3~4-欧细辛; 5~6-细辛; N-空白对照。

M-Marker; 1—2-*V. jatamansi* Jones; 3—4-*A. europaeum* L.; 5—6-*A. heterotropoides* F. Schmidt; N-blank control.

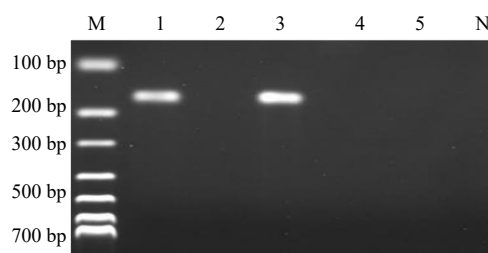
图 6 特异性引物 (A) 和电压 (B) 对蜘蛛香特异性 PCR 鉴别的影响

Fig. 6 Effect of specific primer (A) and volts (B) on specific PCR identification of *V. jatamansi*

方法下,只有蜘蛛香能在 151 bp 处扩增出条带,证实该特异性引物对鉴别蜘蛛香、欧细辛和细辛的准确性;且对电压的考察结果显示,电压会影响 Marker 的分离效果,在同样的电泳时间下,电压越小,Marker 条带的分离效果越好,而对特异条带的检测并无影响。

3.3 方法耐受性考察结果

3.3.1 不同厂家 Taq 酶对特异性 PCR 的影响 以 10 ng/ μ L 蜘蛛香对照药材 DNA 为模板,用 3 种不同厂家的 Taq DNA 聚合酶,对最终优化的蜘蛛香特异性 PCR 反应方法进行考察,结果见图 7。结果显示使用天根和全式金厂家的 Taq 酶能够扩出明亮的条带,但 TaKaRa 的 Taq 酶和空白对照均未扩增出目的条带,这表明不同厂家 Taq 酶对该方法影响较大,在使用该方法进行鉴别时需要针对不同厂家的酶进行筛选。



M-Marker; 1-全式金公司; 3-天根公司; 5-Takara 公司; 2、4、N-空白对照。

M-Marker; 1-TransGen; 3-Tiagen; 5-Takara; 2, 4, N-blank control.

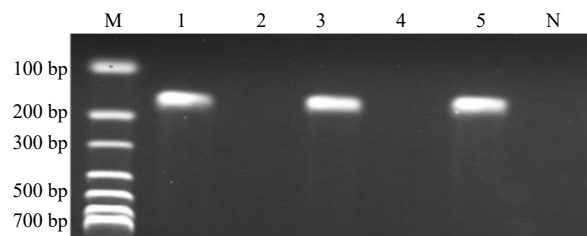
图 7 Taq 酶厂家对蜘蛛香特异性鉴别的影响

Fig. 7 Effect of different manufacturers of Taq polymerases on specific PCR identification of *V. jatamansi*

3.3.2 不同 PCR 仪器对特异性 PCR 的影响 以 10 ng/ μ L 蜘蛛香对照药材 DNA 为模板,用 3 个厂家的 PCR 仪器,对最终优化的蜘蛛香特异性 PCR 反应方法进行考察,结果见图 8。结果显示 3 种仪器均能有效扩增出目的条带,表明该方法对仪器的依赖性较低,国产仪器同样能够满足检测需求。

3.4 蜘蛛香特异性 PCR 鉴别方法建立

建立蜘蛛香特异性 PCR 鉴别方法,反应条件如下:体系总体积为 25 μ L,包括 1 μ L DNA 模板 (≥ 1 ng/L), 0.25 μ L Taq DNA 聚合酶 (北京全式金或天根), 2.5 μ L 10 \times buffer, 2 μ L dNTP, 上下游引物各 0.5 μ L (10 μ mol/L), ddH₂O 补足。PCR 扩增程序: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 58 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 运行 28 个循环; 72 $^{\circ}$ C

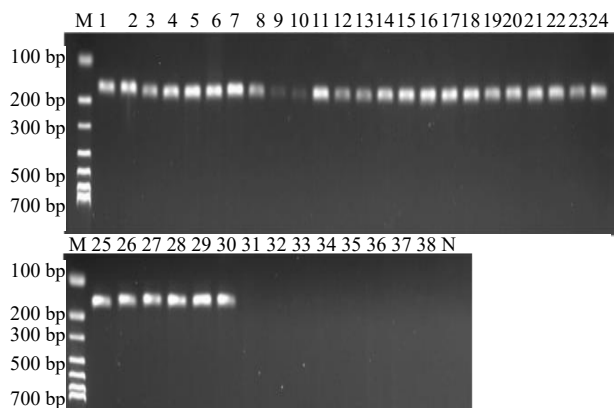


M-Marker; 1-德国 Biometra 公司; 3-中国天隆科技公司; 5-美国 BIO-RAD 公司; 2、4、N-空白对照。
M-Marker; 1-Biometra; 3-TianLong; 5-BIO-RAD; 2、4、N-blank control.

图 8 仪器对蜘蛛香特异性 PCR 鉴别的影响

Fig. 8 Effect of different kinds of PCR thermocyclers on specific PCR identification of *V. jatamansi*

延伸 5 min。剔除 DNA 质量较差的 VJ22、VJ25、AH1，同时对其余 38 批样品进行扩增，结果见图 9。只有蜘蛛香可在 151 bp 处扩增出单一条带，混淆品以及空白对照无条带产生，表明该方法能够有效的区分蜘蛛香与混淆品。



M-Marker; 1~30-VJ0~VJ21、VJ23~VJ24、VJ~26~VJ31; 31~34-AE1~AE4; 35~36-AH0、AH2; 37-AM; 38-AS; N-空白对照。
M-Marker; 1—30-VJ0—VJ21、VJ23—VJ24、VJ—26—VJ31; 31—34-AE1—AE4; 35—36-AH0、AH2; 37-AM; 38-AS; N-blank control.

图 9 38 批样品鉴别结果

Fig. 9 Identification results of 38 batches of samples

4 讨论

目前，分子鉴定方法在中药材鉴定领域得到广泛应用，因其准确且迅速的鉴定效果，能够实现高通量药材的检测，从而弥补传统鉴别方式对专业鉴别人员的依赖^[16-20]。作为植物鉴定的 DNA 候选条形码有 ITS、ITS2、psbA-trnH 等^[21]，课题组前期对 DNA 条形码多个序列进行了扩增，其中 ITS、ITS2、psbA-trnH 序列扩增成功，由于蜘蛛香干药材根茎基因组降解严重，导致多批药材扩增 ITS 序

列困难^[22]，psbA-trnH 序列则因为通用引物对细辛的特异性差^[23]，无法扩增其 psbA-trnH 序列，不适合作为建立特异性 PCR 方法的靶序列。其中，ITS2 序列是 3 种药材扩增成功率最高的序列，通过对样品的测序结果分析，发现在 ITS2 序列中存在足够的差异位点，可用于设计特异性引物，故选择 ITS2 序列作为建立鉴别蜘蛛香的特异性 PCR 方法的靶序列。

市面上的药材在外形相似易混淆以及名不符实等情况下，对药材进行 DNA 条形码鉴别是一个有效的方式，但进行 DNA 条形码鉴别的前提是成功提取药材的基因组。干燥药材的基因组提取产物受药材部位、放置时间、干燥方式等因素的影响，导致提取的 DNA 含量较低，且质量无法满足通用引物扩增的要求。前期研究发现蜘蛛香药材的根茎中富含淀粉、多酚和多糖等物质，这些物质会降低蜘蛛香 DNA 的提取质量，并抑制后续的 PCR 扩增^[24-25]。而特异性 PCR 反应设计特异性引物，根据目的序列的长度、电泳有无条带进行药材的鉴别。特异性引物可以通过数据库中的特征序列或药材测序结果进行设计^[26]，通过设计特异性较强的特异性引物，和扩增片段较小的序列，来降低对药材 DNA 质量的要求，达到快速准确鉴别蜘蛛香干燥药材的目的。

特异性引物的设计和 PCR 反应体系是特异性 PCR 鉴别方法的关键，遵循特异性引物设计原则，正反引物的 GC 含量分别为 47.4%、47.4%， T_m 分别为 56.3、59.6 °C，引物 3'端与模板进行严格的配对，降低 PCR 失败几率。且以蜘蛛香与混淆品存在连续多个的差异位点片段为正向引物，进一步提高引物的特异性。

综上，基于蜘蛛香、欧细辛和细辛的 ITS2 序列设计的特异性引物，建立鉴别维药蜘蛛香与其混淆品欧细辛、细辛的特异性 PCR 方法，该方法能够准确地区分蜘蛛香及其混淆品，为维药蜘蛛香的用药安全提供快速、准确的分子鉴别手段。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015: 139, 279.
- [2] 中国医学百科全书编辑委员会. 中国医学百科全书-维吾尔医学 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2005: 32.
- [3] 刘勇民. 维吾尔药志(下册) [M]. 乌鲁木齐: 新疆科技卫生出版社, 1999: 550.
- [4] 周钢, 单莲莲, 王亚丽, 等. 新疆民族药质量标准研究

- 现状及展望 [J]. 中国药事, 2024, 38(1): 28-34.
- [5] 杨明翰, 梁政亭, 盛萍. 新疆民族药的开发研究与前景展望 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(17): 227-236.
- [6] 张军, 闫顺华, 李笑蕾, 等. 新疆维吾尔药材质量现状调查分析 [J]. 中国药事, 2021, 35(3): 263-268.
- [7] 张彦福. 维吾尔药材真伪鉴别 [M]. 乌鲁木齐: 新疆美术摄影出版社, 新疆电子音像出版社, 1999: 56.
- [8] 国家中草药管理局《中华本草》编委会. 中华本草: 维吾尔药卷 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2005: 23.
- [9] 朋冬琴, 罗蜜蜜, 郭欣慰, 等. 当归实时荧光定量 PCR 内参基因筛选 [J]. 中草药, 2024, 55(1): 269-278.
- [10] 李雷, 李奇璋, 张汉明, 等. 沪地龙 3 个基原的多重位点特异性 PCR 鉴别 [J]. 中草药, 2024, 55(16): 5619-5626.
- [11] 陆游, 吴桂凡, 罗轶, 等. 相思子及其混淆品的特异性 PCR 鉴别 [J]. 中药材, 2023, 46(5): 1125-1129.
- [12] 许源升, 胡力, 蒋超, 等. 蜈蚣配方颗粒的位点特异性 PCR 鉴别 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2024, 30(4): 48-54.
- [13] 李西文, 冯雪, 刘姿怡. 一种以地下部分入药药材的 DNA 提取方法: 中国 CN116376897A [P]. 2023-07-04.
- [14] 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.
- [15] Keller A, Schleicher T, Schultz J, *et al.* 5.8S-28S rRNA interaction and HMM-based ITS2 annotation [J]. *Gene*, 2009, 430(1/2): 50-57.
- [16] Intharuksa A, Phrutivorapongkul A, Thongkhao K. Integrating DNA barcoding, microscopic, and chemical analyses for precise identification of *Plumbago indica* L., a prominent medicinal plant [J]. *Microchem J*, 2024, 199: 110038.
- [17] 娄千, 辛天怡, 宋经元. DNA 条形码技术在中药全产业链的应用进展 [J]. 药学学报, 2020, 55(8): 1784-1791.
- [18] 张欢欢, 徐金娣, 周静, 等. 基于 COI 条形码的市售蝉蜕及其混淆品 DNA 分子鉴定研究 [J]. 中草药, 2024, 55(6): 2057-2065.
- [19] 张心怡, 邱雨轩, 胡杨, 等. 中药辛夷及其近缘种的 DNA 条形码分子鉴定 [J]. 南京中医药大学学报, 2023, 39(11): 1086-1094.
- [20] 邹何元, 吴文如, 陆亚茹, 等. 近年来 DNA 微型条形码和 DNA 宏条形码在中药鉴定中的应用 [J]. 中药材, 2023, 46(8): 2101-2108.
- [21] Chen S L, Yao H, Han J P, *et al.* Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species [J]. *PLoS One*, 2010, 5(1): e8613.
- [22] 万新. 缬草属常用药用植物形态特征、光谱鉴别及 ITS 序列研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2007.
- [23] 欧阳艳飞. 北细辛种质资源显微和分子鉴别方法 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2016.
- [24] 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.
- [25] 刘杰, 房文亮, 唐哲, 等. 基于响应面法优化紫草药材的基因组 DNA 提取条件 [J]. 药物分析杂志, 2022, 42(8): 1345-1353.
- [26] 杨灏, 陈随清, 练从龙, 等. 平贝母特异性 PCR 鉴别方法研究 [J]. 中药材, 2021, 44(7): 1584-1589.

[责任编辑 时圣明]