

蒙古黄芪、膜荚黄芪及混伪品种子的位点特异性PCR鉴别

罗丽¹, 胡力², 蒋超³, 陈梓媛³, 李晓琳³, 袁媛^{1,3*}

(1. 广东药科大学 中药学院, 广州 510006;

2. 安徽中医药大学 药学院, 合肥 230012;

3. 中国中医科学院 中药资源中心 道地药材品质保障与资源持续利用全国重点实验室, 北京 100700)

[摘要] 目的: 基于特异性聚合酶链式反应(PCR)建立一种可以准确、快速鉴别蒙古黄芪、膜荚黄芪种子的方法。方法: 利用叶绿体基因组综合数据库(CGIR)及 IdenDSS 软件分别获取蒙古黄芪、膜荚黄芪的DNA特征片段, 在此基础上筛选获得蒙古黄芪与膜荚黄芪的特异性单核苷酸多态性(SNP)位点, 根据该位点设计蒙古黄芪特异性鉴别引物对MG-F/MG-R和膜荚黄芪特异性鉴别引物对MJ-F/MJ-R。分别建立蒙古黄芪和膜荚黄芪特异性PCR鉴别方法, 优化PCR反应体系, 并对该方法的专属性和适用性进行考察。结果: 蒙古黄芪特异性PCR鉴别方法, 采用引物对MG-F/MG-R、退火温度62℃、循环次数28次, 经PCR扩增和凝胶电泳后蒙古黄芪在约220 bp处得到特异性条带, 而膜荚黄芪和其他混伪品种子无条带; 膜荚黄芪特异性PCR鉴别方法, 采用引物对MJ-F/MJ-R、退火温度58℃、循环次数28次, 经PCR扩增和凝胶电泳后膜荚黄芪扩增得到约150 bp的条带, 而蒙古黄芪及混伪品无扩增产物。结论: 该研究建立的特异性PCR鉴别方法, 可以准确、快速对蒙古黄芪、膜荚黄芪进行种源鉴别, 为黄芪种子的分类与准确鉴定提供了一定的科学依据。

[关键词] 蒙古黄芪; 膜荚黄芪; 种子; 聚合酶链式反应

[中图分类号] R284.2; R285; R289; R287; R22; R2-031; R33; R24 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903 (2024)04-0021-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20231211

[网络出版地址] <https://link.cnki.net/urlid/11.3495.R.20230920.1410.003>

[网络出版日期] 2023-09-20 16:06:43

Specific PCR for Identification of *Astragalus membranaceus* var. *mongholicus* Seeds, *A. membranaceus* Seeds, and Adulterants

LUO Li¹, HU Li², JIANG Chao³, CHEN Ziyuan³, LI Xiaolin³, YUAN Yuan^{1,3*}

(1. School of Traditional Chinese Medicine, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China;

2. School of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012, China;

3. State Key Laboratory Breeding Base of Dao-Di Herbs, National Resource Center for Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a method based on specific polymerase chain reaction (PCR) that can accurately and rapidly identify *Astragalus membranaceus* var. *mongholicus* (AMM) seeds and *A. membranaceus* (AM) seeds. **Method:** The Chloroplast Genome Information Resource (CGIR) and IdenDSS were used to obtain the characteristic DNA fragments of AMM and AM, and the specific single nucleotide polymorphism (SNP) sites of AMM and AM were screened out, on the basis of which the specific primers

[收稿日期] 2023-06-30

[基金项目] 国家重点研发计划项目(2020YFE0205100); 中国中医科学院科技创新工程项目(C12021A041); 国家科技性基础资源调查项目(2018FY100800); 青年岐黄学者项目

[第一作者] 罗丽, 在读硕士, 从事中药资源与鉴定研究, E-mail: luoli990322@126.com

[通信作者] * 袁媛, 研究员, 博士生导师, 从事中药鉴定与分子生药学研究, Tel: 010-64087649, E-mail: y_yuan0732@163.com

MG-F/MG-R of AMM and MJ-F/MJ-R of AM were designed. The specific PCR method for identifying AMM and AM was established and optimized, and the specificity and applicability of the method were investigated. **Result:** The specific PCR conditions for the identification of AMM were primers MG-F/MG-R, annealing at 62 °C, and 28 cycles. After PCR amplification and gel electrophoresis, the specific band appeared at about 220 bp, with no band for the seeds of AM or adulterants. The specific PCR conditions for identifying the AM were primers MJ-F/MJ-R, annealing at 58 °C, and 28 cycles. After PCR amplification and gel electrophoresis, the band appeared at about 150 bp, with no band of AMM or adulterants. **Conclusion:** The specific PCR method established in this study can accurately and quickly identify the seeds of AMM and AM, which provides a basis for the classification and accurate identification of *Astragalus* seeds and adulterants.

[Keywords] *Astragalus membranaceus* var. *mongholicus*; *Astragalus membranaceus*; seed; polymerase chain reaction

黄芪以蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* var. *mongholicus* 或膜荚黄芪 *A. membranaceus* 的干燥根入药^[1],具有抗炎、抗氧化、抗肿瘤、提高机体免疫功能和保护心脑血管等作用^[2-5]。以黄芪为原料的中成药多达200余种^[6],具有“补气固表之圣药”的美称。随着黄芪需求量增加,野生和半野生资源已无法满足需求,我国在20世纪50年代开始大规模种植黄芪,主要以蒙古黄芪为主,约占总资源量80%,其次为膜荚黄芪^[7]。但目前黄芪种子的混杂现象较为严重,由于其与斜茎黄芪、沙苑子、紫云英等种子形态相似^[8],且蒙古黄芪和膜荚黄芪种子形态相同、颜色相似,无法通过传统方法进行鉴别^[9]。

随着现代农业的持续发展,黄芪逐步实现规模化、机械化种植^[10],但蒙古黄芪与膜荚黄芪的物候期存在较大差异,表现为膜荚黄芪发育快,生长一年即可开花结籽;而蒙古黄芪发育较慢,一般生长一年仍无法开花结籽^[11]。黄芪种子混杂会导致其田间生长状况差异较大,不利于生产管理和机械化种植,并严重影响后续繁殖^[7]。另一方面,蒙古黄芪与膜荚黄芪的药材性状、化学成分等也存在较大差异,表现为膜荚黄芪药材质地较软,韧性好,断面粉性,纤维性弱;蒙古黄芪药材质地坚硬且有韧性,不易折断,断面纤维性^[12],二者种子混杂是导致黄芪药材质量不稳定的主要原因之一。为了改善黄芪种子混杂现象,亟需建立一种科学、快速、准确、简便的方法对蒙古黄芪、膜荚黄芪种子及其混伪品进行鉴别,以保障种源的准确性。

随着中药鉴定技术的发展,特异性聚合酶链式反应(PCR)鉴定技术日益成熟,在中药材、中药饮片及中药配方颗粒基原鉴别中被广泛应用^[13-23],具有稳定、准确、特异性好等特点^[13]。本研究利用 IdenDSS 软件对蒙古黄芪和膜荚黄芪叶绿体基因组

数据进行分析,获得蒙古黄芪、膜荚黄芪的DNA特征性片段(DSS)^[24],并筛选获得蒙古黄芪、膜荚黄芪特异性单核苷酸多态性(SNP)位点,根据该特异性位点设计鉴别引物,并建立一种准确、快速区分蒙古黄芪、膜荚黄芪及混伪品种子的特异性PCR鉴别方法,为保障黄芪种源的准确性、提升药材质量奠定基础。

1 材料

本研究共收集黄芪及其混伪品种子55份,包括38批市售样本和16批采集的基原植物种子样本。样品分别来自于内蒙古、山西、甘肃、河北、山东和江苏等省,经中国中医科学院中药资源中心彭华胜研究员鉴定,分别为蒙古黄芪(27批)、膜荚黄芪(14批)、紫云英(3批)、沙苑子(4批)、望江南(4批)、斜茎黄芪(3批)。所有样品均保存于中国中医科学院中药资源中心,样品信息见表1、表2。

2×M5 Super FastTaq PCR Master Mix DNA聚合酶(北京聚合美生物科技有限公司,批号23DB0801);Trans 2 000 bp DNA Marker(北京全式金生物技术有限公司,批号R20222);2×Rapid Taq Master Mix DNA聚合酶、2×Taq plus Master Mix II DNA聚合酶(南京诺唯赞生物科技股份有限公司,批号分别为017E2241IA、B2242HBB);Ex Taq HS DNA聚合酶(日本Takara公司,批号AL51990A)。多糖多酚植物基因组DNA提取试剂盒(天根生化科技有限公司,批号X0617)。

VeritiPro™型PCR仪、Veriti™型PCR仪、GeneAmp9700型PCR仪(美国Applied Biosystems公司);TC-512型PCR仪(上海Techne公司);SYNGENE SYNGENE型凝胶成像系统(美国Gene公司)。

表1 蒙古黄芪、膜荚黄芪种子样品信息

Table 1 Seeds sample information of *Astragalus membranaceus* var. *mongholicu* and *A. membranaceus*

编号	品种	拉丁名	产地
G1	蒙古黄芪	<i>Astragalus membranaceus</i> var. <i>mongholicus</i>	内蒙古乌兰察布市蛮汉山(基地)
G2	蒙古黄芪	<i>A. membranaceus</i> var. <i>mongholicus</i>	甘肃岷县梅川镇(基地)
G3	蒙古黄芪	<i>A. membranaceus</i> var. <i>mongholicus</i>	甘肃漳县石川镇(基地)
G4	蒙古黄芪	<i>A. membranaceus</i> var. <i>mongholicus</i>	甘肃临潭县羊永乡(基地)
G5-9	蒙古黄芪	<i>A. membranaceus</i> var. <i>mongholicus</i>	山西省(市售)
G10~G19	蒙古黄芪	<i>A. membranaceus</i> var. <i>mongholicus</i>	内蒙古(市售)
G20~G24	蒙古黄芪	<i>A. membranaceus</i> var. <i>mongholicus</i>	甘肃省(市售)
G25~G26	蒙古黄芪	<i>A. membranaceus</i> var. <i>mongholicus</i>	东北(市售)
G27	蒙古黄芪	<i>A. membranaceus</i> var. <i>mongholicus</i>	河北省张家口市(市售)
J1	膜荚黄芪	<i>A. membranaceus</i>	呼和浩特市武川县(基地)
J2	膜荚黄芪	<i>A. membranaceus</i>	包头固阳县(基地)
J3	膜荚黄芪	<i>A. membranaceus</i>	河北省唐山市乐亭县同各庄镇(基地)
J4	膜荚黄芪	<i>A. membranaceus</i>	黑龙江省齐齐哈尔(基地)
J5~J8	膜荚黄芪	<i>A. membranaceus</i>	内蒙古(市售)
J9~J12	膜荚黄芪	<i>A. membranaceus</i>	河北省唐山市(市售)
J13~J14	膜荚黄芪	<i>A. membranaceus</i>	山东省(市售)

表2 黄芪种子混伪品

Table 2 Adulterants of *Astragalus* seeds

编号	名称	拉丁名	产地
Z1	紫云英	<i>Astragalus sinicus</i>	江苏(基地)
Z2	紫云英	<i>A. sinicus</i>	江苏(基地)
Z3	紫云英	<i>A. sinicus</i>	湖北(市售)
B1	沙苑子	<i>Phyllobium chinense</i>	江苏(基地)
B2	沙苑子	<i>P. chinense</i>	江苏(基地)
B3~B4	沙苑子	<i>P. chinense</i>	江苏(市售)
W1	望江南	<i>Senna occidentalis</i>	江苏(基地)
W2	望江南	<i>S. occidentalis</i>	江苏(基地)
W3~W4	望江南	<i>S. occidentalis</i>	江苏(市售)
X1	斜茎黄芪	<i>Astragalus laxmannii</i>	河南(基地)
X2	斜茎黄芪	<i>A. laxmannii</i>	河北(基地)
X3	斜茎黄芪	<i>A. laxmannii</i>	河南(市售)

2 方法

2.1 DNA提取 将蒙古黄芪种子、膜荚黄芪及其混伪品种子样品,用75%乙醇擦拭表面,自然挥干,放入2.0 mL离心管中,加入1枚钢珠,液氮速冻,然后用高通量组织球磨仪研磨2 min(4 000 r·min⁻¹),参照多糖多酚植物基因组DNA提取试剂盒说明书操作步骤,对种子样本进行总DNA提取,并将得到的DNA溶液置于4℃冰箱中保存备用。

2.2 特异性引物设计 利用CGIR数据库中收录的

蒙古黄芪(序列号NC029828.1、MT982389.1)、膜荚黄芪(序列号KX255662.1)叶绿体基因组数据,结合IdenDSS软件获得蒙古黄芪和膜荚黄芪的DSS片段,并对比蒙古黄芪、膜荚黄芪样品扩增产物序列得到SNP。利用Primer 5.0软件设计蒙古黄芪特异性鉴别引物对MG:上游引物5'-GTTTATCAGTGGTGGTATAGT-3',下游引物5'-CTAAGGAACTGACTCCAAA-3',预期PCR产物长度约为220 bp;膜荚黄芪特异性鉴别引物对MJ:上游引物5'-CTACTGTTTGTCCCTCCT-3',下游引物5'-TGTACGGCTTTACAGTGA-3',预期PCR产物长度约为150 bp。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

2.3 PCR扩增条件 采用2.2项下设计的两对引物,分别对蒙古黄芪、膜荚黄芪及混伪品种子的总DNA模板进行扩增,并考察以下参数:①退火温度,蒙古黄芪设置退火温度为60、62、64、66℃,膜荚黄芪设置退火温度为56、58、60、62℃;②PCR循环次数,蒙古黄芪设置循环数为24、26、28、30次,膜荚黄芪设置循环数为26、28、30、32次;③Taq种类,2×M5 Super FastTaq PCR Master Mix DNA聚合酶、2×Rapid Taq Master Mix DNA聚合酶、2×Taq plus Master Mix II DNA聚合酶、Ex Taq HS;④DNA模板量分别为20、100、500、1 000 ng;⑤PCR仪考察,

分别考察 VeritiPro™ 型、Veriti™ 型、GeneAmp9700 型、TC-512 型 4 种 PCR 仪。

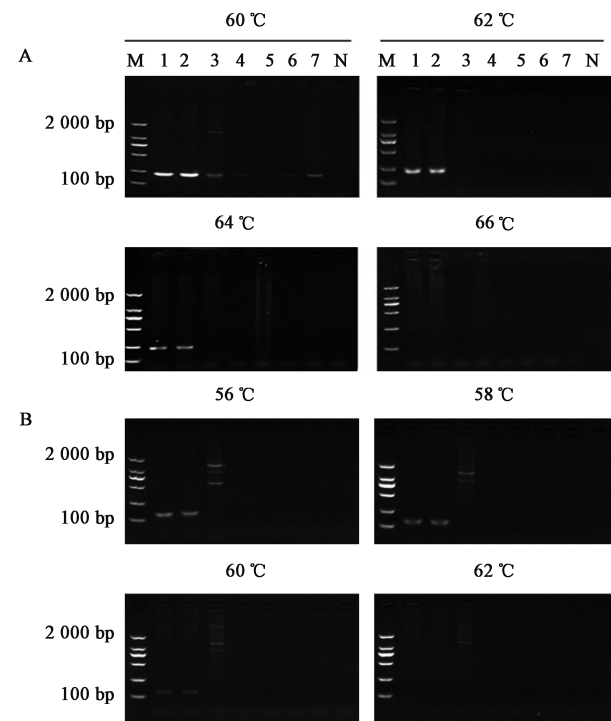
PCR 反应体系总体积为 25 μ L, 其中包括上、下游引物各 0.4 μ L, DNA 聚合酶 12.5 μ L, 一定量的 DNA 模板, 无菌双蒸水补足剩余体积。利用 1.5% 琼脂糖凝胶进行电泳检测。

3 结果与分析

3.1 PCR 鉴别条件的确定与耐用性考察

3.1.1 退火温度 蒙古黄芪特异性鉴别, 设计退火温度为 60~66 $^{\circ}$ C。PCR 扩增结果表明退火温度在 62~64 $^{\circ}$ C 时, 蒙古黄芪在约 220 bp 处有明亮条带, 而在该目的大小处膜荚黄芪和混伪品均无条带; 退火温度为 60 $^{\circ}$ C 时, 膜荚黄芪和部分混伪品出现弱扩增现象, 在产物目的大小处出现假阳性条带; 而 66 $^{\circ}$ C 时, 由于退火温度过高, 所有样本均无扩增。因此选择 62 $^{\circ}$ C 为蒙古黄芪特异性 PCR 鉴别方法的最优退火温度。见图 1A。

膜荚黄芪特异性鉴别, 设计退火温度为 56~

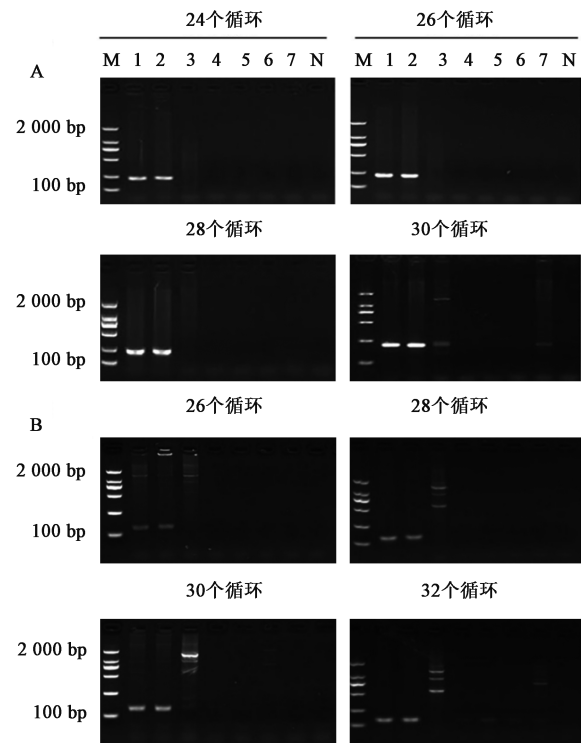


注: A. 蒙古黄芪特异性鉴别引物 PCR 扩增结果; M. Trans 2 000 bp DNA Maker; 1~2. 蒙古黄芪; 3. 膜荚黄芪; 4. 紫云英; 5. 沙苑子; 6. 望江南; 7. 斜茎黄芪; N. 空白对照; B. 膜荚黄芪特异性鉴别引物 PCR 扩增结果; M. Trans 2 000 bp DNA Maker; 1~2. 膜荚黄芪; 3. 蒙古黄芪; 4. 紫云英; 5. 沙苑子; 6. 望江南; 7. 斜茎黄芪; N. 空白对照

图 1 退火温度对蒙古黄芪(A)、膜荚黄芪(B)鉴别结果的影响
Fig. 1 Effect of annealing temperature on identification results of *Astragalus membranaceus* var. *mongholicu* (A) and *A. membranaceus*(B)

62 $^{\circ}$ C。PCR 扩增结果表明退火温度为 56~58 $^{\circ}$ C 时, 膜荚黄芪在约 150 bp 处获得明亮条带, 蒙古黄芪和混伪品均未得到扩增产物; 随着退火温度升高, 60 $^{\circ}$ C 时膜荚黄芪扩增条带较淡, 62 $^{\circ}$ C 时膜荚黄芪无扩增产物, 因此选择膜荚黄芪鉴定方法的退火温度为 58 $^{\circ}$ C。见图 1B。

3.1.2 循环次数考察 蒙古黄芪特异性鉴别, 退火温度为 62 $^{\circ}$ C, 设计循环次数为 24~30 个循环, PCR 扩增结果表明循环为 24~28 个时, 蒙古黄芪可得到约 220 bp 的条带, 而膜荚黄芪及混伪品均无条带; 30 个循环时, 膜荚黄芪和部分混伪品出现假阳性条带, 为保证结果的稳定性, 选择 28 个循环进行 PCR 反应。见图 2A。



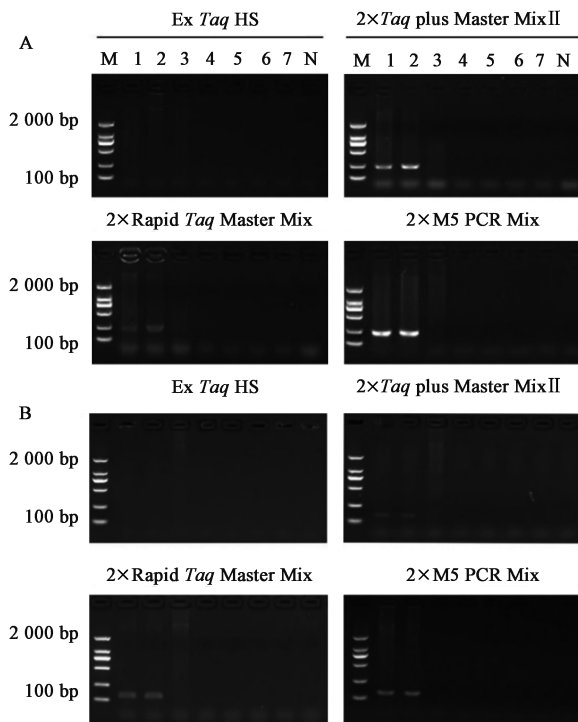
注: A. 蒙古黄芪特异性鉴别引物 PCR 扩增结果; M. Trans 2 000 bp DNA Maker; 1~2. 蒙古黄芪; 3. 膜荚黄芪; 4. 紫云英; 5. 沙苑子; 6. 望江南; 7. 斜茎黄芪; N. 空白对照; B. 为膜荚黄芪特异性鉴别引物 PCR 扩增结果; M. Trans 2 000 bp DNA Maker; 1~2. 膜荚黄芪; 3. 蒙古黄芪; 4. 紫云英; 5. 沙苑子; 6. 望江南; 7. 斜茎黄芪; N. 空白对照

图 2 循环次数对蒙古黄芪(A)、膜荚黄芪(B)鉴别结果的影响
Fig. 2 Influence of cycle times on identification results of *Astragalus membranaceus* var. *mongholicu* (A) and *A. membranaceus*(B)

利用膜荚黄芪特异性鉴别引物、退火温度为 58 $^{\circ}$ C 进行 PCR 扩增, 设计循环次数为 26~32 个循环, PCR 循环为 26~28 个时, 膜荚黄芪可得到约

150 bp的条带,而蒙古黄芪以及混伪品种子在目的大小处均未得到扩增产物,循环次数升至30、32个时,混伪品种子出现假阳性条带,因此选择28个循环进行PCR反应。见图2B。

3.1.3 不同 Taq 酶考察 选用2×M5 Super Fast Taq PCR Master Mix、2×Rapid Taq Master Mix、2×Taq plus Master Mix II 和 Ex Taq HS 4个DNA聚合酶进行考察,不同的Taq酶PCR反应扩增得到的产物条带亮度也有差异。在Ex Taq HS酶作用下,蒙古黄芪、膜荚黄芪特异性鉴别引物均未能扩增出条带;使用2×Rapid Taq Master Mix和2×Taq酶扩增条带较淡,效果不佳,因此两种特异性引物均选择扩增效果较好的2×M5 PCR Mix酶作为蒙古黄芪和蒙古黄芪PCR鉴别用酶。见图3。

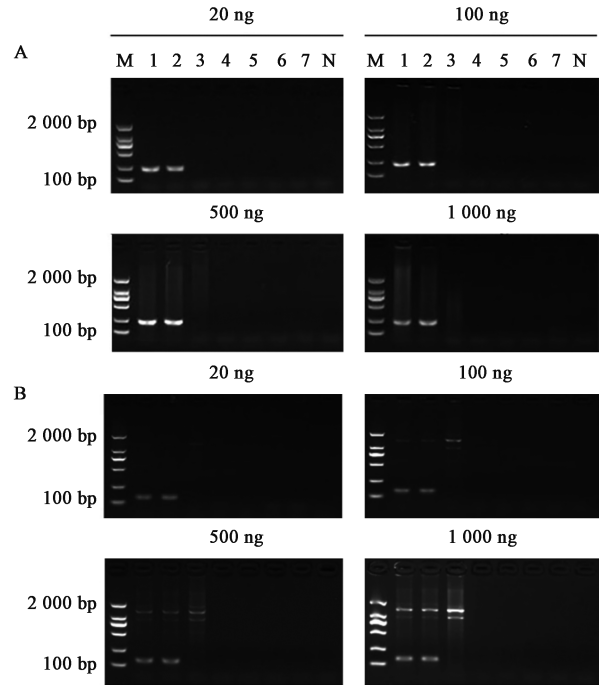


注:A.蒙古黄芪;M.Trans 2 000 bp DNA Maker;1~2.蒙古黄芪;3.膜荚黄芪;4.紫云英;5.沙苑子;6.望江南;7.斜茎黄芪;N.空白对照。B.膜荚黄芪;M.Trans 2 000 bp DNA Maker;1~2.膜荚黄芪;3.蒙古黄芪;4.紫云英;5.沙苑子;6.望江南;7.斜茎黄芪;N.空白对照

图3 不同 Taq 酶对蒙古黄芪(A)、膜荚黄芪(B)鉴别结果的影响
Fig. 3 Effect of different Taq enzymes on identification results of *Astragalus membranaceus* var. *mongholicus* (A) and *A. membranaceus*(B)

3.1.4 DNA 模板量考察 为考察PCR反应体系中DNA模板量对结果的影响,分别采用20、100、500、1 000 ng的DNA模板量。蒙古黄芪、膜荚黄芪特异性鉴别引物均可扩增出条带,其中蒙古黄芪得到约220 bp的条带,膜荚黄芪得到约150 bp的条带。但

DNA模板量过高,扩增受到抑制,条带颜色较淡,因此选择在25 μL体系中加入500 ng(2.5 μL)的DNA模板进行PCR扩增。见图4。



注:A.蒙古黄芪;M. Trans 2 000 bp DNA Maker;1~2.蒙古黄芪;3.膜荚黄芪;4.紫云英;5.沙苑子;6.望江南;7.斜茎黄芪;N.空白对照。B.膜荚黄芪;M. Trans 2 000 bp DNA Maker;1~2.膜荚黄芪;3.蒙古黄芪;4.紫云英;5.沙苑子;6.望江南;7.斜茎黄芪;N.空白对照

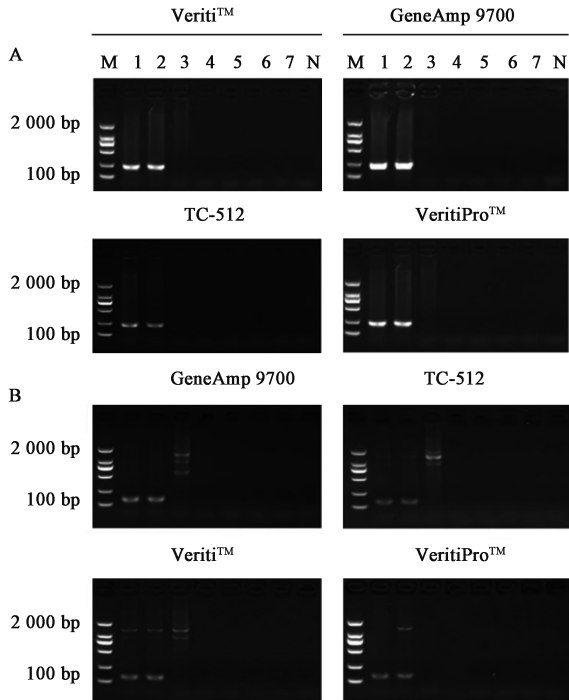
图4 不同DNA模板量对蒙古黄芪(A)、膜荚黄芪(B)鉴别结果的影响

Fig. 4 Influence of different DNA template amount on identification results of *Astragalus membranaceus* var. *mongholicus* (A) and *A. membranaceus*(B)

3.1.5 PCR 鉴别方法的确立 根据退火温度、循环次数、Taq酶种类、模板量的考察结果,确定蒙古黄芪、膜荚黄芪鉴别的PCR反应条件,反应体系包括2×M5 PCR Mix 12.5 μL,鉴别引物(10 μmol·L⁻¹)分别为0.4 μL,DNA模板为2.5 μL(500 ng),无菌双蒸水为9.2 μL。蒙古黄芪特异性PCR反应参数,95℃预变性3 min;再94℃变性30 s,62℃退火30 s,72℃延伸30 s(循环反应28次);72℃延伸5 min。膜荚黄芪特异性PCR反应参数,95℃预变性3 min;再94℃变性30 s,58℃退火30 s,72℃延伸30 s(循环反应28次);72℃延伸5 min。

3.2 不同PCR仪考察 考察VeritiPro™型、Veriti™型、GeneAmp9700型、TC-512型4种PCR仪对蒙古黄芪、膜荚黄芪及其种子混伪品鉴别结果的影响。4种PCR仪均可扩增得到对应条带,而混伪品无扩

增条带,可获得正确的鉴定结果。见图5。

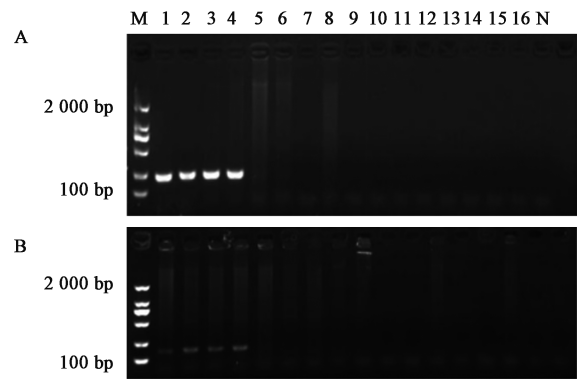


注:A.蒙古黄芪特;M. Trans 2 000 bp DNA Maker; 1~2. 蒙古黄芪;3. 膜荚黄芪;4. 紫云英;5. 沙苑子;6. 望江南;7. 斜茎黄芪;N. 空白对照。B. 膜荚黄芪;M. Trans 2 000 bp DNA Maker; 1~2. 膜荚黄芪;3. 蒙古黄芪;4. 紫云英;5. 沙苑子;6. 望江南;7. 斜茎黄芪;N. 空白对照

图5 不同PCR仪对蒙古黄芪(A)、膜荚黄芪(B)鉴别结果的影响
Fig. 5 Influence of different PCR instruments on identification results of *Astragalus membranaceus* var. *mongholicu* (A) and *A. membranaceus* (B)

3.3 专属性考察 对蒙古黄芪、膜荚黄芪及其种子混伪品进行鉴定,采用蒙古黄芪特异性PCR引物扩增,蒙古黄芪种子能扩增得到约220 bp的条带,膜荚黄芪及其余伪品种子均无相应条带扩增;采用膜荚黄芪特异性PCR引物对DNA模板进行扩增,膜荚黄芪种子能扩增得到约150 bp的条带,而蒙古黄芪和伪品种子均无条带。见图6。

3.4 适用性考察 使用上述方法对27批蒙古黄芪种子、14批膜荚黄芪种子、2批紫云英种子、4批沙苑子种子、4批望江南种子和3批斜茎黄芪种子进行PCR鉴别,以验证本方法的适用性。结果表明,利用蒙古黄芪特异性引物对所有样本进行扩增,蒙古黄芪种子可扩增得到约220 bp的单一特异性鉴别条带,但膜荚黄芪和混伪品种子在对应位置处均无条带,空白对照无条带,见图7A;利用膜荚黄芪特异性引物对所有样本进行扩增,膜荚黄芪种子可扩增得到约150 bp的特异性鉴别条带,蒙古黄芪及伪品



注:A. 蒙古黄芪;M. Trans 2 000 bp DNA Maker; 1~4. 蒙古黄芪(G1~G4);5~8. 膜荚黄芪(J1~J4);9~10. 紫云英(Z1~Z2);11~12. 沙苑子(B1~B2);13~14. 望江南(W1~W2);15~16. 斜茎黄芪(X1~X2);N. 空白对照。B. 膜荚黄芪;M. Trans 2 000 bp DNA Maker; 1~4. 膜荚黄芪(J1~J4);5~8. 蒙古黄芪(G1~G4);9~10. 紫云英(Z1~Z2);11~12. 沙苑子(B1~B2);13~14. 望江南(W1~W2);15~16. 斜茎黄芪(X1~X2);N. 空白对照

图6 采用特异性鉴别方法分别鉴别蒙古黄芪、膜荚黄芪及种子混伪品

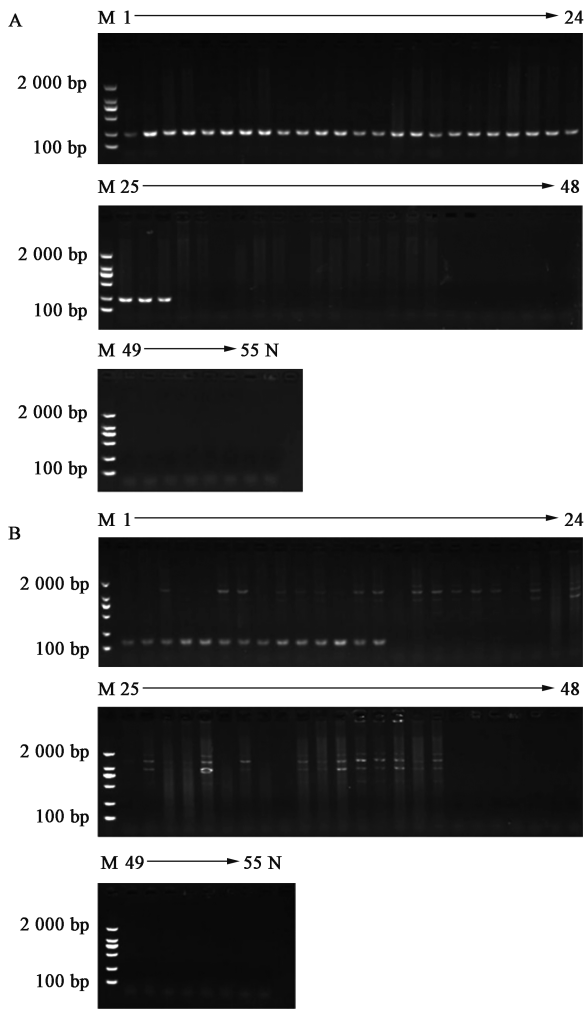
Fig. 6 Specific identification methods of *Astragalus membranaceus* var. *mongholicu* seeds and *A. membranaceus* seeds and its adulterants were identified respectively

种子在对应目的大小处均无条带,空白对照无条带,见图7B。因此利用这2对特异性引物可以准确的鉴别蒙古黄芪、膜荚黄芪及种子混伪品。

4 讨论

目前中药材种子的鉴别主要依靠种子形态特征和显微特征,王俊杰等^[25]研究发现蒙古黄芪和膜荚黄芪种子在肉眼和光学显微镜下观察无法对其进行鉴别,在电子显微镜下对比蒙古黄芪和膜荚黄芪种子的种脐、萌发孔和种皮特点,能够准确地对其进行鉴别。但是种子的形态特征和显微特征容易受到环境和种子成熟度等因素的影响,从而影响种源鉴定的准确性^[26]。特异性PCR鉴别技术作为传统鉴别方法的补充,是一种依靠遗传信息进行鉴定的方法,具有稳定性高、特异性好等特点。

随着分子鉴定技术的发展,黄芪分子鉴定的相关研究较多,崔占虎等^[27]利用内转录间隔区(ITS)序列对黄芪及其混伪品进行鉴定;刘亚令等^[28]利用ITS2对黄芪及混伪品进行鉴定。以上相关研究均是对黄芪及其混伪品的分子鉴定,但并未能对蒙古黄芪和膜荚黄芪进行鉴定。张利民等^[29]利用蒙古黄芪转录组序列中的简单重复序列(SSR)位点对蒙古黄芪和膜荚黄芪进行鉴定,但是该位点的特异性引物仅能对蒙古黄芪进行鉴定,当伪品混杂时无法对膜荚黄芪进行鉴别。且上述报道均是对黄芪及



注: A. 蒙古黄芪; M. Trans 2 000 bp DNA Maker; 1~27. 蒙古黄芪(G1~G27); 28~41. 膜荚黄芪(J1~J14); 42~44. 紫云英(Z1~Z3); 45~48. 沙苑子(B1~B4); 49~52. 望江南(W1~W4); 53~55. 斜茎黄芪(X1~X3); N. 空白对照。 B. 膜荚黄芪; M. Trans 2 000 bp DNA Maker; 1~14. 膜荚黄芪(J1~J14); 15~41. 蒙古黄芪(G1~G27); 42~44. 紫云英(Z1~Z3); 45~48. 沙苑子(B1~B4); 49~52. 望江南(W1~W4); 53~55. 斜茎黄芪(X1~X3); N. 空白对照

图7 蒙古黄芪、膜荚黄芪及种子混伪品鉴别方法适用性考察
Fig. 7 Applicability of identification methods for *Astragalus membranaceus* var. *mongholicu* seeds and *A. membranaceus* seeds and its adulterants

其混伪品药材或原植物的分子鉴定,未对种子进行鉴别,而黄芪种子作为繁殖材料,其基原对种源保护和保障至关重要。李军等^[8]利用传统形态鉴定方法结合DNA条形码技术,可以实现对黄芪种子及其混伪品种子种源的鉴定,但是该方法也未能对蒙古黄芪和膜荚黄芪种子进行鉴定。本研究分别设计了蒙古黄芪和膜荚黄芪特异性引物,蒙古黄芪种子可扩增出约220 bp的条带,膜荚黄芪种子扩增出约150 bp的条带,可以用于蒙古黄芪、膜荚黄芪及其种子混伪品的鉴别。

综上所述,本文根据蒙古黄芪、膜荚黄芪及混伪品的叶绿体基因组序列,结合DSS分子标记对蒙古黄芪、膜荚黄芪的SNP位点进行筛选,并根据该位点设计特异性引物对,建立蒙古黄芪、膜荚黄芪及其近缘种的特异性PCR鉴别方法,并对影响PCR方法的退火温度、循环次数、Taq酶种类、DNA模板浓度进行了考察,并对专属性和适用性进行考察,建立了蒙古黄芪和膜荚黄芪种子的特异性鉴别方法,为黄芪及近缘种的基源鉴别提供技术支持,可以准确鉴别出蒙古黄芪和膜荚黄芪。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2020:315.
- [2] 丁倩倩,陈威,辛佳芸,等. 黄芪抗肿瘤活性成分及其作用机制研究进展[J]. 中华中医药学刊,2023,doi:21.1546.R.20230421.1751.034.
- [3] 白舒琳,王振刚,黄健华,等. 中药黄芪防治糖尿病肾病的作用机制和研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报,2023,doi:21.1543.R.20230313.1341.002.
- [4] 杨雯迪,李伟,许博洋,等. 黄芪多糖治疗炎症性肠病作用机制研究进展[J]. 中西医结合研究,2023,15(1):55-58.
- [5] 王祯,张俊令,焦宏基,等. 黄芪有效成分的药理作用与质量控制研究进展[J]. 药物评价研究,2023,46(4):917-924.
- [6] 刘德旺,谷彩梅,杨庆珍,等. 内蒙古地区地道药材蒙古黄芪资源调查及产地适宜性[J]. 应用生态学报,2016,27(3):838-844.
- [7] 秦雪梅,李震宇,孙海峰,等. 我国黄芪药材资源现状与分析[J]. 中国中药杂志,2013,38(19):3234-3238.
- [8] 李军,张召雷,王晓敏,等. 应用种子形态及DNA条形码技术鉴定黄芪及混伪品种子[J]. 中草药,2022,53(24):7871-7879.
- [9] 郑司浩,尚兴朴,曾燕,等. 蒙古黄芪与膜荚黄芪特异性分子标记鉴别研究[J]. 中国现代中药,2019,21(3):307-311.
- [10] 郝玉慧. 黄芪前景分析及规模化机械化种植技术探索[J]. 中国农机监理,2022(10):27-29.
- [11] 张慧,张丽萍,周学刚,等. 蒙古黄芪和膜荚黄芪生长发育比较研究[J]. 中国中药杂志,2009,34(12):1591-1592.
- [12] 杨志城,杨羽君,鄂秀辉. 蒙古黄芪与膜荚黄芪差异性研究进展[J]. 中药材,2020,43(5):1261-1265.
- [13] 胡力,赵玉洋,袁媛,等. 地龙(参环毛蚓)配方颗粒的位点特异性PCR鉴别[J]. 中国实验方剂学杂志,

- 2022,28(17):119-126.
- [14] 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.
- [15] 赵玥,王光函,张颖,等. 基于 ITS2 序列的火绒草药材分子鉴定研究[J]. 沈阳药科大学学报, 2022, 39(12):1509-1514.
- [16] 何丽丹,赵开军,彭云,等. 拟黑多刺蚁药材 DNA 分子鉴定研究[J]. 药学学报, 2023, doi: 11. 2163. R. 20230508. 1058. 006.
- [17] 陆游,吴桂凡,罗轶,等. 位点特异性 PCR 鉴别两面针掺伪飞龙掌血的方法研究[J]. 中国医院药学杂志, 2023, 43(7):767-771.
- [18] 郑司浩,尚兴朴,曾燕,等. 蒙古黄芪与膜荚黄芪特异性分子标记鉴别研究[J]. 中国现代中药, 2019, 21(3):307-311.
- [19] 刘志浩,陈梓媛,李晓琳,等. 蒿属外来药用资源中亚苦蒿的特异性 PCR 鉴别[J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(17):127-132.
- [20] 陈梓媛,赵玉洋,谢旭桃,等. 多基原九里香药材的多重位点特异性 PCR 鉴别[J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(17):106-112.
- [21] 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.
- [22] 李慧,钱润,田娜,等. 红天麻、乌天麻及其杂交天麻的 PCR 鉴别[J]. 中国中药杂志, 2020, 45(15):3666-3671.
- [23] 刘亚男,华中一,赵玉洋,等. 基于 DSS 标记特异性 PCR 鉴别冷背药材木槿皮基原植物及其混伪品[J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(17):133-139.
- [24] HUA Z Y, JIANG C, SONG S H, et al. Accurate identification of taxon-specific molecular markers in plants based on DNA signature sequence[J]. Mol Ecol Resour, 2023, 23:106-117.
- [25] 王俊杰,张红霞,金雄. 蒙古黄芪与膜荚黄芪种子形态特征及其鉴别方法的研究[J]. 中草药, 2005, 36(7):1072-1075.
- [26] 肖娟. 不同生境白筋种子形态、品质特征和种子萌发特性的研究[J]. 中药材, 2014, 37(5):731-736.
- [27] 崔占虎,李越,袁庆军,等. 黄芪与其混伪品的 ITS 序列分子鉴定研究[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(24): 3773-3776.
- [28] 刘亚令,耿雅萍,王芳,等. 基于 ITS2 序列及二级结构对药用黄芪及混伪品的鉴别研究[J]. 药学学报, 2020, 55(3):522-529.
- [29] 张利民,贺润丽,韩毅丽,等. 膜荚黄芪和蒙古黄芪的 SSR 鉴定[J]. 中药材, 2018, 41(6):1293-1296.

[责任编辑 顾雪竹]