

聚合酶链式反应法在中药材和饮片鉴别中的相关问题探讨

鲍方名, 沈海英 (苏州市药品检验检测研究中心, 苏州 215104)

摘要 目的:为促进聚合酶链式反应法在中药材和饮片鉴别中的应用,提高检验质量提供参考。方法:梳理《中华人民共和国药典》收录的中药材和饮片鉴别聚合酶链式反应法在应用过程中发现的问题,从取样代表性、基因组提取、PCR扩增、标准物质和实验室布局等方面探讨聚合酶链式反应法的注意事项,并提出针对性的建议。结果与结论:应结合性状和其他鉴别提高取样的代表性;基因组提取时应注意排除污染,根据样品类型选择合适的提取方法并检验提取基因组质量;PCR扩增用引物设计和DNA聚合酶选择存在局限,使用合适的标准物质、注意实验室布局合理才能提高检验质量。

关键词:《中华人民共和国药典》; 中药材和饮片鉴别; 聚合酶链式反应

中图分类号: R95; R932 文献标识码: A 文章编号: 1002-7777(2022)07-0780-05
doi:10.16153/j.1002-7777.2022.07.006

Discussion on the Related Problems in the Identification of Chinese Medicinal Materials and Decoction Pieces by Polymerase Chain Reaction

Bao Fangming, Shen Haiying (Suzhou Institute for Drug Control, Suzhou 215104, China)

Abstract Objective: To promote the application of polymerase chain reaction method in the identification of Chinese herbal medicines and decoction pieces, and provide references for improving the quality of inspection. **Methods:** The problems found in the application of PCR method for identification of Chinese herbal medicines and decoction pieces included in *Chinese Pharmacopoeia* were reviewed, and the points for attention of PCR were discussed from sampling representativeness, genome extraction, PCR amplification, standard substances and laboratory layout, etc., and corresponding suggestions were put forward. **Results and Conclusion:** The representativeness of the sample should be improved by combining traits with other identifications. Contamination should be eliminated during genome extraction and appropriate extraction method should be selected according to the type of samples, and the quality of extracted genome should be checked. There are limitations in primer design and DNA polymerase selection for PCR amplification, and the use of appropriate reference standards and laboratory layout could improve the inspection quality.

Keywords: *Chinese Pharmacopoeia*; Chinese herbal medicines and decoction pieces identification; PCR

1 前言

我国是中药材的主产国,药用动植物达1万多种,对中药材的研究有几千年的历史,开创了中医这一独特门类。中药材和饮片是中医临床汤剂和中成药生产的原料,中药材和饮片的质量直接关系到临床用药的安全有效。中药材和饮片传统的鉴别方法包括显微鉴别、薄层色谱等,随着聚合酶链式反应(Polymerase Chain Reaction, PCR)用于中药材研究的深入,《中华人民共和国药典》(以下简称《中国药典》)2010年版一部^[1]蕲蛇、乌梢蛇中药饮片鉴别项收录了PCR法,《中国药典》2010年版第三增补本^[2]川贝母中药材鉴别项收录聚合酶链式反应-限制性片段长度多态性法(Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphisms, PCR-RFLP),《中国药典》2015年版第一增补本^[3]金钱白花蛇中药材鉴别项收录PCR法,《中国药典》2020年版一部^[4]霍山石斛中药材及中药饮片鉴别项收录PCR-RFLP法。为规范PCR法在药品检验领域的应用,《中国药典》2020年版四部^[5]新增通则1001聚合酶链式反应法,对PCR法操作的整个流程进行了基本规范。聚合酶链式反应法通则起草组发文介绍了起草说明,并对该检测技术在中药、生化药等应用前景进行展望^[6]。

苏州市药品检验检测研究中心于《中国药典》2010年版一部的蕲蛇、乌梢蛇中药饮片鉴别项收录PCR法时即开展了相关检验工作,并进行了蕲蛇^[7]、乌梢蛇^[8]和川贝母^[9]相关方法的研究;此外,在进口药材索尼娅石斛检验和中药材鹿血标准^[10]修订中也进一步应用。本文通过对PCR法概述,并开展对《中国药典》中药材和饮片鉴别PCR法中注意事项的分析与讨论,对于促进PCR法的应用、提高检验质量具有重要意义。

2 PCR法概述

PCR法是一种广泛用于快速产生模板脱氧核糖核酸(Deoxyribonucleic Acid, DNA)中部分目标DNA序列拷贝的方法,是基因检测的基础。在PCR法中,极少量的目标DNA序列的拷贝在一系列温度变化的循环中呈指数级扩增,当目标DNA序列拷贝数达到一定程度后方便进行后续的详细研究。PCR过程分为3个连续步骤:(1)变性,对双链DNA模板进行加热,使其解离;(2)退火,引物与目标

DNA的侧翼区域结合;(3)延伸,DNA聚合酶沿着模板链将引物3'端进行延伸。将上述步骤循环数十次,即可获得指数级的目标DNA拷贝。而引物和DNA聚合酶就是PCR过程中的关键试剂。引物是短的单链DNA片段,是目标DNA区域的互补序列。引物直接影响退火温度,引物长度、GC含量和其他特殊结构都会影响引物与目标DNA模板的结合能力。有很多类型的DNA聚合酶,其扩增能力和保真性各不相同。

控制外来污染和提高特异性是PCR法实践中的应用方向。首先,取样要有代表性,并提高模板DNA的浓度和纯度;其次,PCR试验条件的优化,例如引物设计、3个连续步骤的温度和时间控制、PCR反应试剂的浓度和品种选择等等,是提高目标DNA的产量和避免形成非特性产物的主要措施;第三,通过合理的实验室布局和流程设计可以控制污染发生。

3 PCR法应用于《中国药典》中药材和饮片鉴别的相关问题

3.1 取样的代表性

中药饮片乌梢蛇和蕲蛇由中药材去头鳞片并切段后制得,炮制后会丢失部分中药材的特征,加大了从性状和传统鉴别项目判别饮片的难度。然而,DNA不会因为外观的改变而改变,采用PCR法,正是考虑其具有灵敏度高特点,只要取样少量即可完成检验,是传统鉴别方法的有力补充。除了金钱白花蛇是完整的蛇,其他中药材和饮片都存在取样代表性的问题。有研究表明,针对PCR法,川贝母药材中掺伪的检出限为0.5%,掺伪5%可明显检出,将样品混合后按照四分法取样更能体现样品的整体情况^[11]。如果是蛇段或者霍山石斛片段,建议先进行性状和其他鉴别,挑拣出疑似片段取样进行PCR法鉴别。

3.2 基因组提取

3.2.1 排除污染

获得有代表性的取样后,按照《中国药典》2020年版四部^[5]通则1001PCR法规定,可采用适宜方式对供试品进行前处理,例如依次用75%乙醇水溶液、无菌水清洗擦拭表面以消除交叉污染或细菌污染。中药材的采收过程和饮片的炮制过程都有可能带入外源性DNA污染。例如川贝母2片鳞片中间和须根部位常常带有污泥,乌梢蛇、蕲蛇和金钱白

花蛇如果保存不当会有发霉的情况出现,在实际操作中直接用小刀将中药材和饮片表面污泥或杂菌刮除比较有效。污染除了来自于环境,还有可能是中药材的内生真菌。早期中国食品药品检定研究院提供的川贝母对照药材(批号121000-201108)和市售的川贝母中药材均在检验中发现有真菌污染引入的非目标PCR条带^[12]。

3.2.2 提取方法

为了获得合格质量的模板DNA用于PCR法检测,首先要粉碎供试品,然后要采取合适的方法来破碎细胞释放基因组DNA。中药材和饮片分动物源性和植物源性,由于供试品的物质组成和动植物细胞的组织成分存在差别,所以相应的处理方法也不尽相同。川贝母质地坚硬易于粉碎,实际操作可以使用全自动细胞破碎仪,可以高通量同时进行,提高检验效率。霍山石斛含有大量植物纤维,新鲜霍山石斛含水量大,使用全自动细胞破碎仪效果不佳,容易出现假阴性结果;实际操作中切成薄片后液氮研磨粉碎效果更好;而且石斛类含有的大量多糖、多酚等次生代谢产物,在基因组提取中很难与DNA分离,会影响基因组提取的产量和质量^[13]。在一些植物基因组提取试剂盒中会添加 β -巯基乙醇去除多酚的影响^[14]。乌梢蛇、蕲蛇和金钱白花蛇经过干燥之后比较坚硬,蛇骨和蛇皮即使使用液氮研磨也很困难,而且如果蛇的内脏处理不干净也会影响基因组的提出,宜多刮取蛇肉进行全自动细胞破碎仪粉碎。

3.2.3 基因组质量

为了保证PCR法的扩增结果有效,要求模板DNA的浓度和质量应满足核酸扩增的基本要求,原则上模板DNA浓度宜不低于 $10 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$,质量指标 A_{260}/A_{280} 宜在1.8~2.0,这2个指标都可以通过微量分光光度计进行测定。另外,也可以通过琼脂糖凝胶电泳来分辨模板DNA浓度和质量,如果DNA质量好、浓度高则出现清晰、高亮的单一模板DNA条带,如果DNA降解则表现为弥散条带,表明DNA质量不高且完整DNA浓度无法估计。

进行模板DNA的微量分光光度计测定和琼脂糖凝胶电泳只能从侧面反映基因组DNA的质量。从需要获得的目的DNA片段的角度来说,采用通用引物扩增获得DNA条带才能保证基因组DNA目的片段的完整性。通用引物一般是指某基因外围保守序列。虽然这个基因可能是序列多变的(例如同功酶),但两侧翼序列则是保守的,利用两侧翼保守序列可以设计出通用引物。《中国药典》收录的中药材川贝母的鉴别引物就可以认为是根据ITS基因设计的通用引物,正品可以被Sma I限制性内切酶切开,起到了特异性鉴别的作用。霍山石斛的鉴别引物是根据Tag基因设计的通用引物,伪品可以被Alu I限制性内切酶切开^[13]。而蕲蛇、乌梢蛇和金钱白花蛇是通过12Sr RNA中的Cytb基因设计的特异引物^[15-17],并不能通过电泳结果判断基因组的提取质量。

3.3 PCR扩增

引物是PCR扩增退火阶段的重要物质,直接关系到PCR反应的退火温度和相应的试验设计,会影响引物与目标DNA片段两翼序列的特异性结合。但是,从模板DNA中的保守性序列中寻找不同的碱基位点设计特异性引物存在局限。保守性序列同源性很高,不同物种之间只有个别碱基的区别。蕲蛇、乌梢蛇和金钱白花蛇的Cytb基因经过测序后会发现会与混伪品存在5~6个碱基不同,每个引物有2~3个碱基不同^[18-19]。引物不同碱基少,特异性就不强。非特异性结合就会导致非特异性产物的生成。而且从川贝母引物分析结果(见表1)可以发现,一对引物之间的退火温度差异较大,无法统一成1个温度点。所以《中国药典》中收录的PCR程序中扩增温度是55~58℃,没有明确是需要温度梯度PCR还是选择范围内1个温度点。如果最初进行了一个退火温度的PCR试验设计,结果是阴性,最好对温度梯度PCR进行复核。另外,引物自身还会有发夹结构和引物二聚体的产生,会降低PCR扩增的效率,也对PCR的操作提出了较高的要求。

表1 川贝母引物分析结果

长度 /bp	退火温度 /℃	GC/%	特殊结构
18	47.3	44.4	引物二聚体
25	64.0	44.0	引物二聚体、发夹结构

DNA聚合酶是PCR扩增延伸阶段的重要物质,其性能体现在扩增能力和保真性上。Taq DNA聚合酶扩增能力强,但是在PCR过程中每个循环的出错几率约为 2.2×10^{-5} 。《中国药典》中要求的高保真Taq DNA聚合酶是重组Taq DNA聚合酶,由于具有3'至5'核酸外切酶的活性而具有校读的功能,其保真性是市售普通Taq DNA聚合酶的3~5倍,而市场上Pfu DNA聚合酶的保真性是市售普通Taq DNA聚合酶的10倍。《中国药典》选择高保真Taq DNA聚合酶可以认为是扩增能力和保真性的平衡。

3.4 标准物质和实验室布局

在药品检验中,对照品是确定药品真伪优劣的对照,由国务院药品监督管理部门指定的单位制备、标定和供应。由于PCR方法灵敏度高,只要标准品混有少量的其他DNA都有可能影响最后的结果。例如川贝母在不同的生长期都有共生真菌存在^[20]。中药材川贝母为百合科植物川贝母、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^[1],并不是分类学上的一个单一的物种。中国食品药品检定研究院已经确定暗紫贝母作为川贝母PCR-RFLP法使用的标准物质。

《中国药典》2020年版四部新增通则1001 PCR法附注中提及分子生物学实验室在进行试剂配制和储存、前处理和模板制备、PCR扩增和产物分析等功能区域应参照《实验室质量控制规范-食品分子生物学检测》(GB/T 27403)^[21]予以分隔,或采取其他有效方式控制,每一区域都须有专用的仪器设备。为了避免发生交叉污染,进入各个工作区域必须严格遵循单一方向顺序^[22]。随着《中国药典》收录的PCR法的品种逐渐增多,如果在实验室布局、流程方面的设计不合理,很有可能产生交叉污染,引起假阳性结果。

4 结语

《中国药典》2020年版通则9107 DNA条形码鉴别的思路,是将可以体现进化演变的保守性序列的测序结果与数据库中已知序列进行比对达到鉴别的目的。因为PCR的高保真度扩增和PCR产物测序是专业性要求非常高的工作,为了方便使用,减少操作难度,才有了中药材和饮片鉴别PCR法。

综上所述,PCR法操作的各个环节都有可能对最终结果产生影响。从过程控制的角度而言,只有深刻理解每个步骤的注意事项,才能更好地提高检

验质量。《中国药典》中中药材和饮片鉴别PCR法还停留在定性阶段。在实际检测中,如果在伪品中掺入少量真品的源性成分,通过定性PCR就能够检测出来,造成样品的假阳性判断。通过实时PCR技术可以进行定量分析,通过与真品的实时PCR结果进行比较得出待测样品真伪的判断。有研究^[23]表明,利用DNA片段长度的不同和GC含量的不同,通过实时PCR对目标产物进行快速扩增,产物会形成不同的溶解曲线,达到快速鉴别真品与伪品的目的。建立标准曲线后,也可以分析正品中混淆品的掺入量。利用SYBR Green实时PCR的溶解曲线可以对掺假的肉类成分进行检测判断,检出下限可以达到0.1%^[24]。

传统鉴别方式(如形态学鉴别、显微鉴别、薄层分析和含量测定等)是中药材和饮片鉴别PCR法的前提和基础,合理地将多种鉴别方式有机结合能有效地减少中药材和饮片鉴别PCR法的工作量和提高鉴别质量。

参考文献:

- [1] 中华人民共和国药典:一部[S]. 2010.
- [2] 中华人民共和国药典:第三增补本[S]. 2014.
- [3] 中华人民共和国药典:第一增补本[S]. 2018.
- [4] 中华人民共和国药典:一部[S]. 2020.
- [5] 中华人民共和国药典:四部[S]. 2020.
- [6] 聚合酶链式反应法通则起草组.《中国药典》聚合酶链式反应法的建立[J]. 中国中药杂志, 2020, 45(19): 4537-4544.
- [7] 沈海英, 顾珉, 鲍方名, 等. PCR方法在蕲蛇中的鉴别应用[J]. 蛇志, 2013, 25(4): 369, 385.
- [8] 鲍方名, 沈海英. 掺假乌梢蛇的鉴别[J]. 海峡药学, 2015, 27(10): 21-23.
- [9] 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.
- [10] 江苏省食品药品监督管理局. 江苏省中药材标准[S]. 2016.
- [11] 张文娟, 刘薇, 魏峰, 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.
- [12] 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.
- [13] 胡冲, 张亚中, 袁媛, 等. 霍山石斛的 PCR-RFLP 鉴别研究[J]. 药物分析杂志, 2020, 40(12): 2109-2115.
- [14] 黄晓丹, 张云贵, 应铁进. 高质量植物基因组DNA的提取[J]. 植物生理学通讯, 2006, 42(2): 311-314.
- [15] Kocher TD, Thomas WK, Meyer A, et al. Dynamics of Mitochondrial Evolution in Animals: Amplification and Sequencing with Conserved Primers[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1989, 86: 6196.
- [16] 王义权, 周开亚, 徐璐珊, 等. 金钱白花蛇及其伪品的 Cytb基因片段序列分析和PCR鉴别研究[J]. 药学报, 1998, 33(12): 941-947.
- [17] 赵静雪, 崔光红, 辛敏通, 等. 金钱白花蛇快速 PCR鉴别方法的建立[J]. 药学报, 2010, 45(10): 1327.
- [18] 唐晓晶, 冯成强, 黄璐琦, 等. 高特异性PCR方法鉴别乌梢蛇及其混淆品[J]. 中国药学杂志, 2007, 42(5): 333-336.
- [19] 刘晓青. 市售蕲蛇样品的传统鉴定与分子生物学鉴定特征[J]. 西部中医药, 2014, 27(5): 16-18.
- [20] 严铸云, 张琦, 马云桐, 等. 不同生长期川贝母内生真菌的多样性[J]. 华西药理学杂志, 2008, 23(5): 521-523.
- [21] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. GB/T 27403 实验室质量控制规范-食品分子生物学检测[S]. 2008.
- [22] 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 卫办医政发[2010]194号 医疗机构临床基因扩增检验实验室管理办法[S]. 2010.
- [23] 周良云, 刘谈, 王升, 等. 实时荧光定量PCR研究进展及其在中药领域的应用[J]. 中国现代中药, 2016, 18(2): 246-251, 262.
- [24] 凌睿, 薛建丽, 杨军, 等. Real-Time PCR溶解曲线及Myostatin基因在肉类掺假快速鉴别中的应用[J]. 食品科技, 2013, 38(5): 318-322.

(收稿日期 2021年9月18日 编辑 郑丽娥)