

基于高分辨率熔解曲线技术鉴别酸枣仁及其混伪品理枣仁

杨宝, 李忠华, 董培智, 周瑞雪, 孙丽萍, 裴晓莎, 朴晋华* [山西省检验检测中心 (山西省标准计量技术研究院), 太原 030000]

摘要 目的: 采用高分辨率熔解曲线技术 (HRM) 快速鉴别酸枣仁与相关混伪品药材理枣仁及理枣仁杂合品种。方法: 采集了14份酸枣仁及10份市售混伪品理枣仁进行样品DNA提取, 通过ITS2序列使用NCBI的 Primer-Blast设计引物, 筛选引物浓度并对采集的样品进行检测分析。结果: 在引物浓度为 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的条件下, 向反应体系加入 $0.3 \mu\text{L}$ 引物时, 可获得优质的熔解曲线。应用该方法对14批酸枣仁及10批理枣仁均可进行HRM曲线分析鉴别, 并且通过该方法能够准确区分理枣仁及理枣仁杂合品种; 将理枣仁与理枣仁杂合品粉分别掺入酸枣仁样品中, HRM检测技术最低掺伪检测限为10%。结论: 基于HRM技术可实现酸枣仁与其常见混伪品理枣仁、理枣仁杂合品种的准确鉴别, 对市场药材的快速检测及质量评估有一定应用前景。

关键词: 高分辨率熔解曲线; 理枣仁; ITS2; 酸枣仁; 分子鉴定

中图分类号: R9 文献标识码: A 文章编号: 1002-7777(2022)11-1267-13

doi:10.16153/j.1002-7777.2022.11.009

Identification of *Ziziphi Spinosae* Semen and Its Adulterant *Ziziphi mauritiana* Semen Based on High Resolution Melting Analysis

Yang Bao, Li Zhonghua, Dong Peizhi, Zhou Ruixue, Sun Liping, Pei Xiaosha, Piao Jinhua* [Shanxi Inspection and Testing Center (Shanxi Institute of Standard Measurement Technology), Taiyuan 030000, China]

Abstract Objective: To quickly identify *Ziziphi Spinosae* Semen (ZSS) and its adulterant *Ziziphi Mauritiana* Semen (ZMS) and the hybrid varieties through high resolution melting curve technique (HRM). **Methods:** In this study, 14 samples of ZSS and 10 commercial ZMS were collected for DNA extraction. Primers were designed by Primer-Blast of NCBI according to ITS2 sequence to screen the primer concentration and then detect and analyze samples. **Results:** When the primer concentration was $10 \mu\text{mol/L}$, the high quality melting curve could be obtained by adding $0.3 \mu\text{L}$ primer to the reaction system. A total of 14 samples of ZSS and 10 ZMS could be analyzed and identified through HRM, and the ZMS and its hybrid varieties could be distinguished accurately by this method. When mixing the ZMS and hybrid powder of ZMS in the ZSS samples, the lowest detection limit for adulteration of HRM was 10%. **Conclusion:** HRM is able to accurately identify ZSS and common adulterant ZMS and its hybrid varieties, which is a promising way in rapid detection and quality evaluation of market medicinal materials.

Keywords: high resolution melting; *Ziziphi mauritiana* semen; ITS2; *Ziziphi spinosae* semen; molecular identification

酸枣仁 (*Ziziphi Spinosae* Semen, ZSS) 为鼠李科枣属植物酸枣 [*Ziziphus jujuba* Mill. var. *Spinosa* (Bunge) Hu ex H. F. Chou] 的干燥成熟种子, 具有养心补肝、宁心安神、敛汗和生津的功效^[1], 是国家卫生健康委员会 (原卫生部) 颁布的第一批药食同源品种之一, 广泛用于中成药及酸枣仁粉、酸枣仁汤等不同类型的养生饮品中^[2]。由于酸枣仁野生资源减少, 市场货源供不应求, 药材市场上出现以同属植物滇酸枣 (*Zizyphus mauritiana* Lam.) 的种子理枣仁 (*Ziziphi mauritiana* Semen, ZMS) 混作酸枣仁出售的情况^[3]。

理枣仁为同属植物种子, 其产量大, 且价格仅为酸枣仁价格的五分之一, 从性状上看与酸枣仁有极大的相似性; 炒制后的理枣仁在性状和表面颜色上与正品酸枣仁极相似, 更加难以区分, 被充当为酸枣仁的最主要的伪品。为方便消费者服用, 部分商家将市售酸枣仁以打粉的形式销售, 样品本身性状被破坏, 鉴别难度更大。酸枣仁与理枣仁在传统功效、化学成分和药理作用方面均存在差异^[4], 将理枣仁混充酸枣仁, 严重影响了临床用药的疗效和安全性。

针对酸枣仁及其混伪品的相关鉴定研究多有报道, 常用鉴定方法为性状鉴定、显微鉴定和理化鉴定^[5-13]等传统鉴定方法。性状鉴定和显微鉴定均需要长期从事中药鉴定工作的专家完成, 专业难度大, 不易掌握; 而中药材化学成分复杂, 理化鉴定方法专属性不强, 且容易受到外加因素的干扰。随着科学技术的不断发展, 分子生物鉴定技术在中药鉴定领域中得以应用, 如DNA条形码技术^[14-16], 该技术的精准鉴定主要依赖于PCR产物的测序, 若大宗中药材均采用测序检测, 一则检测周期长, 当样品扩增出现套峰时需要进行克隆测序鉴别真伪, 二则多数机构未配备测序仪, 委托第三方测序公司测序增加了结果的不确定性。已报道的检测方法还有PCR检测技术^[3], 该方法也存在局限性, 由于酸枣仁与理枣仁亲缘关系非常接近, 差异位点分散设计特异性引物的难度大, 特异性PCR方法对于杂合品无法准确鉴别。

高分辨率熔解曲线 (High Resolution Melting Analysis, HRM) 是一种基于双链DNA熔解温度不同而形成不同形态熔解曲线的基因分型技术。DNA序列长度不同, 排列差异均会造成熔解曲线峰 (Melting Curve Shapes) 及熔解温度 (Melting Temperature, T_m) 的差异^[17]。由于HRM技术操作简单, 结果容易判读, 通过单一碱基的改变也能产生不同熔解曲线, 同时能检测正、伪品及其混杂物, 近年来广泛应用于中药材的真伪鉴别^[18-22]。本研究把HRM技术引入酸枣仁及其伪品理枣仁物种鉴别, 为中药材真实性鉴别建立一种快速、稳定、测定混合样品的分子鉴别方法, 以区分酸枣仁及其混伪品药材。

1 材料与仪器

1.1 试验材料

酸枣仁样品14份, 理枣仁样品10份, 采集自全国8省18市, 均由大连市检验检测认证技术服务中心朱殿龙副主任药师鉴定, 样品信息如表1。

1.2 仪器

梅特勒204万分之一分析天平 (瑞士Mettler公司), Milli-Q纯水仪 (德国Millipore公司), MM400球磨仪 (德国Retsch公司), BIORAD C1000 TOUCH PCR仪 (美国BIORAD公司), 香港力康Neofuge 13R高速冷冻离心机 (香港力康公司), 微量核酸分析仪 (德国Eppendorf公司), Power Pac Basic电泳仪 (美国BIORAD公司), GelDoc XR+全自动凝胶成像系统 (美国Biorad公司), MyGo Pro实时荧光定量PCR仪 (英国IT-IS公司)。

1.3 试剂

Takara minibest基因组核酸提取试剂盒 (货号9765, 大连宝日生物科技有限公司), PreMix Taq™缓冲液 (货号RR902A, 大连宝日生物科技有限公司), Type-it HRM PCR Kit (400) (货号206544, 德国Qiagen公司), GelRed (货号41003, 美国Biotium公司), 琼脂糖 (西班牙Biowest公司)。本试验使用的引物均由苏州金唯智科技有限公司合成。

表1 样品信息

样品名称	样品编号	产地	测序NCBI*查询结果
酸枣仁	ZS-01	河北省石家庄赞皇县	酸枣
酸枣仁	ZS-02	山西省太原市	酸枣
理枣仁	ZM-01	山西省太原市	滇刺枣
理枣仁	ZM-02	云南省昆明市	滇刺枣
理枣仁	ZM-03	山东省泰安市	滇刺枣
理枣仁	HZ-01	山西省吕梁市	测序套峰怀疑为杂合
酸枣仁	ZS-03	山东省泰安市	酸枣
酸枣仁	ZS-04	河北省邢台市	酸枣
理枣仁	HZ-02	河北省保定安国市	测序套峰怀疑为杂合
理枣仁	ZM-04	山东省济宁市	滇刺枣
酸枣仁	ZS-05	山东省济宁市	酸枣
酸枣仁	ZS-06	陕西省汉中市	酸枣
酸枣仁	ZS-07	山西省吕梁市	酸枣
理枣仁	HZ-03	广西省玉林市	测序套峰怀疑为杂合
酸枣	ZS-08	山东省临沂市	酸枣
酸枣	ZS-09	陕西省榆林市	酸枣
理枣仁	HZ-04	辽宁省大连市检验检测认证技术服务中心	测序套峰怀疑为杂合
理枣仁	HZ-05	辽宁省大连市检验检测认证技术服务中心	测序套峰怀疑为杂合
理枣仁	HZ-06	安徽省亳州市	测序套峰怀疑为杂合
酸枣仁	ZS-10	辽宁省大连市检验检测认证技术服务中心	酸枣
酸枣仁	ZS-11	安徽省亳州市	酸枣
酸枣	ZS-12	河南省新乡市	酸枣
酸枣	ZS-13	河北省邢台市	酸枣
酸枣	ZS-14	山东省济南市莱芜区	酸枣

注：*美国国家生物技术信息中心（National Center for Biotechnology Information, NCBI）。

2 方法

2.1 总DNA提取及方法

取单个样品,采用75%酒精擦拭表面进行消毒,晾干后,用球磨仪粉碎,加入核酸提取试剂盒中的裂解液和蛋白酶K,裂解时间2~4 h,按照基因组核酸提取试剂盒方法进行DNA提取。

2.2 ITS2引物PCR扩增检测测序

将样品DNA用ITS2通用引物进行PCR扩增,反应体系20 μ L如表2所示。PCR反应条件:94 $^{\circ}$ C预变性5 min,94 $^{\circ}$ C变性30 s,56 $^{\circ}$ C退火30 s,72 $^{\circ}$ C延伸45 s,40个循环,72 $^{\circ}$ C延伸5 min,12 $^{\circ}$ C保存。进行琼脂糖凝胶检测,观察是否能够产生扩增条带,将扩增成功的样品送上海生工生物工程有限公司进行测序,测序结果与NCBI数据库进行对比,结果如表1所示。

表2 ITS2反应体系

试剂	体积/ μ L
PCR Mix	10
上、下游引物(浓度10 μ mol \cdot L $^{-1}$)	各0.25
模板	1
ddH ₂ O	8.5

2.3 引物的设计

将测序出的全部序列进行比对,找出一段无变异现象的区段,围绕该区段使用NCBI的Primer-Blast设计出酸枣仁和理枣仁的通用引物序列,进行HRM检测,上游引物为GCCGCAGCAATCGGTGG,下游引物为CTGGGGTCGCGTTGGAG。

2.4 HRM试验

HRM PCR反应体系如表3,HRM PCR反应条件:95 $^{\circ}$ C预变性5 min,95 $^{\circ}$ C变性10 s,60 $^{\circ}$ C退火15 s,72 $^{\circ}$ C延伸17 s,循环45次;HRM:95 $^{\circ}$ C 10 s,40 $^{\circ}$ C 10 s,65~95 $^{\circ}$ C 0.05 $^{\circ}$ C/s升温。

表3 HRM反应体系

试剂	体积/ μ L
2 \times HRM PCR Master Mix	5.0
上、下游引物(浓度10 μ mol \cdot L $^{-1}$)	各0.3
模板	0.3
ddH ₂ O	4.1

2.5 引物浓度筛选

在10 μ L反应体系中分别加入0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 μ L引物(母液浓度为10 μ mol \cdot L $^{-1}$),获得其熔解曲线,分析不同引物浓度对酸枣仁熔解曲线、峰形的影响,最终确定本试验适宜的引物浓度。

2.6 样品HRM检测

将采集的样品DNA模板进行HRM检测,对所得熔解曲线、峰形结果进行分析,通过采集不同产地样品进行试验以验证HRM检测方法对酸枣仁真伪鉴别的有效性。

2.7 混合样本检测

根据市场调查,以获利为目的掺伪通常在10%以上,在酸枣仁样品中分别掺入10%、30%、50%、70%的伪品理枣仁,对上述样品充分混匀,对样品进行提取,分析掺入伪品理枣仁后与含量为100%酸枣仁熔解曲线峰形的差异,确定样品是否掺入了伪品理枣仁,以验证本试验检测方法是否能够用于掺入伪品样品的检测。

2.8 数据处理

采用MyGo-Pro-3.5.21软件对试验数据进行处理分析。

3 结果与分析

3.1 样品测序结果分析

基于ITS2序列的测序结果,14批酸枣仁样品测序结果采用NCBI BLAST进行比对,99%以上与酸枣仁一致,查询结果与性状鉴别结果一致。10批理枣仁测序结果,其中6批测序结果出现了套峰的情况,其余4批测序结果采用NCBI BLAST进行比对,与滇刺枣植物一致率达到99%以上,测序结果与性状鉴别结果一致。其中6批理枣仁样品在ITS2片段测序出现测序套峰的现象,本试验样本DNA提取均采用单个样品种子,出现套峰现象有两种可能:或为真菌污染种子,或为样品出现了多种单倍型杂合现象。为避免由于提取过程和测序公司一代测序对测序结果产生影响,笔者先对该6批次测序双峰样品进行重新提取,并重新选择上海融享生物科技有限公司和苏州金唯智生物科技有限公司测序,得出测序与第一次测序结果一致。为确定产生双峰原因,笔者又将10份理枣仁样品DNA混合后采用ITS2引物扩增,进行扩增高通量测序,测序结果如表4所示,以序列一致率达到99%以上为一个OTU

(Operational Taxonomic Unit), 所得测序结果与滇刺枣ITS2片段有高度的同源性, 并未发现真菌ITS2扩增片段。剔除低质量测序结果共计获得53005条Reads, OTU丰度达到100以上的共有21个, OTU合

计52614条Reads, 从测序结果看扩增结果中至少存在21种单倍型, 超过了样本批次数量, 出现套峰的样本本身可能存在不同单倍型的混合现象。

表4 理枣仁扩增子高通量测序结果

OTU*	数量	NCBI BLAST 查询结果
OTU5	12598	<i>Ziziphus mauritiana</i>
OTU6	9755	<i>Ziziphus mauritiana</i>
OTU1	6972	<i>Ziziphus mauritiana</i>
OTU2	6528	<i>Ziziphus mauritiana</i>
OTU44	1977	<i>Ziziphus mauritiana</i>
OTU3	1934	<i>Ziziphus mauritiana</i>
OTU4	1884	<i>Ziziphus mauritiana</i>
OTU7	1739	<i>Ziziphus mauritiana</i>
OTU8	1619	<i>Ziziphus mauritiana</i>
OTU11	1470	<i>Ziziphus mauritiana</i>
OTU14	1115	<i>Ziziphus mauritiana</i>
OTU12	976	<i>Ziziphus spina-christi</i>
OTU29	855	<i>Ziziphus mauritiana</i>
OTU30	729	<i>Ziziphus mauritiana</i>
OTU15	696	<i>Ziziphus spina-christi</i>
OTU9	393	<i>Ziziphus mauritiana</i>
OTU10	364	<i>Ziziphus mauritiana</i>
OTU33	345	<i>Ziziphus mauritiana</i>
OTU32	284	<i>Ziziphus mauritiana</i>
OTU48	181	<i>Ziziphus mauritiana</i>
OTU38	103	<i>Ziziphus spina-christi</i>
Other	488	<i>Ziziphus mauritiana</i>

注: *OTU 后的数字代表一致率达到 99% 以上一个分类单元。

3.2 HRM检测方法最适反应体系建立

在10 μL反应体系中分别加入0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 μL引物(母液浓度为10 μmol · L⁻¹), 分析不同的引物浓度对酸枣仁熔解曲线和T_m

的影响, 结果如图1所示, 当加入0.3 μL (10 μmol · L⁻¹) 引物时酸枣仁模板DNA获得更加稳定优质的熔解曲线, 该引物浓度可用于酸枣仁及其混伪品理枣仁的鉴别。

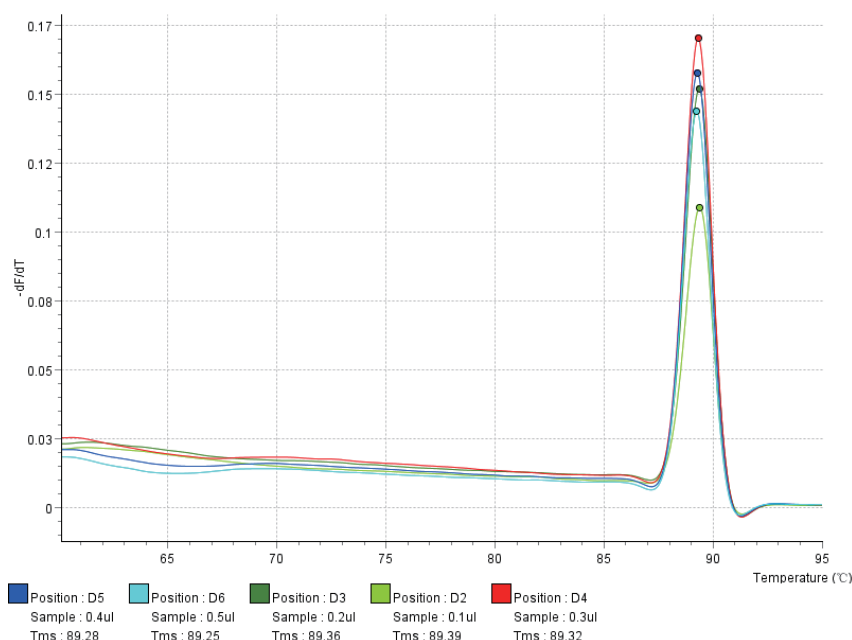


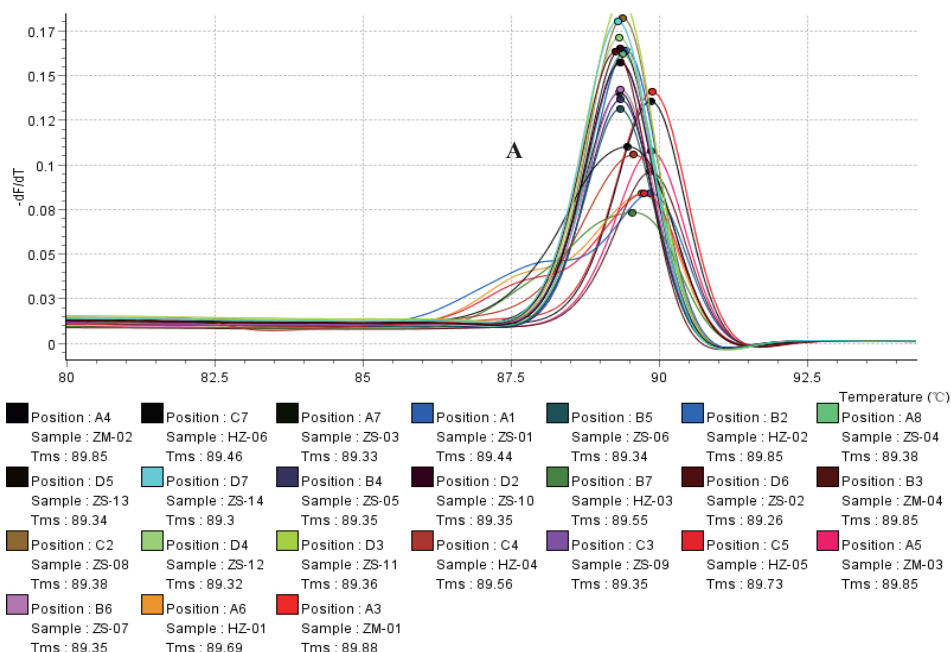
图1 不同引物浓度对HRM溶解曲线的影响

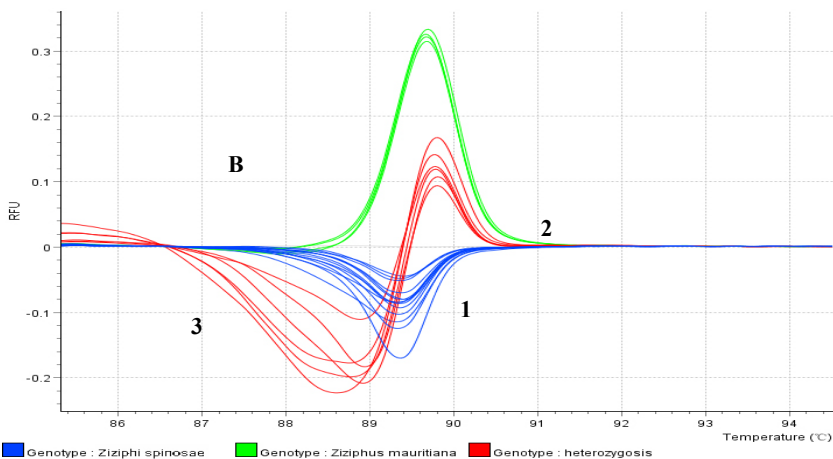
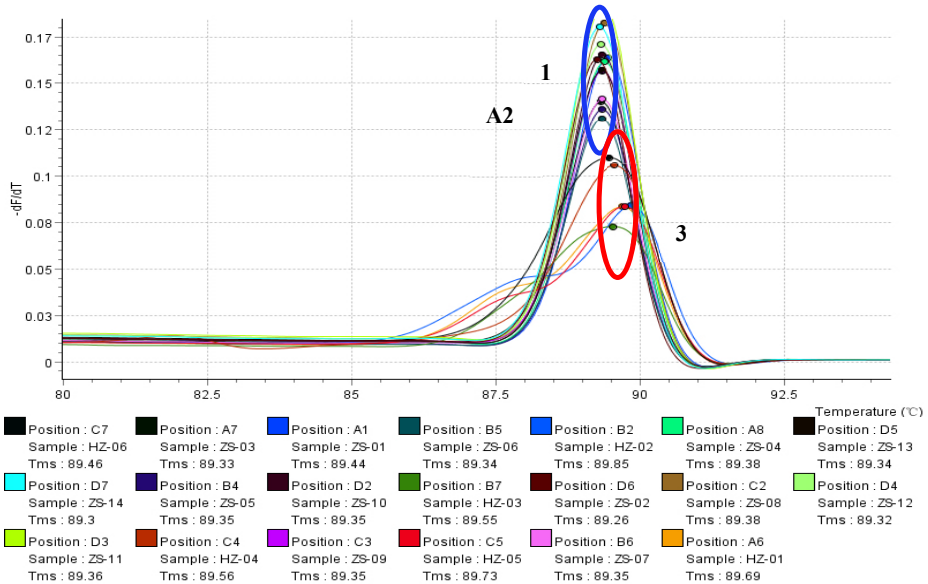
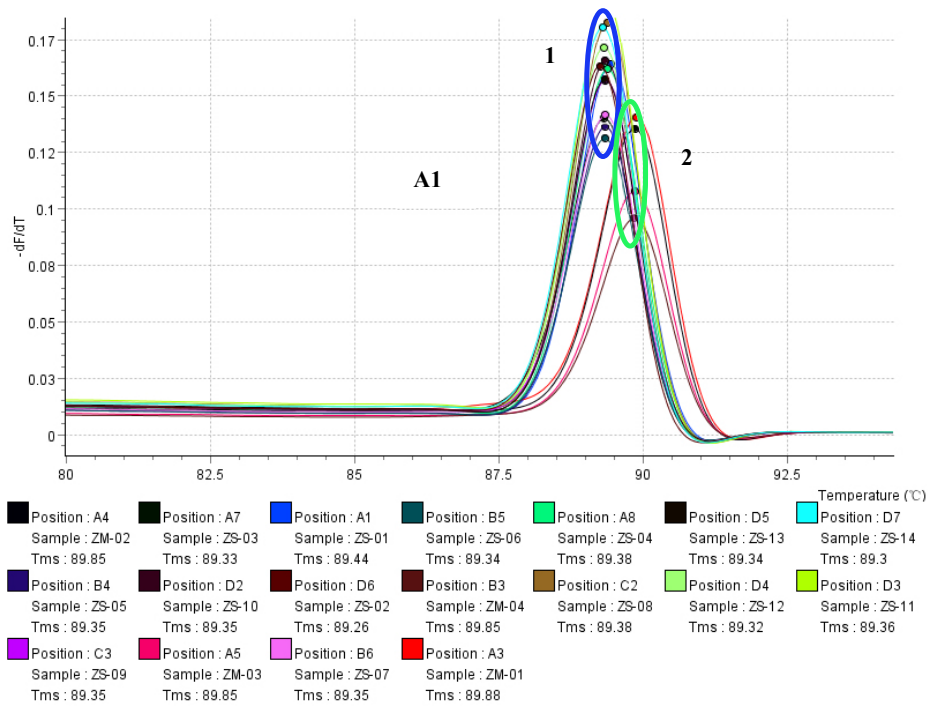
3.3 样品HRM检测结果

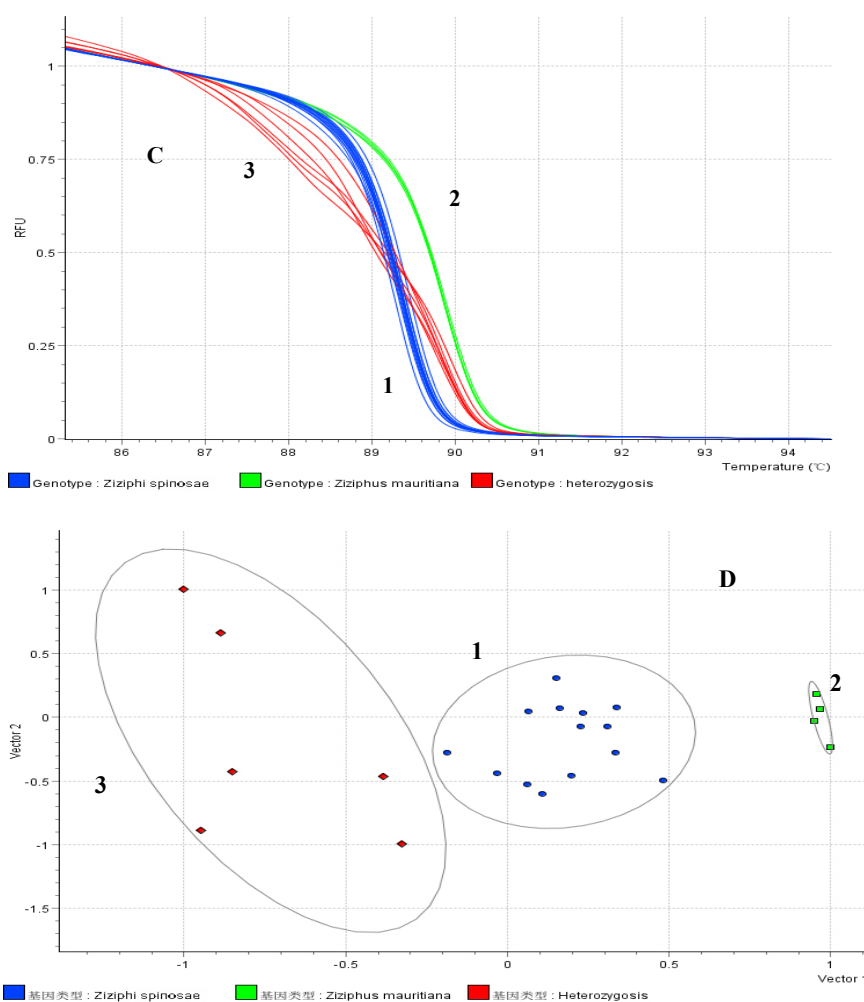
使用引物对酸枣仁和理枣仁进行HRM试验, 试验结果如图2所示, 酸枣仁样品峰值在 $(89.35 \pm 0.04)^\circ\text{C}$, 理枣仁测序无双峰样品峰值在 $(89.86 \pm 0.01)^\circ\text{C}$, 同类样品内部间溶解峰、归一化曲线、差异化溶解曲线, 以及聚类的一致程度很高, 说明本试验选定的扩增片段未出现变异位点, 具有高度保守性, 因此, HRM方法对市售酸枣仁样品和理枣仁样品的检测具有良好的重复性。理枣仁杂合品峰值在 $(89.64 \pm 0.13)^\circ\text{C}$, 同类样品之间

峰值存在差异, 不能合并在一起, 但从归一化曲线、差异化溶解曲线和聚类结果看仍存在一定的相似性。

从A1、A2、B、C、D图可以看出, 酸枣仁与理枣仁样品、杂合品几类样品相互间的溶解峰值、归一化溶解曲线、差异化溶解曲线及聚类结果均存在差异, HRM检测方法可以有效区分酸枣仁及其常见伪品理枣仁。HRM技术鉴定酸枣仁及其常见伪品的方法适用于大批量样品的初步快速筛选, 为药材基原的鉴定提供初步判定的依据。







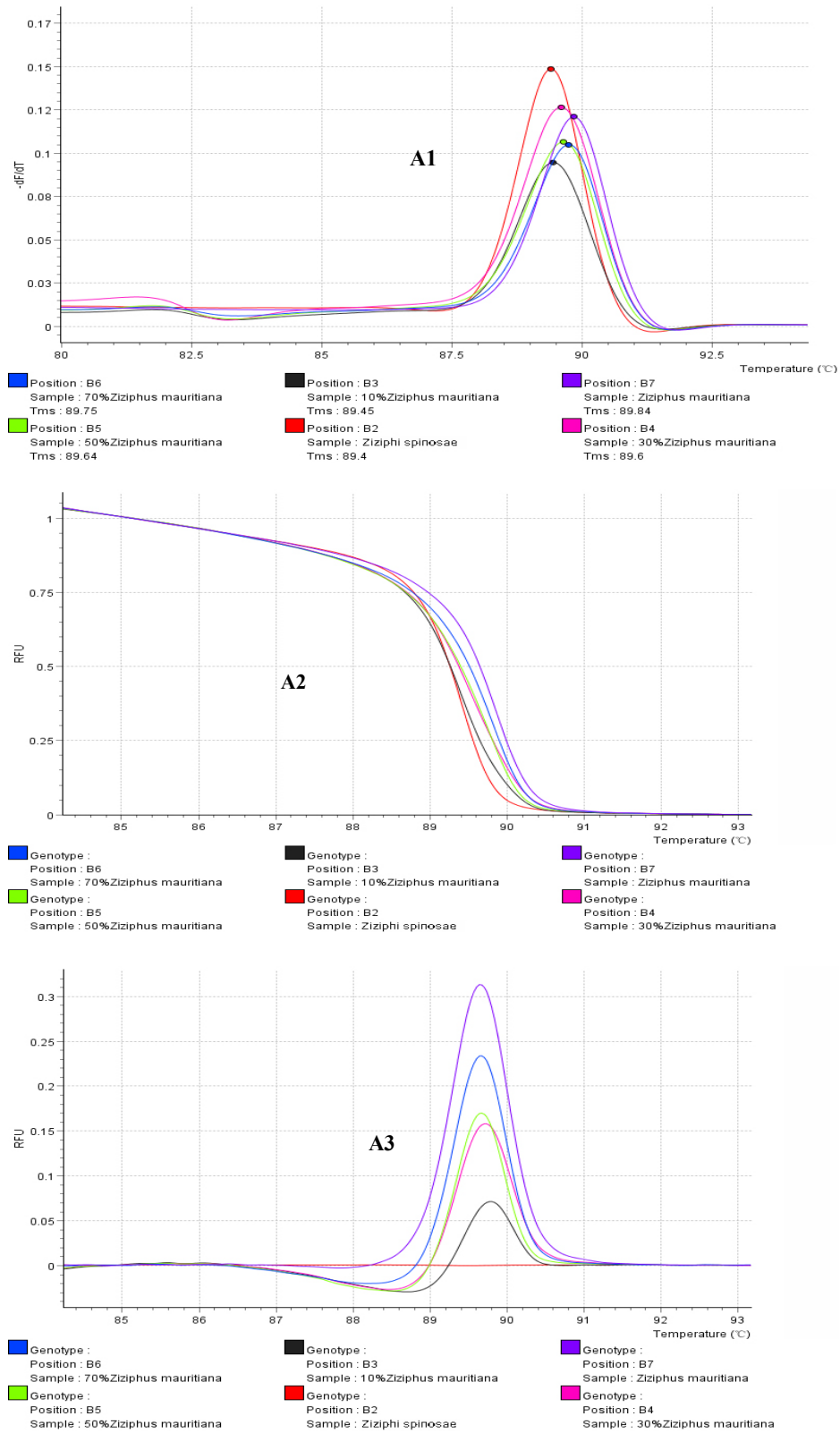
A.酸枣仁与理枣仁总体的溶解峰图；A1.酸枣仁样品与理枣仁样品溶解峰图；A2.酸枣仁与理枣仁杂合品溶解峰图；B.酸枣仁与理枣仁测序双峰样品和理枣仁测序无双峰样品差异化溶解曲线；C.酸枣仁与理枣仁测序双峰样品和理枣仁测序无双峰样品归一化溶解曲线；D.酸枣仁与理枣仁测序双峰样品和理枣仁测序无双峰样品聚类结果；1.酸枣仁（*Ziziphi spinosae* Semen）蓝色线；2.理枣仁（*Zizyphus mauritiana* Semen）绿色线；3.理枣仁杂合品（Heterozygosis）红色线。

图2 酸枣仁及理枣仁样品 HRM 试验结果

3.4 样品掺入模拟试验

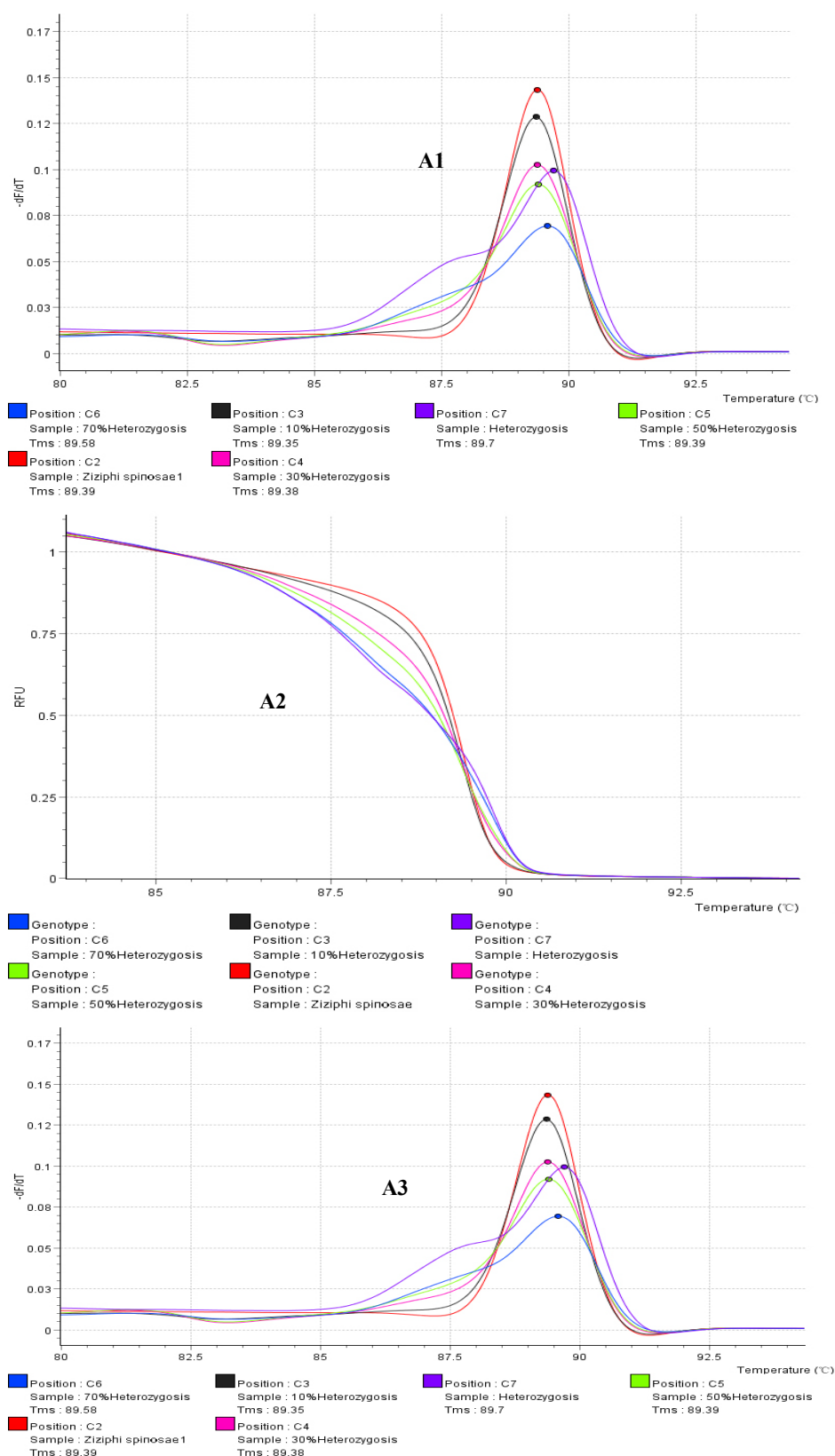
在样品ZS-08中掺入伪品ZM-02，掺伪比例分别为0%、10%、30%、50%、70%、100%，进行DNA提取，取上述样品DNA模板，进行HRM检测。如图3，从A1、A2、A3所示酸枣仁掺伪比例按照上述浓度掺伪后，溶解峰值随着掺伪比例的增大而升高，ZM-02样品DNA掺入比例在10%时虽然峰值较为接近，但差异大于标准差，且归一化曲线、差异化溶解曲线存在差异，因此，样品中掺入10%伪品能够被检出，最低检测限可达10%。

在样品ZS-08中掺入理枣仁杂合品HZ-01，掺伪比例分别为0%、10%、30%、50%、70%、100%，进行DNA提取，取上述样品DNA模板，进行HRM试验，如图4，从A1、A2、A3所示酸枣仁掺伪比例按照上述浓度掺伪后，溶解峰值随着掺伪比例的增大而升高，HZ-01样品掺入比例在10%以下时峰值变化不明显，但归一化曲线、差异化溶解曲线仍存在差异，综合全部试验结果表明，样品中掺入10%伪品能够被检出，最低检测限可达10%。



A1. HRM 熔解峰; A2. HRM 的归一化曲线; A3. HRM 检测的差异化曲线。

图 3 酸枣仁掺入理枣仁样品 HRM 曲线分析结果



A1. HRM 熔解峰; A2. HRM 的归一化曲线; A3. HRM 检测的差异化曲线。

图4 酸枣仁掺入理枣仁杂合样品 HRM 曲线分析结果

4 讨论

笔者前期试验使用了德国Qiagen公司、瑞士罗氏公司、美国Biotium公司三家的HRM检测试剂，瑞士罗氏采用的是LC Green染料，德国Qiagen公司、美国Biotium公司采用Eva Green染料，从试验结果看，不同品牌试剂溶解峰值存在差异，从溶解峰值、归一化溶解曲线、差异化溶解曲线看德国Qiagen公司试验结果稳定性最好，最终本试验选择了德国Qiagen生物公司试剂。本试验所用仪器为IT-IS公司实时荧光PCR仪，因不同厂家PCR仪使用的激发光源不同，使用不同仪器得出的试验结果溶解峰值、归一化溶解曲线、差异化溶解曲线不完全相同，但同一仪器使用已验证的Qiagen扩增试剂进行试验，三类样品的试验结果均会获得很好的区分度，能够达到区分三者的试验目的。为便于该试验技术的推广，下一步笔者也将会对不同品牌的仪器进行比较，选择试验结果更稳定的仪器。

本研究以酸枣仁及其常见混伪品理枣仁为研究对象，采用HRM检测技术进行研究。HRM技术具有灵敏度高、检测速度快的优势，理论上可实现单个碱基的差异分析^[23-25]。理枣仁样品在ITS2片段测序，首次测序6批次样品出现套峰的现象，为避免提取过程和测序过程产生误差，笔者重新提取了样品的DNA，委托上海生工生物技术有限公司、上海融享生物技术有限公司和苏州金唯智生物技术有限公司测序，3家公司测序结果均出现了测序双峰的现象。为确定产生双峰原因，笔者又采用扩增子二代高通量测序技术测序，试验结果显示丰度超过100的测序结果共出现了21个OTU，所有单倍型均为理枣仁近源物种，未发现真菌DNA片段污染。测序所得单倍型数量远大于样品的数量，说明样品本身存在多种单倍型基因混合的情况，通过查阅资料发现，滇刺枣植物具有蜜盘，因其为虫媒授粉，可以经过反复多次天然杂交出现多种杂交品种^[3,26]，进一步佐证了理枣仁样品存在杂合品种的现象。杂合品种中存在多种基因型，因此出现了杂合品种与理枣仁本源植物的HRM试验峰形、归一化曲线、差异化曲线明显的差异。滇刺枣植物为无目的性的自然杂交，不同来源的样品杂合程度也会不同，因此也出现了自身峰形、归一化曲线、差异化曲线的差异。

随着野生中药资源的大量采挖，越来越多

品种的中药材无法满足日益增长的市场需求，杂交技术广泛应用于农产品生产，也将大量应用于中药材栽培领域，杂合品种在增加了一些优良的抗逆性基因、提高产量基因的同时，是否对药材质量会有影响，也是今后应当关注的问题。目前理枣仁已被云南省中药饮片标准收录^[27]，国内部分省份对理枣仁的使用没有明确规定，本文提到理枣仁杂合品种为自然无目的的自然杂交，与有目的性的杂交存在差异，是否会引入有害代谢产物合成基因尚未可知，药材质量难以控制，若杂合品种流入市场可能影响用药安全性，因此需要建立能够区分理枣仁及其杂合品种的检测方法。HRM技术已报道可以用于物种纯合子和杂合子的区分，郭鑫等^[28]应用HRM检测技术对鹿茸伪品及杂交鹿茸进行了鉴定，兰青阔等^[29]应用HRM检测技术鉴定黄瓜杂交品种，鲁振华等^[30]应用HRM检测技术鉴定桃温度敏感半矮生型单株。HRM试验结果显示酸枣仁与理枣仁、理枣仁杂合品不同品种样品间峰形、归一化曲线、差异化曲线存在差异，该方法可以有效区分酸枣仁与理枣仁、理枣仁杂合品。

基于ITS2序列设计引物进行HRM试验，其结果显示同类样品内部间溶解峰、归一化曲线、差异化溶解曲线及聚类的一致程度很高，说明本试验选定的扩增片段未出现变异位点，具有高度保守性，HRM检测方法针对市售14批酸枣仁样品和10批理枣仁样品检测具有较好的重复性。理枣仁杂合品同类样品之间峰值存在差异，不能合并在一起，但从归一化曲线、差异化溶解曲线、聚类结果看，仍存在一定的相似性。普通PCR或实时荧光PCR检测方法成本较低，但难以鉴别亲源关系较近的物种，本试验所采用的HRM检测方法在市场常见掺伪比例即掺伪比例为10%时进行检测，无论掺入理枣仁，还是掺入理枣仁杂合品种，均能够检测出来，试验结果对评估酸枣仁药材是否掺伪及掺伪比例具有应用价值。很多植物类中药材亲源关系非常接近，如贝母类、石斛类等品种的中药材，不同种间特征列同源性甚至达到了98%以上；有部分中药材植物本身为异花授粉，容易产生杂交品种，这两类情况采用传统的分子生物学检测方法无法鉴别，HRM检测方法最初的开发目的即为了解决亲源关系接近的物种和杂交品种鉴别难的问题。本文建立了酸枣

仁的HRM技术鉴别方法,该技术可灵敏、高效、快速地将酸枣仁及其伪品区分开来,也可用于新出现的药材杂交品种的鉴别。HRM检测方法在中药检测方面有很高的应用前景。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[S]. 2020: 382.
- [2] 张雅琴, 冯红, 马孝熙, 等. 酸枣仁的DNA条形码鉴定研究[J]. 中药材, 2017, 40(1): 46-49.
- [3] 李桂林, 宋雅迪, 吕振晖, 等. 基于ITS序列位点特异性PCR的酸枣仁及其混伪品的鉴别[J]. 中国现代中药, 2016, 18(12): 1566-1570.
- [4] 闫艳, 申晨曦, 张福生, 等. 酸枣仁与理枣仁的研究进展及标志物预测分析[J]. 中草药, 2019, 50(19): 4769-4784.
- [5] 孙柳源. 酸枣仁的两种混伪品[J]. 浙江中医学院学报, 2000(3): 73.
- [6] 梅华, 毕飞霞, 张荣. 酸枣仁、理枣仁、枳椇子三者之间性状、显微的区别[J]. 时珍国医国药, 1996(3): 1.
- [7] 兴宇清, 秦伟华, 李学彬, 等. 酸枣仁及其混淆品滇刺枣仁的鉴别[J]. 时珍国医国药, 2001, 12(12): 1100.
- [8] 陈振德, 许重远, 谢立. 酸枣仁及其混淆品蛋白质高效毛细管电泳法鉴别[J]. 中国药学杂志, 2001, 36(9): 625-626.
- [9] 吴建方. 酸枣仁及其混淆品理枣仁的鉴别[J]. 中国实用医药, 2008, 3(31): 155-156.
- [10] 帅智翠, 岳林峰, 张惠珍, 等. 酸枣仁滇刺枣和枳椇子光谱鉴别[J]. 时珍国医国药, 1999, 10(8): 594-595.
- [11] 刘文泉, 谭亚非, 赵庆忠, 等. 酸枣仁及其混淆品滇刺枣仁的鉴别[J]. 中医药学刊, 2005, 23(12): 2281.
- [12] 张淑华, 李连环, 刘振通, 等. 几种易混种子类中药的扫描电镜鉴别[J]. 中草药, 1995, 26(8): 427-429.
- [13] 李彦文, 周凤琴, 王丽萍, 等. 酸枣仁与其伪品滇刺枣仁的FTIR指纹图谱鉴别[J]. 中医药学刊, 2005, 23(4): 713-715.
- [14] 刘萍, 古今, 周文斌, 等. 酸枣仁与其混淆品及伪品的RAPD分析[J]. 解放军药学报, 2006, 22(1): 67-70.
- [15] 任莉, 陈新连, 石林春, 等. 应用DNA条形码技术鉴定中药材酸枣仁[J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2016, 18(1): 35-39.
- [16] 张雅琴, 冯红, 马孝熙, 等. 酸枣仁的DNA条形码鉴定研究[J]. 中药材, 2017, 40(1): 46-49.
- [17] 丁雯, 李泽, 杜晨晖, 等. 酸枣仁ISSR-PCR反应体系优化及引物筛选[J]. 分子植物育种, 2020, 18(23): 7834-7839.
- [18] 张雪雁, 袁媛, 胡启跳, 等. 龟甲的特异性PCR及高分辨率熔解曲线技术鉴别方法研究[J]. 中国现代中药, 2019, 21(9): 1215-1220.
- [19] 陈康, 蒋超, 金艳, 等. 人参属中药材高分辨率熔解曲线鉴定及其方法学考察[J]. 药物分析杂志, 2017, 37(1): 64-73.
- [20] 苏燕燕, 丁丹丹, 马婷玉, 等. 蛤蚧及其混伪品基于12S rRNA序列的Bar-HRM鉴定研究[J]. 中国现代中药, 2019, 21(9): 1197-1205.
- [21] 陈康, 蒋超, 袁媛, 等. 基于熔解曲线分析技术的鹿茸药材分子鉴别[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(4): 619-623.
- [22] 吴雅琼, 辛月, 王建文, 等. 基于高分辨率熔解曲线的银杏SNP分型方法构建[J]. 分子植物育种, 2019, 17(15): 5066-5073.
- [23] Wittwer C T. High-resolution DNA Melting Analysis: Advancements and Limitations[J]. Humman Mutation, 2009, 30(6): 857-859.
- [24] Jilberto F, Araneda C, Angelica Larrain M. High Resolution Melting Analysis for Identification of Commercially-important Mytilus Species[J]. Food Chemistry, 2017, 229(AUG.15): 716-720.
- [25] Ren X, Fu Y, Xu C, et al. High Resolution Melting (HRM) Analysis as a New Tool for Rapid Identification of Salmonella Enterica Serovar Gallinarum Biovars Pullorum and Gallinarum[J]. PoultrySci, 2016, 96(5): 1088-1093.
- [26] 顾林. 理枣仁与酸枣仁的生药、化学、药理比较[J]. 求医问药(下半月), 2011, 9(2): 82-83.
- [27] 云南省食品药品监督管理局. 云南省中药饮片标准: 一部[S]. 2005: 77-78.
- [28] 郭鑫, 张旭, 任晓航, 等. HRM技术在梅花鹿茸及其混伪品药材鉴定中的应用[J]. 时珍国医国药, 2019, 30(5): 1140-1143.

- [29] 兰青阔, 张桂华, 王永, 等. 基于高分辨率熔解曲线技术快速筛选黄瓜SNP[J]. 分子植物育种, 2011, 9(5): 642-647.
- [30] 鲁振华, 牛良, 张南南, 等. 基于HRM获得与桃Tssd紧密连锁的SNP标记[J]. 中国农业科学, 2017, 50(8): 1505-1513.

(收稿日期 2021年10月14日 编辑 邹宇玲)