

三七染料法实时荧光聚合酶链式反应鉴别方法的建立

张 芹^{1,2}, 季 超³, 汪星宇^{1,2}, 李 娟^{1,2}, 伍志强^{1,2}, 郭俊利^{1,2},
马 荣^{1,2}, 郑文杰^{1,2,4*}, 曹际娟^{5*}

(1. 天津师范大学, 生命科学学院, 天津 300387; 2. 天津师范大学, 天津市动物多样性保护与利用重点实验室, 天津 300387; 3. 云南农业大学, 云南生物资源保护与利用国家重点实验室, 昆明 650201; 4. 西南林业大学, 云南省郑文杰专家工作站, 昆明 650224; 5. 大连民族大学, 生物技术与资源利用教育部重点实验室, 大连 116000)

摘 要: **目的** 采用 TB Green 染料法实时荧光聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)技术, 基于叶绿体基因 *psbA-trnH* 序列建立鉴别三七的实时荧光 PCR 方法。**方法** 通过比较三七及其同属的人参、西洋参和竹节参的 *psbA-trnH* 序列, 设计出一对三七特异性引物, 优化退火温度, 进行灵敏度实验, 并验证方法的特异性、适用性和抗干扰性, 最后对市售三七样品进行检测。同时以 *18S rDNA* 引物为内参质控, 对 DNA 提取及反应体系进行质控。**结果** 所建立的三七染料法实时荧光 PCR 方法灵敏度为 0.001 ng/μL; 特异性较好, 与 18 种近缘及常见中药材均无交叉反应; 适用性和抗干扰性也较好; 对 28 份不同加工方式的市售三七样品检测的结果与测序结果一致。**结论** 建立的三七染料法实时荧光 PCR 方法具有快速、准确、灵敏的特点, 可用于三七产品中三七成分的鉴别。

关键词: 三七; 实时荧光聚合酶链式反应; 染料法; 鉴别

Establishment of a real-time fluorescent polymerase chain reaction method for identification of *Panax notoginseng* based on fluorescent dye

ZHANG Qin^{1,2}, JI Chao³, WANG Xing-Yu^{1,2}, LI Juan^{1,2}, WU Zhi-Qiang^{1,2}, GUO Jun-Li^{1,2},
MA Ying^{1,2}, ZHENG Wen-Jie^{1,2,4*}, CAO Ji-Juan^{5*}

(1. College of Life Sciences, Tianjin Normal University, Tianjin 300387, China; 2. Tianjin Key Laboratory of Conservation and Utilization of Animal Diversity, Tianjin Normal University, Tianjin 300387, China; 3. State Key Laboratory for Conservation and Utilization of Yunnan Biological Resources, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China; 4. Zheng Wenjie Expert Workstation of Yunnan Province, Southwest Forestry University, Kunming, 650224, China; 5. Key Laboratory of Biotechnology and Resource Utilization of Ministry of Education, Dalian Minzu University, Dalian 116000, China)

基金项目: 云南省重大科技专项(202102AE090042)、云南绿色食品国际合作研究中心项目子课题项目(2019ZG00901-04)、生物技术与资源利用教育部重点实验室项目(KF2021006)

Fund: Supported by the Major Science and Technology Project of Yunnan (202102AE090042), the Yunnan Green Food International Cooperative Research Center Project Subproject (2019ZG00901-04), and the Project of Key Laboratory of Biotechnology and Bioresources Utilization (KF2021006)

***通信作者:** 郑文杰, 博士, 研究员, 主要研究方向为食品安全检测。E-mail: skyzwj@tjnu.edu.cn

曹际娟, 博士, 研究员, 主要研究方向为食品安全检测。E-mail: caojijuan@dlnu.edu.cn

***Corresponding author:** ZHENG Wen-Jie, Ph.D, Professor, Tianjin Normal University, No.393, Binshui West Road, Xiqing District, Tianjin 300387, China. E-mail: skyzwj@tjnu.edu.cn

CAO Ji-Juan, Ph.D, Professor, Dalian Minzu University, No.18, West Liaohe Road, Jinzhou New District, Dalian 116000, China. E-mail: caojijuan@dlnu.edu.cn

ABSTRACT: Objective To establish a real-time fluorescent polymerase chain reaction (PCR) method for the identification of *Panax notoginseng* based on the *psbA-trnH* sequence of chloroplast gene using fluorescent PCR technique by TB Green dye method. **Methods** By comparing the *psbA-trnH* sequences of *Panax notoginseng* and *Panax ginseng*, *Panax quinquefolius* and *Panax japonicus*, a pair of *Panax notoginseng*-specific primers was designed, the annealing temperature was optimized, sensitivity experiments were performed, and the specificity, applicability and anti-interference of the method were verified, and finally, commercial samples of *Panax notoginseng* were detected. The 18S rDNA primer was used as the internal reference for quality control of DNA extraction and reaction system. **Results** The sensitivity of the established real-time fluorescence PCR method with *Panax notoginseng* dye method was 0.001 ng/ μ L; the specificity was good, and there was no cross-reactivity with 18 kinds of closely related and common Chinese herbal medicinal materials; the applicability and anti-interference were also good; the results of the detection of 28 commercially available *Panax notoginseng* samples with different processing methods were consistent with the sequencing results. **Conclusion** The established real-time fluorescence PCR method of *Panax notoginseng* dye method is rapid, accurate and sensitive, and can be used to identify *Panax notoginseng* components in *Panax notoginseng* products.

KEY WORDS: *Panax notoginseng*; real-time fluorescent polymerase chain reaction; dye method; identification

0 引言

三七[*Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen]为五加科人参属植物,又名田七、金不换、参三七,是中国传统中药材之一^[1],根茎花叶均可入药^[2-3],被世人誉为“南国神草”。其在我国最新版药食同源目录中被列入保健食品行列,并在食品和日化品等行业中得到广泛应用^[4]。随着市场需求的增加,不法商贩利用其他中药材和伪品冒充三七导致三七价格不一和品质不等的现象频发,劣质三七的使用欺瞒了消费者,也影响了三七质量,因此建立快速准确鉴别三七的方法,对维护三七市场的稳定发展、保障消费者健康具有重要意义。

目前三七的鉴别方法主要有形态学方法、化学分析方法和分子生物学方法,传统形态学方法需要有专业鉴别能力的人员参与,化学分析方法如高效液相色谱法^[5-6]和红外光谱法^[7-10]分析成本较高。近年,以DNA为基础的分子生物学方法不断发展,聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)技术成为常用的鉴别方法之一,现有PCR技术所用特异性鉴别序列多采用叶绿体 *psbA-trnH* 基因序列和核糖体 *ITS* 基因序列等植物DNA条形码序列^[11],这些序列具有种内高度保守、种间足够变异的特点^[12-13]。目前已有研究者们基于 *psbA-trnH* 序列^[14]、*ITS* 序列^[15-16]、叶绿体 *trnL-trnF* 序列^[17],对三七及其伪品的序列进行比对找到三七的特异性位点,设计三七的特异性引物,建立单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)标记的普通PCR方法鉴别三七。还有研究者建立了同时鉴别三七、人参、西洋参的多重PCR方法^[18-19]。基于普通PCR的方法扩增后需要电泳,增加了检测时间,而且电泳试剂具有一定毒性,童宇茹等^[20]利用 *psbA-trnH* 通用引物建立了通过染料法荧光PCR的熔解曲线鉴别三七粉及其掺假品的方

法。也有研究将单拷贝核基因二酰甘油激酶1基因结合微滴数字PCR用于三七的鉴别,实现了准确定量^[21]。

近年,荧光PCR技术发展迅速,广泛应用在鉴别方面和医学领域^[22]。其中,在鉴别药用植物方面,已有应用荧光PCR技术成功鉴别人参^[23]、西洋参^[24]、西红花^[25]、银杏^[26]等的研究报道。荧光PCR可分为染料法和探针法两种,其中染料法荧光PCR通过在反应体系中加入荧光染料,染料和DNA双链非特异性结合,从而检测到荧光信号,根据荧光信号的强度来判断产生的DNA双链数量,并且染料只能和DNA双链结合,可以根据熔解曲线来判断PCR反应的特异性^[27-28]。荧光PCR技术具有结果准确、快速灵敏和成本低的特点^[29-31],但目前通过染料法荧光PCR扩增特异性曲线实现三七鉴别的研究仍是空白,本研究基于三七 *psbA-trnH* 序列的特异性位点,设计了三七的特异性引物,并引入18S rDNA通用引物质控DNA提取和反应体系,建立了染料法荧光PCR鉴别三七的方法,为维护三七市场的健康发展提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 样品来源

本研究所用的植物类实验材料包括:24份不同地域三七根部样品,采自云南省、四川省和广西壮族自治区的实验基地,样品信息见表1;18种近缘及常见中药材分别为:人参、西洋参、竹节参、蒙古黄芪、甘草、灵芝、肉苁蓉、太子参、朱砂、景天三七、北沙参、白背三七、玄参、苍术、白术、当归、黄豆、小麦,通过网络渠道购买于药材市场和药店,其中人参、西洋参、竹节参产地为河北安国,其他产地为安徽亳州;28份市售样品,包括三七花、三七根、三七粉、三七压片等通过网络渠道购买,产地均为云南文山。

表 1 适用性实验三七样品信息

Table 1 Information on applicability of the experimental samples

编号	产地	编号	产地
SQ	云南大塘子	SQ-12	云南寻甸
SQ-1	云南坝子	SQ-13	云南砚山
SQ-2	云南会泽	SQ-14	云南沾益
SQ-3	云南建水	SQ-15	云南马场
SQ-4	云南老缅寨	SQ-16	云南石林
SQ-5	云南蒙自	SQ-17	云南古木
SQ-6	广西那坡	SQ-18	云南陆良
SQ-7	云南丘北	SQ-19	云南马龙
SQ-8	云南哨冲	SQ-20	云南石屏
SQ-9	云南师宗	SQ-21	四川大英县
SQ-10	云南小广扎	SQ-22	云南平安街
SQ-11	云南宣威	SQ-23	云南广维

1.2 实验试剂

0.5 mol/L 乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA)、1 mol/L 三羟甲基氨基甲烷盐酸盐(tris hydrochloride, Tris-HCl)缓冲液、十六烷基三甲基溴化铵(hexadecyl trimethyl ammonium bromide, CTAB)(高纯级)(北京索莱宝科技有限公司);无水乙醇(分析纯,天津元利化工有限公司);氯化钠(分析纯,天津市风船化学试剂科技有限公司);聚乙烯吡咯烷酮(polyvinyl pyrrolidone, PVP)(分析纯,凯玛特天津化工科技有限公司);TB Green® Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus) (RR820A)、Ex Taq® DNA Polymerase (RR001B)(宝生物工程大连有限公司);引物由生工生物工程(上海)有限公司合成;CTAB 缓冲液:20 g/L CTAB、81.7 g/L 氯化钠、0.1 mol/L Tris-HCl 缓冲液、0.02 mol/L EDTA、20 g/L PVP。

1.3 仪器与设备

Pulverisette 6 单罐行星式球磨机(德国 FRITSCH 公司);Nano Drop 2000c 超微量分光光度计(美国 Thermo Scientific Fisher 公司);LightCycler® 480 II 实时荧光定量 PCR 仪(瑞士 Roche 公司);Gel Doc XR 凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司);3K15 高速冷冻离心机(德国 SIGMA 离心机扬州有限公司)。

1.4 实验方法

1.4.1 样品真实性验证

首先将采集的根部样品依次用无菌水、70%的乙醇清洗,60 °C烘干后,用球磨机研磨成细粉,过 80 目筛。采用改良 CTAB 法提取所有样品的基因组 DNA,并测定 DNA 的浓度和纯度。以植物源性 ITS2 通用引物^[27,32](表 2)进行样品验证,PCR 反应体系为 25 μL,其中 TaKaRa Ex Taq 0.2 μL、10×Ex Taq Buffer (Mg²⁺ plus) 2.5 μL、dNTP Mixture 2 μL、10 μmol/L 上、下游引物各 0.3 μL、DNA 模板 2 μL、无菌水 17.7 μL。反应条件为 94 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 30 s,55 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 30 s,35 个循环;72 °C 延伸 10 min。并用 1%琼脂糖

凝胶电泳检测 PCR 反应结果,PCR 扩增产物送上海生工生物工程股份有限公司进行双向测序,运用 MEGA 5.0 软件分析比对,采用最大似然法(maximum likelihood, ML)和最大简约法(maximum parsimony, MP)构建进化树,Bootstrap 值选择 1000 次,ML 法模型选择 Kimura 2-parameter Model。

1.4.2 *psbA-trnH* 基因序列分析及三七特异性引物设计

在 Genbank 中下载三七、人参、西洋参、竹节参的 *psbA-trnH* 基因序列,GenBank 号分别为 HQ112882.1、HQ112863.1、HQ112888.1、HQ112880.1,利用 DNAMAN 软件找到三七 *psbA-trnH* 基因的特异性位点,并运用 Primer 5.0 设计一对三七特异性引物 *psbA-F/R*(表 2),并在 NCBI 中进行 Primer BLAST 验证引物特异性。采用 GB/T 33526—2017《转基因植物产品数字 PCR 检测方法》中的 18S rDNA 内参质控引物(表 2)对 DNA 提取和反应体系进行质控。

表 2 引物序列

Table 2 Primer sequences

序列	引物名称	序列(5'-3')
ITS2	ITS2-F	ATGCGATACTTGGTGTGAAT
	ITS2-R	TTATTGATATGCTTAAACTCAGCGGG
<i>psbA-trnH</i>	<i>psbA-F</i>	ACCTAGTTTTTTTAAATAAAATTTAAATAA
	<i>psbA-R</i>	AGTCCAACATTTTTTCTTTTA
18S rDNA	18S-F	CCTGAGAAACGGCTACCAT
	18S-R	CGTGTCAGGATTGGGTAAT

1.4.3 特异性引物退火温度优化

将设计的三七特异性引物以三七、人参、西洋参、竹节参基因组 DNA (5 ng/μL)为模板进行退火温度的优化,空白对照中的模板用无菌水代替,反应体系为 20 μL,其中 TB Green Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus) 10 μL、10 μmol/L 上、下游引物各 0.8 μL、DNA 模板 2 μL、无菌水 6.4 μL。反应程序分为 PCR 扩增和熔解曲线,其中 PCR 扩增程序为 95 °C 预变性 30 s;95 °C 5 s,退火温度(45、50、55、60 °C) 30 s,72 °C 30 s 收集荧光信号,共 40 个循环。熔解曲线扩增程序为 95 °C 5 s;60 °C 1 min;60~95 °C 收集荧光信号,50 °C 30 s。其中退火温度分别设置 45、50、55、60 °C,观察荧光扩增曲线,筛选最佳的退火温度。

1.4.4 灵敏度实验

将三七的基因组 DNA 定量到 50 ng/μL,进行梯度稀释,8 个梯度,每微升模板量分别为 50.000、5.000、0.500、0.100、0.050、0.010、0.005、0.001 ng,前两组做 2 个平行样,后 6 组做 3 个平行样,空白对照中的模板用无菌水代替,运用优化后的退火温度进行特异性引物荧光 PCR 反应灵敏度测试,内参质控引物荧光 PCR 反应灵敏度测试的反应体系和反应条件与特异性引物的相同。

1.4.5 特异性实验

以三七和 18 种中药材基因组 DNA 为模板,空白对照中的模板用无菌水代替,反应体系和反应条件同 1.4.4,验证三七特异性引物的特异性。

1.4.6 适用性实验

分别运用特异性引物和内参质控引物对 24 份不同地

域三七样品(表 1)进行扩增, 空白对照中的模板用无菌水代替, 反应体系和反应条件同 1.4.4, 验证三七特异性引物和内参质控引物荧光 PCR 反应的适用性。

1.4.7 抗干扰性实验

以三七粉末样品为检测对象, 人参粉末样品为样品基质, 分别制备三七含量为 0%、5%、10%、40%、80%、100%的混合样品, 提取基因组 DNA, 每组做 2 个平行样, 空白对照中的模板用无菌水代替, 反应体系和反应条件同 1.4.4, 验证三七特异性引物和内参质控引物荧光 PCR 反应的抗干扰性。

1.4.8 市售样品检测

使用建立的方法对 28 份市售样品进行染料法荧光 PCR 反应, 空白对照中的模板用无菌水代替, 反应体系和反应条件同 1.4.4。并将检测结果与测序结果进行比对, 验证所建立方法的实用性。

2 结果与分析

2.1 样品验证

运用 ITS2 通用引物扩增 24 份不同地域三七和 18 种近缘及常见中药材, 所有药材的测序序列与 NCBI 库中对应药材的 ITS2 序列比对相似度均在 98%以上, ML 树和 MP 树的聚类结果显示(图 1), 不同地域的三七聚为一个分支, 支持率分别为 98%和 99%, 同属的人参、西洋参、竹节参与其在一大分支下, 支持率分别为 91%和 99%, 其他

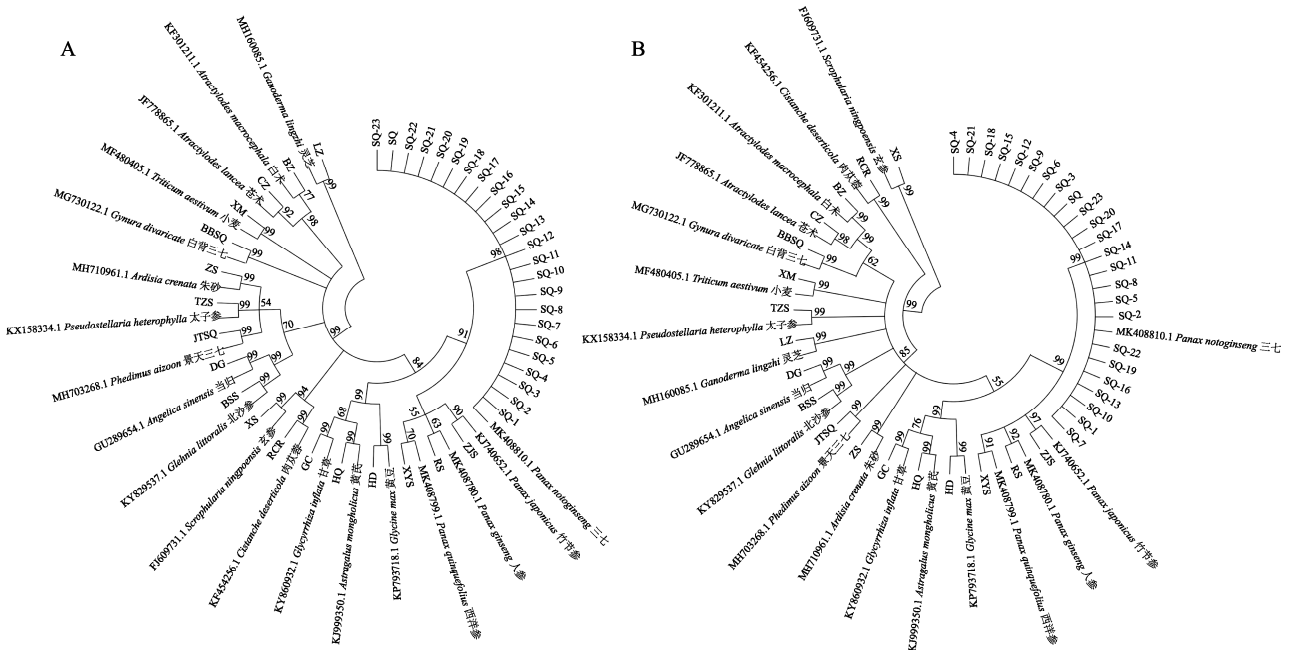
中药材与 NCBI 库中对应药材的 ITS2 序列也单独聚为一个分支, 因此, 能够通过 ITS2 序列测序分析确定实验所用植物材料的真实性。

2.2 *psbA-trnH* 序列分析及三七特异性引物设计

比较三七与人参、西洋参、竹节参的 *psbA-trnH* 序列可以发现(图 2), 三七 *psbA-trnH* 序列的 129、142、156、183、279 位点碱基分别为 T、A、G、T、T, 而人参、西洋参和竹节参均为 C、T、A、C、A, 并且三七的 *psbA-trnH* 序列在第 145~152 位点存在碱基插入, 在第 285~290 位点存在碱基缺失, 以此为基础, 并综合考虑退火温度、引物二聚体和发夹结构等因素对引物和产物的影响, 设计三七的特异性引物。

2.3 特异性引物退火温度优化

在退火温度 45、50、55、60 °C 条件下, 特异性引物 *psbA-F/R* 对应的荧光 PCR 反应扩增曲线如图 3 所示。随着退火温度的升高, 阴性对照和空白对照均无扩增; 退火温度为 45、50、55 °C 时, 三七均有明显指数型增长的扩增曲线, 循环阈值(cycle threshold, Ct)为 16 左右; 当退火温度达到 60 °C 时, 三七的荧光 PCR 扩增曲线“S”型增长不明显, 扩增效率明显降低, 说明退火温度太高抑制了反应的扩增效率, 同时考虑到退火温度较低容易导致非特异性扩增, 因此选择退火温度为 55 °C。



注: A 为 ML 进化树, B 为 MP 进化树; 编号 SQ、SQ-1~SQ-23 对应表 1 中 24 份不同地域三七样品, RS 为人参、XYS 为西洋参、ZJS 为竹节参、HQ 为黄芪、GC 为甘草、LZ 为灵芝、RCR 为肉苁蓉、TZS 为太子参、ZS 为朱砂、JTSQ 为景天三七、BSS 为北沙参、BBSQ 为白背三七、XS 为玄参、CZ 为苍术、BZ 为白术、DG 为当归、HD 为黄豆、XM 为小麦。

图 1 基于 ITS2 序列构建的不同地域三七样品和常见中药材的 ML 进化树和 MP 进化树

Fig.1 ML evolutionary tree and MP evolutionary tree of *Panax notoginseng* samples from different regions and common Chinese herbs based on ITS2 sequences

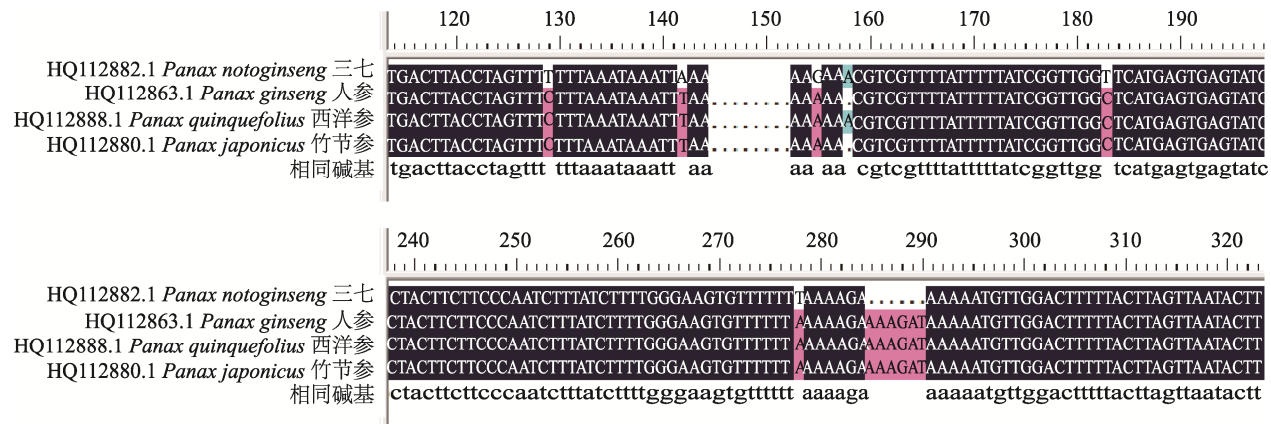


图 2 序列比对结果
Fig.2 Sequence comparison results

2.4 灵敏度实验

灵敏度实验结果如图 4 所示,当三七 DNA 模板浓度为 0.001 ng/ μ L 时,特异性引物荧光 PCR 扩增结果(图 4A)中, Ct 值为 29 左右;内参质控引物荧光 PCR 扩增结果(图 4B)中, Ct 值为 30 左右。因此,三七特异性引物和内参质控引物的荧光 PCR 反应的灵敏度可达到 0.001 ng/ μ L。

2.5 特异性实验

特异性实验结果如图 5 所示,特异性引物荧光 PCR 扩增结果(图 5A)中,只有三七有明显指数型扩增曲线, Ct 值为 16 左右,18 种其他中药材和空白对照无明显扩增曲线,可以判定为阴性;内参质控引物荧光 PCR 扩增结果中(图 5B),三七和 18 种中药材均有明显指数型扩增曲线,有荧光信号产生, Ct 值在 17~25 之间。表明 DNA 提取和反应体系无误的情况下,本研究建立的方法特异性较强。

2.6 适用性实验

适用性实验结果如图 6 所示,特异性引物荧光 PCR 反应(图 6A)中,24 份不同地域的三七样品均有指数型扩增曲线, Ct 值在 12~23 之间,可以判定为阳性;内参质控引物荧光 PCR 反应(图 6B)中,24 种不同地域的三七样品检测到荧光信号,均有指数型扩增曲线, Ct 值在 17~25 之间。因此,以上结果表明 DNA 提取和反应体系无误的情况下,本研究建立的方法适用于不同地域三七样品的检测,适用性较好。

2.7 抗干扰性实验

抗干扰性实验结果如图 7 所示,特异性引物荧光 PCR 反应(图 7A)中,三七含量 5%、10%、40%、80%、100% 的混合样品均有明显指数型增长的扩增曲线, Ct 值在 14~20 之间,三七含量 0 的混合样品未检测到荧光信号,无扩增曲线;内参质控引物荧光 PCR 反应(图 7B)中,6 个不同三七含量的混合样品, DNA 浓度相同, Ct 值均在 20 左右,均有明显的指数型增长的扩增曲线。因此,以上结果表明 DNA 提取和反

应体系无误的情况下,本研究建立的方法能够对含有三七的混合样品进行检测,并且有较好的抗干扰性。

2.8 市售样品检测

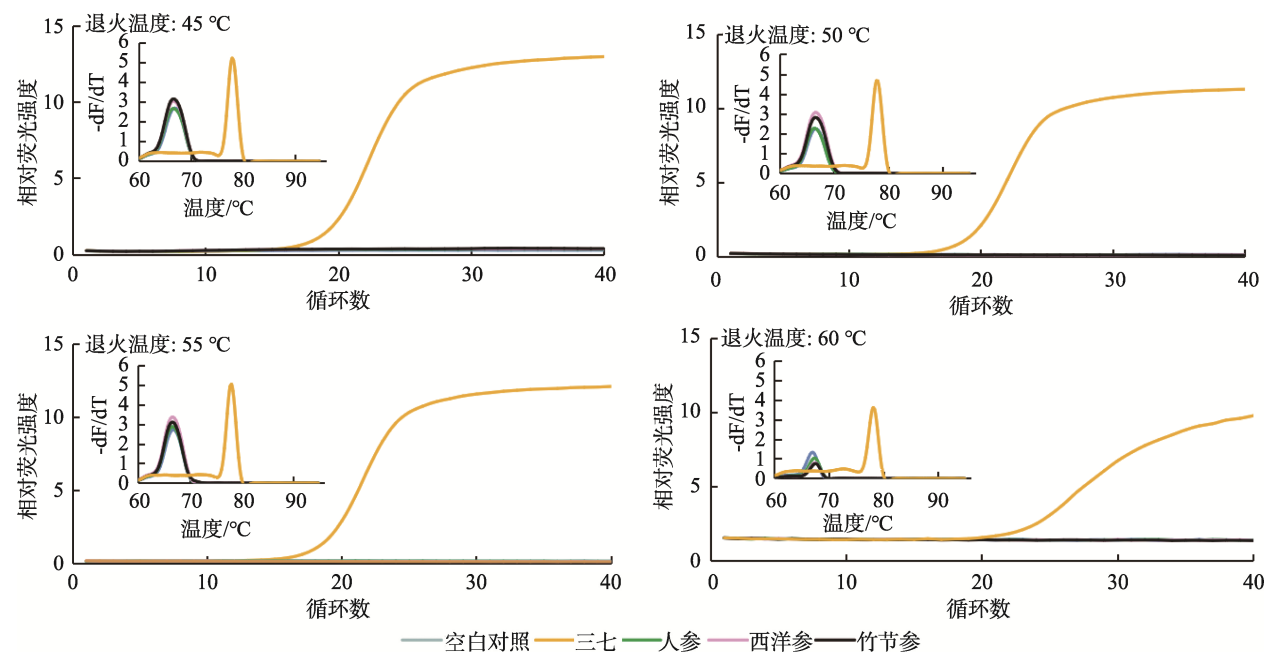
对 28 份市售样品进行检测,均检测到荧光信号,有指数型扩增曲线,特异性引物荧光 PCR 反应中 Ct 值在 13~23 之间,内参质控引物荧光 PCR 反应中 Ct 值在 17~24 之间。表明 DNA 提取和反应体系无误的情况下,28 份市售样品均检出三七成分。

为进一步验证该方法检测的可靠性,对 ITS2 通用引物测序得到的市售样品 ITS2 序列在 NCBI 中进行序列比对,比对结果为三七,序列相似度为 100%。因此,本研究建立的方法可对市售样品进行检测,并且检测结果与测序方法所得检测结果一致。

3 结论与讨论

本研究建立了基于 TB Green 荧光染料的荧光 PCR 鉴别三七的方法,检测结果判定方法为:①若特异性引物和内参质控引物的荧光 PCR 反应有荧光信号,有指数型增长的荧光扩增曲线,且内参质控的 Ct 值 $\leq$ 30.0 时,则判定 DNA 提取和反应体系无误,含有三七成分;②若内参质控引物的荧光 PCR 反应有荧光信号,有指数型增长的荧光扩增曲线,而特异性引物无上述结果,且内参质控的 Ct 值 $\leq$ 30.0 时,则判定 DNA 提取和反应体系无误,不含三七成分。

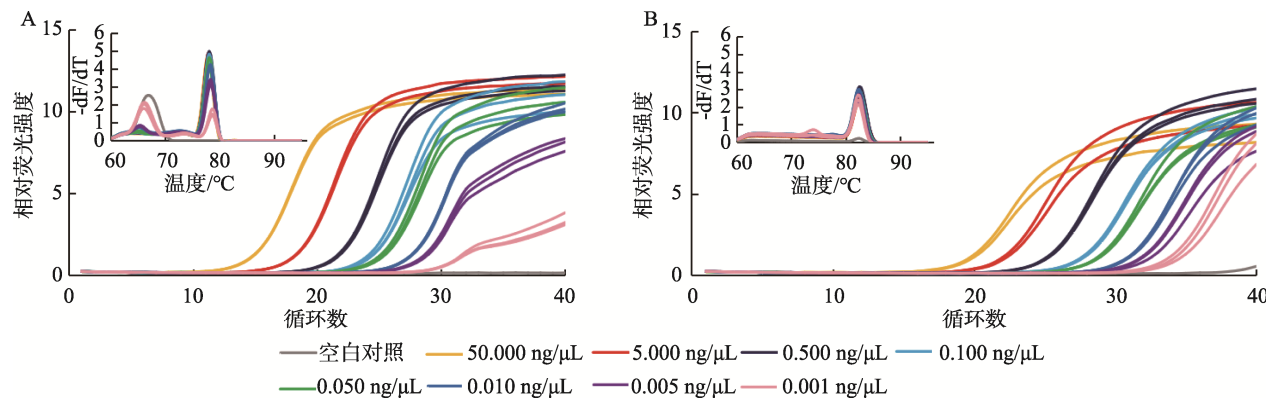
本研究设计了三七特异性引物结合内参质控引物建立了三七染料法荧光 PCR 鉴别方法,方法的灵敏度为 0.001 ng/ μ L,所建立的方法对 18 种近缘及常见中药材均无特异性扩增曲线,表明方法的特异性较好,对 24 份不同地域三七样品均有指数型扩增曲线,表明方法具有较好的适用性,混合样品可以检出三七成分,验证了该方法具有较好抗干扰性,并可用于 28 份不同加工方式、不同部位的常见市售三七产品的鉴别,可在实际检测中推广应用。



注: 小图为各个样品荧光 PCR 扩增后的熔解曲线图, 反映对应扩增产物特性。

图 3 不同退火温度条件下三七特异性引物荧光 PCR 反应结果

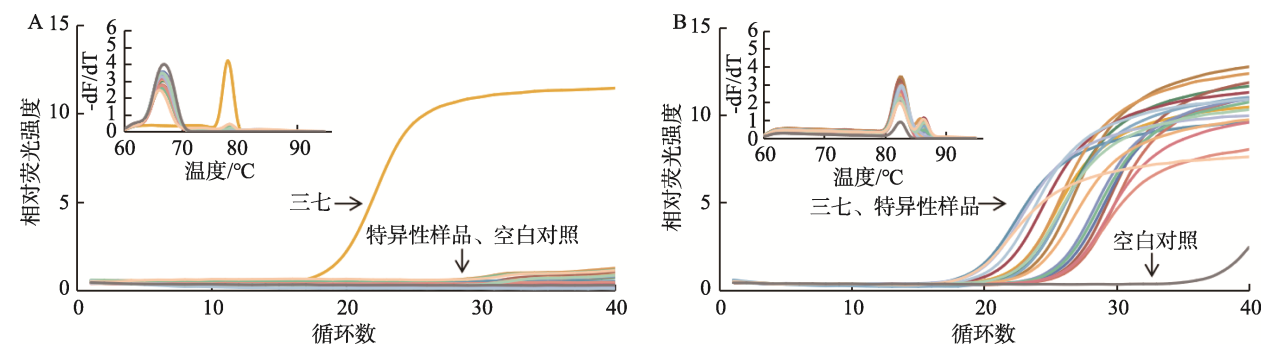
Fig.3 Results of fluorescence PCR reactions with *Panax notoginseng*-specific primers under different annealing temperatures



注: A 为三七特异性引物 psbA-F/R; B 为内参质控引物 18S-F/R。小图为各个样品荧光 PCR 扩增后的熔解曲线图, 反映对应扩增产物特性。

图 4 三七特异性引物和内参质控引物的荧光 PCR 灵敏度检测

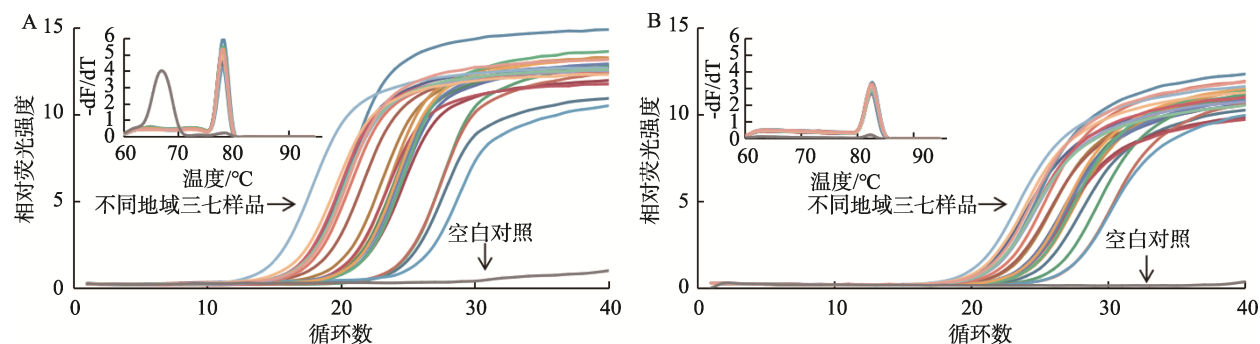
Fig.4 Fluorescence PCR sensitivity detection of *Panax notoginseng* specific primers and internal reference quality control primers



注: A 为三七特异性引物 psbA-F/R; B 为内参质控引物 18S-F/R。小图为各个样品荧光 PCR 扩增后的熔解曲线图, 反映对应扩增产物特性。

图 5 三七特异性引物荧光 PCR 特异性检测

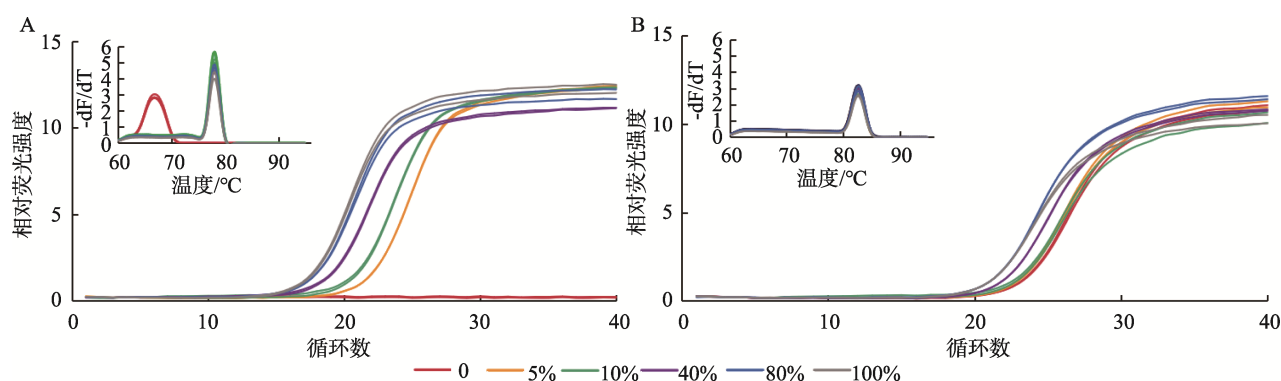
Fig.5 Fluorescence PCR specificity detection for *Panax notoginseng* specific primers



注: A 为三七特异性引物 psbA-F/R; B 为内参质控引物 18S-F/R。小图为各个样品荧光 PCR 扩增后的熔解曲线图, 反映对应扩增产物特性。

图 6 三七特异性引物和内参质控引物荧光 PCR 适用性检测

Fig.6 Fluorescence PCR suitability detection for *Panax notoginseng* specific primers and internal reference quality control primers



注: A 为三七特异性引物 psbA-F/R; B 为内参质控引物 18S-F/R。小图为各个样品荧光 PCR 扩增后的熔解曲线图, 反映对应扩增产物特性。

图 7 三七特异性引物和内参质控引物荧光 PCR 抗干扰性检测

Fig.7 Fluorescence PCR interference resistance detection for *Panax notoginseng* specific primers and internal reference quality control primers

参考文献

- [1] CHANG MK, YU Y, WULAMU S, et al. Structural analysis of water-soluble polysaccharides isolated from *Panax notoginseng* [J]. Int J Biol Macromol, 2020, 155: 376-385.
- [2] WANG T, GUO RX, ZHOU GH, et al. Traditional uses, botany, phytochemistry, pharmacology and toxicology of *Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen: A review [J]. J Ethnopharmacol, 2016, 188: 234-258.
- [3] 崔秀明, 黄璐琦. 依靠科技进步促进三七产业创新发展[J]. 中国现代中药, 2018, 20(3): 247-252.
- [4] CUI XM, HUANG LQ. Promoting the innovative development of *Panax notoginseng* industry depending on the progress of science and technology [J]. Mod Chin Med, 2018, 20(3): 247-252.
- [5] 李耿, 陈洁, 李振坤, 等. 三七专利数据分析与对产业发展启示[J]. 中国中药杂志, 2020, 45(5): 12.
- [6] LI G, CHEN J, LI ZK, et al. Analysis of patent data of *Panax notoginseng* and enlightenment of industrial development [J]. China J Chin Mater Med, 2020, 45(5): 12.
- [7] 徐倩. HPLC 法鉴别两种三七片伪品的应用分析[J]. 药品评价, 2016, 13(14): 40-42.
- [8] XU Q. Analysis of the application of HPLC method in the identification of three seven pieces of counterfeit products [J]. Drug Evaluat, 2016, 13(14): 40-42.
- [9] YAN SC, MA J, HUANG QQ, et al. Simultaneous quantification of a herbal combination of *Pueraria lobata*, *Salvia miltiorrhiza* and *Panax notoginseng* by rapid resolution liquid chromatography [J]. Nat Prod Commun, 2017, 12(9): 1501-1506.
- [10] 钟玉兰, 乐智勇. 利用近红外光谱技术快速鉴别三七粉及其伪品[J]. 江西中医药大学学报, 2018, 30(3): 70-73, 76.
- [11] ZHONG YL, LE ZY. Rapid identification of genuine and adulterated *Panax notoginseng* powders by near infrared spectra [J]. J Jiangxi Univ Trad Chin Med, 2018, 30(3): 70-73, 76.
- [12] LIU P, WANG J, LI Q, et al. Rapid identification and quantification of *Panax notoginseng* with its adulterants by near infrared spectroscopy combined with chemometrics [J]. Spectrochim Acta A, 2019, 206: 23-30.
- [13] CHEN H, TAN C, LIN Z, et al. Quantifying several adulterants of notoginseng powder by near-infrared spectroscopy and multivariate calibration [J]. Spectrochim Acta A, 2019, 211: 280-286.
- [14] CHEN H, TAN C, LI HJ. Untargeted identification of adulterated Sanqi powder by near-infrared spectroscopy and one-class model [J]. J Food Compos Anal, 2020, 88: 103450.
- [15] 刘丽, 肖炳葵, 罗晖明, 等. 三七特异性 PCR 真伪鉴别方法研究[J]. 药物分析杂志, 2016, 36(5): 878-886.
- [16] LIU L, XIAO BY, LUO HM, et al. Authentication of *Panax notoginseng* based on PCR analysis [J]. Chin J Pharm Anal, 2016, 36(5): 878-886.
- [17] 刘艳艳, 张全芳, 范阳阳, 等. 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[J]. 中草药, 2019, 50(9): 9.
- [18] LIU YY, ZHANG QF, FAN YY, et al. Phylogenetic relationship analysis

- of common medicinal submetals and multiple real-time fluorescence PCR identification of *Fritillariae cirrhosae bulbosae* [J]. Chin Tradit Herb Drug, 2019, 50(9): 9.
- [13] 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): 8.
- CHEN SL, YAO H, HAN JP, *et al.* Principles for molecular identification of traditional Chinese materia medica using DNA barcoding [J]. China J Chin Mater Med, 2013, 38(2): 8.
- [14] 方强强, 王燕, 彭春, 等. 中药 DNA 条形码分子鉴定技术的应用与展望[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(22): 9.
- FANG QQ, WANG Y, PENG C, *et al.* Application and prospect of DNA barcode molecular identification technology in traditional Chinese medicine [J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2018, 24(22): 9.
- [15] 王巍, 尚柯, 段庆梓, 等. 市售三七粉中三七的 DNA 检测方法研究[J]. 时珍国医国药, 2019, 30(6): 1399–1401.
- WANG W, SHANG K, DUAN QZ, *et al.* Study on DNA detection method of *Panax notoginseng* in commercial *Panax notoginseng* powder [J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2019, 30(6): 1399–1401.
- [16] 魏妙洁, 石林春, 赵晴, 等. 三七片 DNA 条形码分子鉴定及方法学考察[J]. 中草药, 2020, 51(7): 8.
- WEI MJ, SHI LC, ZHAO Q, *et al.* Molecular identification of Sanqi tablets using DNA barcoding and its methodological evaluation [J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2020, 51(7): 8.
- [17] 宋晓娜. 三七遗传多样性及三七粉的分子鉴定方法研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2015.
- SONG XN. Study on the genetic diversity of *Panax notoginseng* and the method of molecular identification of *Panax notoginseng* powder [D]. Beijing: Beijing University of Chinese Medicine, 2015.
- [18] 刘丽, 肖炳臻, 罗晖明, 等. 多重 PCR 方法同时鉴别人参、西洋参、三七[J]. 药物分析杂志, 2016, 36(4): 668–677.
- LIU L, XIAO BY, LUO HM, *et al.* Identification of *Panax ginseng*, *Panax quinquefolium* and *Panax notoginseng* by multiplex PCR assay [J]. Chin J Pharm Anal, 2016, 36(4): 668–677.
- [19] 蒋超, 罗宇琴, 袁媛, 等. 多重位点特异性 PCR 鉴别人参、三七、西洋参掺杂[J]. 中国中药杂志, 2017, 42(7): 1319–1323.
- JIANG C, LUO YQ, YUAN Y, *et al.* Identification of *Panax ginseng*, *P. notoginseng* and *P. quinquefolium* admixture by multiplex allele specific polymerase chain reaction [J]. China J Chin Mater Med, 2017, 42(7): 1319–1323.
- [20] 童宇茹, 蒋超, 黄璐琦, 等. 基于 DNA 溶解曲线分析技术的三七粉分子鉴定[J]. 药物分析杂志, 2014, 34(8): 1384–1390.
- TONG YR, JIANG C, HUANG LQ, *et al.* Molecular identification of *Radix notoginseng* powder by DNA melt curve analysis [J]. Chin J Pharm Anal, 2014, 34(8): 1384–1390.
- [21] YU N, HAN J, DENG T, *et al.* A novel analytical droplet digital PCR method for identification and quantification of raw health food material powder from *Panax notoginseng* [J]. Food Anal Methods, 2021, 14(3): 552–560.
- [22] GAMBINO G. Multiplex RT-PCR method for the simultaneous detection of nine grapevine viruses [J]. Methods Mol Biol, 2015, 1236: 39–47.
- [23] 李忠华, 杨宝, 马宁, 等. 人参实时荧光定量 PCR 快速鉴别方法[J]. 山西大学学报(自然科学版), 2021, 44(3): 8.
- LI ZH, YANG B, MA N, *et al.* Establishment of a method for rapid identification of *Panax ginseng* based on real-time fluorescence quantitative PCR [J]. J Shanxi Univ (Nat Sci Ed), 2021, 44(3): 8.
- [24] 黄永辉, 徐森锋, 权永兵, 等. 西洋参实时荧光定量 PCR 快速鉴别方法的建立[J]. 中国中药杂志, 2018, 43(20): 5.
- HUANG YH, XU MF, QUAN YB, *et al.* Establishment of a quantitative real-time PCR for rapid detection of *Panax quinquefolius* [J]. China J Chin Mater Med, 2018, 43(20): 5.
- [25] 张全芳, 刘艳艳, 谭晴晴, 等. 一种鉴定西红花和红花源性成分的实时荧光 PCR 方法[J]. 中国中药杂志, 2018, 43(23): 7.
- ZHANG QF, LIU YY, TAN QQ, *et al.* A real-time fluorescence quantitative PCR method for source identification of *Crocus sativus* and *Carthamus tinctorius* [J]. China J Chin Mater Med, 2018, 43(23): 7.
- [26] GRAZINA L, AMARAL JS, COSTA J, *et al.* Authentication of *Ginkgo biloba* herbal products by a novel quantitative real-time PCR approach [J]. Foods, 2020, 9(9): 1233.
- [27] YAN WJ, ZHANG JZ, ZHENG R, *et al.* Combination of SYBR Green II and TaqMan probe in the adulteration detection of *Dendrobium devonianum* by fluorescent quantitative PCR [J]. Int J Food Sci Technol, 2016, 50(12): 2572–2578.
- [28] LI JC, LI JP, LIU RX, *et al.* Identification of eleven meat species in foodstuff by a hexaplex real-time PCR with melting curve analysis [J]. Food Control, 2020, 121(10): 107599.
- [29] LI JP, WEI YX, LI JC, *et al.* A novel duplex SYBR Green real-time PCR with melting curve analysis method for beef adulteration detection [J]. Food Chem, 2020, 338: 127932.
- [30] WANG Y, PAN Y, WU JH, *et al.* Simultaneous detection of feline parvovirus and feline bocavirus using SYBR Green I-based duplex real-time polymerase chain reaction [J]. 3 Biotech, 2021, 11(9): 400.
- [31] SHI RZ, HUANG MH, WANG J, *et al.* Molecular identification of dried squid products sold in China using DNA barcoding and SYBR green real time PCR [J]. Food Addit Contam A, 2020, 37(7): 1061–1074.
- [32] CHEN S, HUI Y, HAN J, *et al.* Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species [J]. PLoS One, 2010, 5(1): e8613.

(责任编辑: 张晓寒 于梦娇)

作者简介



张 芹, 硕士研究生, 主要研究方向为农产品营养与检测。
E-mail: 17854265918@163.com



郑文杰, 博士, 研究员, 主要研究方向为食品安全检测。
E-mail: skyzwj@tjnu.edu.cn



曹际娟, 博士, 研究员, 主要研究方向为食品安全检测。
E-mail: caojijuan@dlnu.edu.cn