

快速分析

基于酶促恒温扩增技术快速鉴别天麻真伪检测方法的建立与应用*

马秋贺¹, 马玉贺¹, 李涛¹, 刘悦¹, 柴金军¹, 徐子强¹,
刘昂¹, 高丽君^{1**}, 夏薇¹, 李明成^{1,2}, 曲永梅³

(1. 北华大学医学技术学院, 吉林 132013; 2. 吉林省中药 DNA 指纹检测技术科技创新中心, 吉林 132013;
3. 吉林国安药业有限公司, 吉林 132013)

摘要 目的: 基于酶促恒温扩增 (enzymatic recombinase amplification, ERA) 技术建立一种可快速定性鉴别道地药材天麻真伪的方法。方法: 遵循 ERA 引物设计原则, 应用 Oligo 7.0 软件根据天麻及其常见伪品的 ITS2 基因组序列, 筛选优化天麻 ERA 特异性引物, 应用 Primer Premier 5.0 软件设计天麻特异性 PCR 鉴别引物, 通过对 ERA、PCR 反应体系的优化, 最终确定 ERA 最佳反应时间为 17 min, 最适反应温度为 40 °C; PCR 最优退火温度为 57 °C, 循环为 32 次, 对所建立的方法进行灵敏度、特异性验证, 并选取中药市场市售天麻样品进行检测。结果: 所设计的天麻 ERA 鉴别引物与其常见伪品间无交叉反应, 特异性良好; 重复性结果显示, 3 次重复性检测结果一致, 未出现假阳性与假阴性; 该方法对天麻基因组 DNA 的灵敏度为 1 pg · μL⁻¹, 比传统 PCR 灵敏度高; ERA 技术能够用于天麻市售样品的快速鉴定, 且检测结果与 PCR 方法相同。结论: 所建立的检测方法操作简单、快速, 具有较高的特异性和灵敏度, 为道地药材天麻的真伪鉴别提供了一种新手段。

关键词: 酶促恒温扩增; 聚合酶链式反应; 天麻; 定性; 真伪鉴定; 快速检测

中图分类号: R 917 文献标识码: A 文章编号: 0254 - 1793(2024)04 - 0729 - 08
doi: 10.16155/j.0254 - 1793.2024.04.20

Establishment and application of a rapid authentication test method based on enzymatic recombinase amplification technology for the identification of *Gastrodiae Rhizoma**

MA Qiu - he¹, MA Yu - he¹, LI Tao¹, LIU Yue¹, CHAI Jin - jun¹, XU Zi - qiang¹,
LIU Ang¹, GAO Li - jun^{1**}, XIA Wei¹, LI Ming - cheng^{1,2}, QU Yong - mei³

(1. School of Medical Technology, Beihua University, Jilin 132013, China; 2. Innovation Center for Detection on DNA Fingerprint of Traditional Chinese Medicine, Jilin 132013, China; 3. Jilin Guoan Pharmaceutical Limited Company, Jilin 132013, China)

Abstract Objective: To establish a method for the rapid identification of the authenticity of *Gastrodiae Rhizoma* herbs based on enzymatic recombinase amplification (ERA) technique. **Methods:** Following the principle of ERA primer design, Oligo 7.0 software was applied to screen and optimize the ERA - specific primers of *Tianma* based

* 医药健康产业发展专项 (20230401096YY); 北华大学研究生创新计划项目【2022】058 号; 吉林省科技厅重点科技成果转化项目 (20170307001YY)

** 通信作者 Tel: 18604498547; E - mail: gaolijun1969@126.com
第一作者 Tel: 18943386083; E - mail: 1206225768@qq.com

on the ITS2 genome sequences of *Gastrodia elata* and its common artifacts. Primer Premier 5.0 software was applied to design the specific PCR primers for the identification of *Gastrodia elata*, and through the optimization of ERA and PCR reaction system, the optimal reaction time for ERA was finally determined to be 17 min, the optimal reaction temperature was 40 °C, the optimal annealing temperature for PCR was 57 °C, and the cycle was 32 times, and the established method was verified for sensitivity and specificity, and the samples of asparagus available in the traditional Chinese medicine. The sensitivity and specificity of the established method were verified, and the commercially available asparagus samples in the market were selected for testing. **Results:** The designed primers for the specific identification of ERA in *Gastrodia elata* did not cross-react with its common forgeries, and the specificity was good, a repeatability results showed that the three repeatability tests were consistent, with no false positives or false negatives; the sensitivity of this method for *Gastrodia elata* genomic DNA was 1 pg · μL⁻¹, which was higher than that of conventional PCR; the ERA technique can be used for the rapid identification of commercially available samples of *Gastrodia elata* and the results of the assay are the same as those of the PCR method. **Conclusion:** The established detection method is simple, rapid, with high specificity and sensitivity, and provides a new means for the authentication of the *Gastrodiae* Rhizoma.

Keywords: enzymatic recombinase amplification; polymerase chain reaction; *Gastrodia elata*; qualitative; authentication; rapid detection

天麻(*Gastrodiae Rhizoma*)是我国常用的名贵中药材,为兰科植物天麻(*Gastrodia elata* Bl.)的干燥块茎,有平抑肝阳、息风止痉的功效,临床上对抗惊厥、镇痛、保护神经元系统^[1-4]等具有重要意义。天麻在2021年被评为吉林省首批道地药材的优势品种,因其药用保健价值较高,得到社会各界的广泛认可,价格逐年升高,不法商人为谋取利润常以价格低廉的天花粉(*Trichosanthis Radix*)、紫茉莉根(*Mirabilis jalapa* L.)以及大丽菊(*Dahlia pinnata* Cav.)的块茎等来冒充天麻,严重危害公众健康。吉林省道地药材天麻出售量大,保证中药材的质量安全问题关乎到民生。目前,对于天麻真伪鉴定的研究不再局限于性状、显微、理化鉴别,随着科技的发展,天麻水提物HPLC指纹图谱^[5]、稳定同位素技术^[6]、非线性化学指纹图谱^[7]以及DNA条形码技术^[8]等都应用于天麻的鉴定中,但这些技术方法需要专业人员及昂贵的仪器设备,在一定程度上限制了推广应用。

近几年,等温扩增技术(isothermal amplification technology, IAT)发展迅速,以环介导等温扩增(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)技术、重组酶聚合酶扩增(recombinase polymerase amplification, RPA)技术、重组酶介导链替换核酸扩增(recombinase aided amplification, RAA)技术和酶促恒温扩增(enzymatic recombinase amplification, ERA)技术为代表的

IAT在食品^[9-10]、中药^[11]、病原^[12-13]鉴定等方面得到广泛应用。

其中,国产RAA试剂盒、ERA试剂盒是进口RPA试剂盒的替代品,ERA技术是我国于继彬等^[14]在2019年研发的具有全球自主知识产权的全新的IAT方法,是对Piepenburg等^[15]研发的RPA技术的改造和升级。目前,该技术方法已申请了国家专利和国际专利。ERA技术与RPA检测原理相似,是在重组酶、单链DNA结合蛋白以及DNA聚合酶的作用下,在37~42 °C恒温条件下,10~20 min将靶DNA特异性、指数级的扩增,相较于LAMP需要设计4条引物的烦琐性,ERA技术只需要设计2条引物的简便优势尤为突出。目前尚没有见到将ERA技术应用于天麻真伪鉴定的研究,为此,本研究以天麻ITS2序列为靶基因,应用ERA技术初步建立一种可快速、定性鉴别天麻真伪的方法。

1 仪器与材料

1.1 主要仪器

UV WHITE2020D凝胶成像分析系统(Bio-rad公司),NanoDrop One微量核酸蛋白测定仪(Thermo公司),JY300E通用型电泳仪(北京君意东方电泳设备有限公司),台式高速冷冻离心机(长沙湘仪离心机仪器有限公司),Q6000微量紫外分光光度计(Denovix公司),K30系列干式恒温器(杭州奥盛仪器有

公司), Digital Vortex Mixer (Thermo Fisher 公司)。

1.2 材料

天麻对照药材(中国食品药品检定研究院,批号 120944-202112)、紫茉莉根对照药材(乐美天医药|德思特生物,批号 DST201211-072)、大丽菊块茎(吉林国安药业有限公司)、天花粉(安徽亳州药材市场),所有样品均经吉林国安药业有限公司曲永梅中药师鉴定。编号 S1-S15 为市售天麻样品,用于评价中药市场天麻的合格率。

基础型核酸扩增试剂盒 KS101(苏州先达基因科技有限公司)、核酸染料(SuperRed 公司)、100 bp DNA Marker(上海生物工程有限公司)、2 × Taq PCR Master Mix 酶(南京诺唯赞生物科技股份有限公司)、琼脂糖(西班牙 Agrose 公司)。

2 方法与结果

2.1 样品 DNA 提取

采用改良 CTAB 法提取植物基因组 DNA,分别取各样品 100 mg 经液氮研磨呈粉末状,放置于 2 mL

离心管中,加入 P1 溶液(洗脱缓冲液)1 000 μL , P2 溶液(β -巯基乙醇)3 μL , 13 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 6 min,弃上清;加入 65 $^{\circ}\text{C}$ 预热的 P3 溶液($4 \times \text{CTAB}$) 750 μL , P2 溶液(β -巯基乙醇)2.25 μL , 涡旋震荡混匀,封口膜封口后 65 $^{\circ}\text{C}$ 水浴震荡 1 h。冷却至室温,加入 P4 [三氯甲烷-异戊醇(24:1)] 溶液 750 μL , 颠倒混匀,使溶液呈乳浊状,不可震荡, 12 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min;取上清,加入等体积 P5 溶液(异丙醇),于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 沉淀 30 min, 12 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min,弃去上清;加入 P6 溶液(70%乙醇)600 μL , 13 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min,弃上清(重复此步骤 1 次),室温晾干;加入 P7 溶液(ddH₂O) 30 μL ,即得样品的 DNA 溶液。

2.2 样品 DNA 检测

将样品的 DNA 溶液用微量紫外分光光度计测定浓度,每个溶液重复测定 3 次,取测量结果的平均值,根据 $A_{260 \text{ nm}}$ 与 $A_{280 \text{ nm}}$ 的比值鉴定纯度。结果如表 1 所示,样品纯度均在 1.70~2.10,符合扩增要求。

表 1 天麻及其伪品、市售样品 DNA 浓度及纯度检测结果

Tab. 1 Results of DNA concentration and purity tests on *Gastrodiae Rhizoma*, its pseudo products and commercially available samples

样品名称 (sample name)	$A_{260 \text{ nm}} / A_{280 \text{ nm}}$	$\rho / (\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1})$	样品来源 (sample source)
天麻对照药材(<i>Gastrodiae Rhizoma</i> reference crude drug)	1.89	239.89	中国食品药品检定研究院(National Institutes for Food and Drug Control)
紫茉莉根对照药材(<i>Radix Mirabili Jalapae</i> reference crude drug)	1.95	367.72	乐美天医药 德思特生物(Lemaitan Pharmaceuticals Dexter Biologicals)
天花粉(<i>Trichosanthis Radix</i>)	1.98	371.42	安徽亳州药材市场(Anhui Bozhou Pharmaceutical Market)
大丽菊块茎(<i>Dahlia Pinnata Tuber</i>)	1.71	209.31	吉林国安药业有限公司(Jilin Guoan Pharmaceutical Limited Company)
S1	1.82	290.52	吉林,白山(Baishan, Jilin)
S2	1.89	205.69	吉林,松原(Songyuan, Jilin)
S3	1.97	492.83	吉林,吉林(Jilin, Jilin)
S4	1.79	397.74	吉林,吉林(Jilin, Jilin)
S5	1.85	510.94	吉林,舒兰(Shulan, Jilin)
S6	2.04	460.46	吉林,长春(Changchun, Jilin)
S7	1.95	380.53	吉林,辽源(Liaoyuan, Jilin)
S8	1.74	421.67	吉林,辽源(Liaoyuan, Jilin)
S9	1.83	369.34	吉林,双阳(Shuangyang, Jilin)
S10	1.72	438.76	吉林,磐石(Panshi, Jilin)
S11	2.07	526.38	吉林,通化(Tonghua, Jilin)
S12	1.93	510.02	吉林,通化(Tonghua, Jilin)
S13	1.84	280.01	吉林,白山(Baishan, Jilin)
S14	1.79	198.48	云南,昭通(Zhaotong, Yunnan)
S15	1.84	310.37	云南,丽江(Lijiang, Yunnan)

2.3 引物设计

从 NCBI 数据库 GenBank 中下载天麻 (EU135912.1) 及其常见伪品的 ITS2 基因组序列进行多序列比对分析,找到差异较大的区域,参考苏州先达基因有限公司 ERA 引物与探针设计指南,应用 Oligo 7.0 软件设计出 6 对天麻特异性 ERA 鉴别引物,供后续试验筛选优化;根据天麻 DNA 分子标记序列,应用 Primer Premier 5.0 软件设计 1 对天麻 PCR 特异性引物,引物序列均由生工生物工程(长春)股份有限公司合成,所设计的引物序列及预期产物长度如表 2 所示。

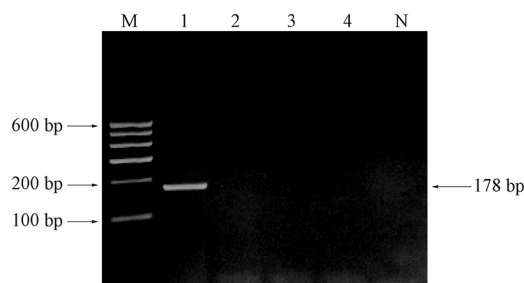
表 2 本研究所设计的 PCR、ERA 特异性引物

Tab. 2 PCR and ERA specific primers designed in this study

引物 (primer)	引物序列 (primer sequences)(5' - 3')	产物大小 (product size)/bp
PCR	F:ACAGCTTCCAGATCGTTACA R:GGTTGTCCTGGTGAAGTAA	178
ERA	F1:TGGTCGTGACCTACAAGGGTGAAGAAAC R1:TTATTGATATGCTTAAACTCGGTGGGTGGC	180
	F1:TGGTCGTGACCTACAAGGGTGAAGAAAC R2:CGAGGTTGCATTCCTACTGACCACGGGCTT	140
	F2:CCGCTGTGGTCGTGACCTACAAGGGTGAAG R1:TTATTGATATGCTTAAACTCGGTGGGTGGC	186
	F2:CCGCTGTGGTCGTGACCTACAAGGGTGAAG R2:CGAGGTTGCATTCCTACTGACCACGGGCTT	146
	F3:ACACGCAGACTAGCTCCTCGTATTCGCTGGC R3:CACACAACGTTTCCTCCACCCTTGTAGGTC	106
	F3:ACACGCAGACTAGCTCCTCGTATTCGCTGGC R4:CGAGACAAATATCTGAGGCACACAACGTTTC	124

2.4 PCR 检测体系的建立

通过优化 PCR 反应体系和条件,确定最终 PCR 反应体系为 25 μL ,其中 2 \times Taq PCR Master Mix 12.5 μL ,上、下游引物(10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)各 1 μL ,检测时将天麻对照药材与伪品的 DNA 溶液(100 $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$)1 μL 加入各自反应管,灭菌 ddH₂O 补足至 25 μL 。另取灭菌 ddH₂O 作为阴性对照。PCR 反应程序:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min,循环反应 32 次(95 $^{\circ}\text{C}$, 30 s;57 $^{\circ}\text{C}$, 30 s;72 $^{\circ}\text{C}$, 30 s),72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。反应结束后取电泳上样量 6 μL ,DNA 分子标记上样量 4 μL 点样于 2% 琼脂糖凝胶电泳板上,120 V $\cdot \text{cm}^{-1}$ 凝胶电泳 40 min,电泳结束后将凝胶置于紫外分析仪上观察结果。结果如图 1 所示,所设计的天麻特异性 PCR 引物在 178 bp 处出现单一明亮条带,而其常见伪品没有条带,表明该 PCR 引物具有良好特异性。



M. marker N. 阴性对照(negative control) 1. 天麻对照药材(Gastrodiae Rhizoma reference crude drug) 2. 紫茉莉根对照药材(Radix Mirabilis Jalapae reference crude drug) 3. 天花粉(Trichosanthis Radix) 4. 大丽菊块茎(Dahlia Pinnata Tuber)

图 1 PCR 引物特异性琼脂糖凝胶电泳图谱

Fig. 1 PCR primer-specific agarose gel electrophoresis profile

2.5 ERA 检测体系的建立

根据基础型核酸扩增试剂盒 KS101 说明书配制 48 μL 预混液,其预混液中包含溶解剂 20 μL ,10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的上、下游引物(F1/R1)各 2 μL ,10 $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 的样品 DNA 溶液 1 μL ,无菌 ddH₂O 补足至 48 μL ,将预混液充分涡旋振荡混匀,6 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 3 s;将预混液加入到基础扩增试剂中,以 3 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 的速度混匀 3 ~ 5 s,直到扩增试剂重悬,再次 6 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 3 s。将激活剂 2 μL 加在反应管管盖上,6 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 短暂离心 3 s,使激活剂进入预混液中,3 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 混匀 3 s,再次以 6 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 的速度离心 3 s。将反应管放入恒温仪中,40 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 17 min,反应结束后立即终止反应,取 ERA 扩增产物溶液 10 μL 加 Loading Buffer 1.5 μL 于 60 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 5 min。

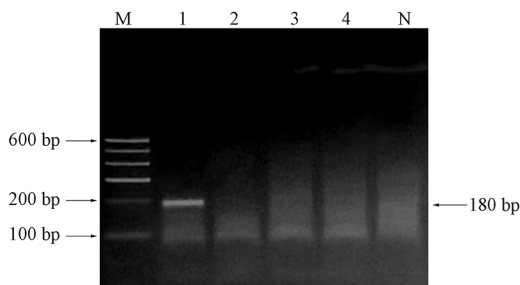
2.6 ERA 产物检测

称取 0.8 g 琼脂糖粉末置于锥形瓶中,加入 1 \times TBE 40 mL,在微波炉中中火加热 4 min 溶解,加入核酸染料 GelRed 4 μL ,并用腕力摇匀,得 2% 琼脂糖凝胶。取电泳上样量 6 μL ,DNA 分子标记上样量 4 μL 点样于琼脂糖凝胶电泳板上,电压 120 V,当蓝色指示剂距点样孔 2 ~ 3 cm 时结束电泳,将凝胶置于紫外分析仪上观察结果。

2.7 ERA 方法学评价

2.7.1 特异性评价 分别以 10 $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 的天麻对照药材、紫茉莉根对照药材、天花粉、大丽菊块茎的 DNA 溶液作为模板,同时以无菌 ddH₂O 作为阴性对照,采用“2.5”项下的反应体系和反应条件进行恒温扩增,反应结束后采用“2.6”项下方法观察结果,验证

引物特异性。结果如图 2 所示,只有 1 泳道出现大小为 180 bp 的目的条带,伪品及阴性对照未出现目的条带,表明 F1/R1 这对引物在该检测体系中特异性良好。

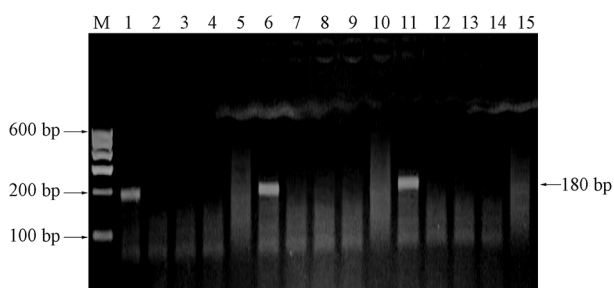


M. marker N. 阴性对照(negative control) 1. 天麻对照药材(Gastrodiae Rhizoma reference crude drug) 2. 紫茉莉根对照药材(Radix Mirabilis Jalapae reference crude drug) 3. 天花粉(Trichosanthis Radix) 4. 大丽菊块茎(Dahlia Pinnata Tuber)

图 2 ERA 引物特异性琼脂糖凝胶电泳图谱

Fig. 2 ERA primer-specific agarose gel electrophoresis profile

2.7.2 重复性评价 以 $10 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 的天麻对照药材、紫茉莉根对照药材、天花粉、大丽菊块茎的 DNA 溶液以及无菌 ddH_2O 作为模板,采用“2.5”项下检测体系,由同一操作人员在相同的检测体系与反应条件下,在同一实验环境中的不同时间段重复试验 3 次,反应结束后采用“2.6”项下方法观察结果。结果如图 3 所示,经 3 次重复性试验,天麻对照药材均在 180 bp 处出现目的条带,而伪品及阴性对照无目的条带,未出现假阴性及假阳性,且 3 次试验结果一致,表明该引物具有良好的重复性。



M. marker 1、6、11. 天麻对照药材(Gastrodiae Rhizoma reference crude drug) 2、7、12. 紫茉莉根对照药材(Radix Mirabilis Jalapae reference crude drug) 3、8、13. 天花粉(Trichosanthis Radix) 4、9、14. 大丽菊块茎(Dahlia Pinnata Tuber) 5、10、15. 阴性对照(negative control)

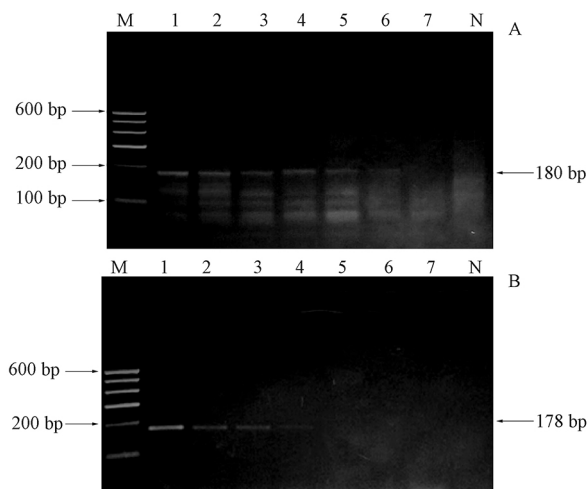
图 3 重复性评价琼脂糖凝胶电泳图谱

Fig. 3 Repeatability evaluation agarose gel electrophoresis profile

2.7.3 灵敏度评价 将天麻对照药材基因组 DNA 溶液按 1:10 进行倍比稀释,分别稀释到 $100 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 、

$10 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 、 $1 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 、 $100 \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 、 $10 \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 、 $1 \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 、 $100 \text{ fg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 、 $10 \text{ fg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$,以稀释的 DNA 溶液作为模板,并同时采用试验中所建立的 ERA、PCR 检测体系进行平行测定,比较 2 种检测方法的灵敏度。由于 ERA 试剂盒具有较高的灵敏度,故本试验将 ERA 灵敏度从 $10 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 开始进行检测,PCR 灵敏度从 $100 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 开始进行检测。

由图 4-A 可见,在第 5 泳道可以看到清晰目的条带,第 6 泳道时有目的条带但不清晰,由此确定 ERA 的灵敏度为 $1 \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 。由图 4-B 可见,在第 3 泳道可见清晰目的条带,第 4 泳道时未出现目的条带,故确定 PCR 的灵敏度为 $1 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$,表明 ERA 的灵敏度优于 PCR。



A. ERA 灵敏性电泳图(ERA sensitivity electropherogram)

M. marker N. 阴性对照(negative control) 1. $10 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 2. $1 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 3. $100 \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 4. $10 \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 5. $1 \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 6. $100 \text{ fg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 7. $10 \text{ fg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$

B. PCR 灵敏性电泳图(PCR sensitivity electropherogram)

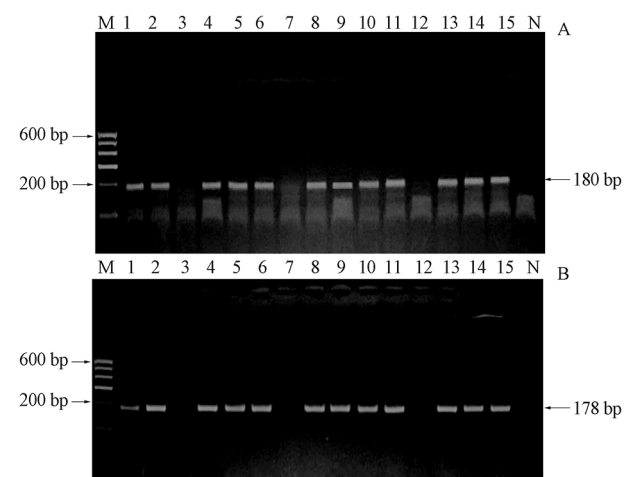
M. marker N. 阴性对照(negative control) 1. $100 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 2. $10 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 3. $1 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 4. $100 \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 5. $10 \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 6. $1 \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 7. $100 \text{ fg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$

图 4 灵敏性评价琼脂糖凝胶电泳图谱

Fig. 4 Sensitivity evaluation agarose gel electrophoresis profile

2.7.4 市售天麻样品检测 按照“2.1”项下方法提取购于中药市场的市售天麻样品 DNA,微量核酸蛋白仪测定 DNA 溶液浓度,并将市售样品 DNA 溶液分别用灭菌 ddH_2O 稀释至 $100 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 和 $10 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$,按照“2.4”项和“2.5”项下检测体系进行扩增检测,比较 2 种方法检测结果是否一致。结果如图 5 所示,ERA 检测方法在 180 bp 处出现单一明亮条带

的为正品,而 PCR 检测方法在 178 bp 处出现单一明亮条带的为正品,无扩增条带的为伪品以及阴性对照,2 种方法所得的检测结果一致。



M. marker N. 阴性对照 (negative control) 1. S1 2. S2 3. S3 4. S4 5. S5 6. S6 7. S7 8. S8 9. S9 10. S10 11. S11 12. S12 13. S13 14. S14 15. S15

A. ERA 市售电泳图 (ERA commercially available electropherograms)

B. PCR 市售电泳图 (PCR commercially available electropherogram)

图 5 市售样品 S1 ~ S15 的琼脂糖凝胶电泳图谱

Fig. 5 Agarose gel electrophoresis profiles of commercially available samples S1 - S15

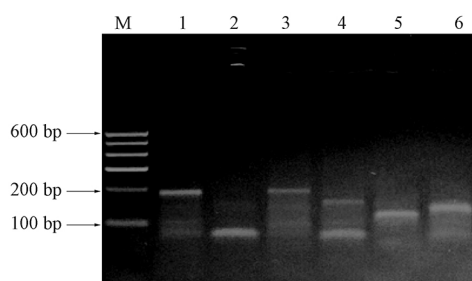
3 讨论

3.1 ERA 最佳引物的筛选

根据所设计的 6 对 ERA 引物进行组合筛选,分别建立不同的扩增体系,采用“2.5”项下检测体系进行扩增,选取能扩增出单一明亮条带的引物进行试验摸索和特异性验证。结果图 6 所示,引物 F1/R2 未出现目的条带且出现非特异性扩增,F2/R2 出现目的条带,但也出现非特异性扩增,故舍弃这 2 对引物,而引物 F1/R1、F2/R1、F3/R3、F3/R4 均出现 1 条单一目的条带,由于引物 F1/R1 扩增效率较高,条带更为明亮,故本试验优先选择扩增产物长度为 180 bp 的引物即 F1/R1 进行后续试验验证。

3.2 ERA 最适反应温度的摸索

将天麻对照药材 DNA 溶液浓度稀释至 $10 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$,采用“2.5”项下检测体系,将反应管分别至于 33、37、39、40、41、43、45 °C 的恒温仪中恒温孵育,反应结束后立即终止反应,并取 ERA 扩增产物溶液 $10 \mu\text{L}$ 加入试剂盒中自带的 Loading Buffer $1.5 \mu\text{L}$ 于 $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育 5 min。反应结束后采用“2.6”项下方法观察

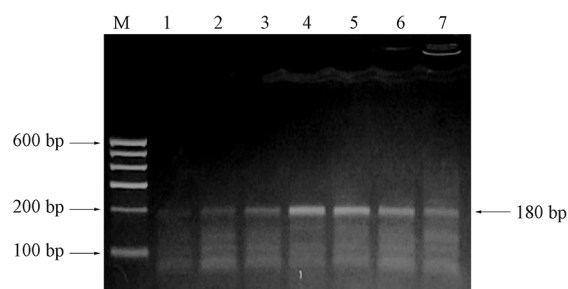


M. marker N. 阴性对照 (negative control) 1. F1/R1 2. F1/R2 3. F2/R1 4. F2/R2 5. F3/R3 6. F3/R4

图 6 6 对引物用于天麻对照药材核酸 ERA 扩增产物凝胶电泳结果
Fig. 6 Gel electrophoresis results of nucleic acid ERA amplification products of six primer pairs for Gastrodiae Rhizoma reference crude drug

结果,选择最适反应温度。

如图 7 所示,在 37 ~ 45 °C 下均扩增出目的条带,1 ~ 3 泳道由于温度较低,导致 ERA 扩增效率不高;4、5 泳道扩增产物相对更稳定,条带单一明亮,但在 43 °C 以后,随着温度的升高扩增效率逐渐降低,所以确定天麻 ERA 最适反应温度为 40 °C。



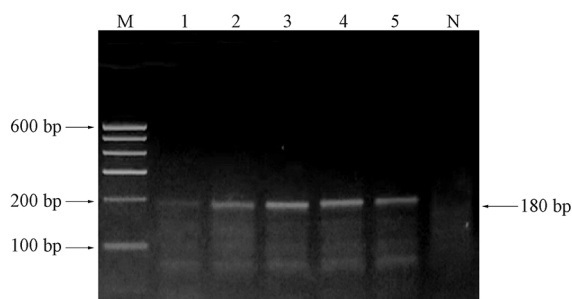
M. marker N. 阴性对照 (negative control) 1. 33 °C 2. 37 °C 3. 39 °C 4. 40 °C 5. 41 °C 6. 43 °C 7. 45 °C

图 7 不同反应温度天麻 ERA 扩增产物凝胶电泳结果
Fig. 7 Gel electrophoresis results of ERA amplification products of Gastrodiae Rhizoma at different reaction temperatures

3.3 ERA 最佳反应时间的摸索

采用“2.5”项下反应体系,分别在扩增时间为 10、15、17、19、20 min 时取出反应管,将反应管放置于冰盒中终止反应,取 ERA 扩增产物溶液 $10 \mu\text{L}$ 加 Loading Buffer $1.5 \mu\text{L}$ 于 $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育 5 min。反应结束后采用“2.6”项下方法观察结果,选择最佳反应时间。

如图 8 所示,在反应时间为 10 min 时,可见目的条带但不清晰,在 15 min 以后,随着时间的延长 ERA 产物扩增效率变化不大,在第 3 泳道时条带更为明亮,故确定最佳反应时间为 17 min。



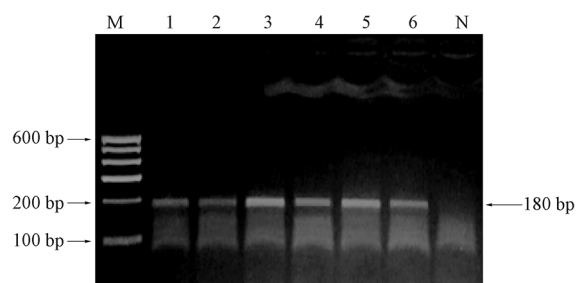
M. marker N. 阴性对照(negative control) 1. 10 min 2. 15 min
3. 17 min 4. 19 min 5. 20 min

图8 不同反应时间天麻 ERA 扩增产物凝胶电泳结果

Fig. 8 Gel electrophoresis results of ERA amplification products of *Gastrodiae Rhizoma* at different reaction time

3.4 ERA 最适引物量的摸索

采用“2.5”项下检测体系,在说明书推荐的引物量范围内,设置 1.6、1.8、2.0、2.2、2.4、2.5 μL 共 6 个引物变量,将反应管置于恒温仪中孵育,反应结束后取 ERA 扩增产物溶液 10 μL 加入 Loading Buffer 1.5 μL 于 60 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 5 min。采用“2.6”项下方法观察结果,以确定体系的最佳引物量。结果如图 9 所示,随着引物量的升高扩增效率无太大变化,但在第 3 泳道时条带更为明亮,故确定最佳引物量为 2.0 μL 。



M. marker N. 阴性对照(negative control) 1. 1.6 μL 2. 1.8 μL
3. 2.0 μL 4. 2.2 μL 5. 2.4 μL 6. 2.5 μL

图9 不同引物量天麻 ERA 扩增产物凝胶电泳结果

Fig. 9 Gel electrophoresis results of ERA products of *Gastrodiae Rhizoma* with different primer amounts

4 小结

天麻又名赤箭、合离草、水洋芋等,无根无叶,常以地下块茎入药,市场上的天麻混伪品种类繁多,伪品的掺入严重贻误了疾病治疗。ERA 因其具备进口 RPA 所具有的鉴定优势且成本较低,因而备受关注。本研究基于天麻及其常见伪品的 ITS2 基因组序列设计多对 ERA 鉴别引物,由于目前尚没有专门的软件

用于 ERA 的引物设计^[16-17],所以需要经过大量的试验进行引物筛选优化,最终找到特异性较高的 F1/R1 这对引物。通过对 ERA 反应体系的优化,最终确定该体系的最适反应温度为 40 $^{\circ}\text{C}$,最佳反应时间为 17 min,与试剂盒推荐的温度、时间稍有不同,但相对于普通 PCR,ERA 技术使检测时间大幅缩短。

本研究基于 PCR、ERA 2 种方法平行检测,特异性结果表明,所设计的天麻 PCR、ERA 引物与常见伪品紫茉莉根、天花粉、大丽菊块茎间无交叉反应,这 2 种方法均表现出良好的特异性。敏感性结果表明,ERA 检测灵敏度比 PCR 高 1 000 倍,可达 pg 级。通过这 2 种检测方法分别对市售的 15 份天麻样品进行检测,其中样品 3、7、12 未出现目的条带,判定为伪品,2 种检测方法均与吉林国安药业有限公司质量研发部曲永梅中药师鉴定结果完全一致,表明所建立的 ERA 方法准确率较高。本试验应用的是基础型 ERA 核酸扩增试剂盒,需要通过琼脂糖凝胶电泳观察结果,由于 ERA 是一类多酶反应体系,在进行核酸电泳观察结果时需要进行纯化,否则会堵塞胶孔,导致核酸无法跑出。本试验使用的是试剂盒中自带的 Loading Buffer 进行纯化处理,效果略次于试剂盒法的纯化。由于所设计的 PCR 与 ERA 产物片段大小相近,只相差 2 bp,在结合终点法琼脂糖凝胶电泳定性观察检测结果时,根据目的条带出现的位置并不能将 2 者明显的区分开,但 PCR 与 ERA 是 2 种不同的检测方法,本试验中 ERA 的扩增产物会在目的条带的下方出现弥散条带,而 PCR 的产物条带单一,根据这一特征可以确定 ERA 与 PCR 产物。试剂盒的基础扩增试剂是八连管的设计,在混匀离心的过程中,如未紧密扣严,易产生污染,这也是该技术的弊端,所以在使用 ERA 技术结合终点法进行检测时,必须遵循严格的污染控制措施,在打开反应管盖时务必对扩增产物做降温处理,平衡内外大气压差以降低气溶胶污染引起的假阳性风险。为了避免交叉污染,建议将试剂配置区与扩增分析区分隔开,本试验过程中就有一伪品曾多次出现假阳性的情况。当试验环境已存在污染,建议多次使用消毒液或者 75% 的酒精对试验区域进行彻底消毒,同时使用新的扩增试剂。

综上,本试验基于 ERA 技术初步建立了一种可快速、定性鉴别天麻真伪的方法,该技术不需要昂贵的仪器设备,且操作简单。后续考虑设计引物探针,将 ERA 技术与侧向流试纸条技术相结合,实现

偏远地区现场的快速检测,或应用 RT-ERA 方法来规避气溶胶污染的问题,继续为道地药材天麻的真伪鉴别提供新的技术手段。

参考文献

- [1] 黄颖,唐靖雯,田兴中,等. 五种不同品系或产地天麻冻干粉抗惊厥及神经保护作用研究[J]. 时珍国医国药, 2021, 32(8):1996
HUANG Y, TANG JW, TIAN XZ, *et al.* Anticonvulsant and neuroprotective effects of lyophilized powder of five different strains of asparagus of different origins[J]. *Lishizhen Med Mater Med Res*, 2021, 32(8):1996
- [2] 徐帮会,徐剑,张永萍,等. 天麻 HPLC 指纹图谱及镇痛活性的谱效关系研究[J]. 中药材, 2019, 42(11):2588
XU BH, XU J, ZHANG YP, *et al.* Correlation analysis between HPLC fingerprint and analgesic activity of *Gastrodia elata*[J]. *J Chin Med Mater*, 2019, 42(11):2588
- [3] 许鑫,周欣,楚世峰,等. 天麻素治疗缺血性脑卒中导致神经元死亡的作用机制研究[J]. 中国药理学通报, 2020, 36(11):1581
XU X, ZHOU X, CHU SF, *et al.* Study on the mechanism of gastrodin in the treatment of neuronal death caused by ischemic stroke[J]. *Chin Pharmacol Bull*, 2020, 36(11):1581
- [4] 张大燕,文欢,王伟,等. 天麻对帕金森小鼠神经元保护作用机制的转录组学分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(16):73
ZHANG DY, WEN H, WANG W, *et al.* Transcriptome analysis of protective mechanism of *Gastrodiae Rhizoma* on neurons of parkinson mice[J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*, 2018, 24(16):73
- [5] 虞小静,张冬月,李思雨,等. 天麻水提物 HPLC 指纹图谱的建立及其真伪鉴别[J]. 中成药, 2018, 40(12):2698
YU XJ, ZHANG DY, LI SY, *et al.* Establishment of HPLC fingerprints and identification of aqueous extract from *Gastrodia elata*[J]. *Chin Tradit Pat Med*, 2018, 40(12):2698
- [6] 于碧岩,于福同,王贺. 利用稳定同位素技术鉴定天麻真伪[J]. 中华中医药学刊, 2020, 38(9):186
YU BY, YU FT, WANG H. Identification of authenticity of *Tianma*(*Gastrodia elata* Bl) by stable isotope technique[J]. *Chin Arch Tradit Chin Med*, 2020, 38(9):186
- [7] 方宣启,汪霞丽,王芳斌,等. 非线性化学指纹图谱鉴别天麻真伪及产地[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(17):4693
FANG XQ, WANG XL, WANG FB, *et al.* Identification of the authenticity and origin of *Gastrodia elata* Bl. by non-linear chemical fingerprint[J]. *J Food Saf Qual*, 2018, 9(17):4693
- [8] 李松梅,孙红洋,罗静,等. 基于 ITS2 条形码的天麻及其伪品 DNA 分子鉴定[J]. 贵州中医药大学学报, 2023, 45(1):28
LI SH, SUN HY, LUO J, *et al.* Molecular identification of *Gastrodia elata* and its counterfeit DNA based on ITS2 barcode[J]. *J*
- Guizhou Univ Tradit Chin Med, 2023, 45(1):28
- [9] 王慧芳,喻勇新,李晨虹,等. 重组酶聚合酶扩增反应结合侧流层析试纸条技术快速鉴别大西洋鲑鱼制品真伪[J]. 食品与发酵工业, 2022, 48(17):291
WANG HF, YU YX, LI CH, *et al.* Real-time characterization of Atlantic cod by recombinase polymerase amplification coupled lateral flow dipstick(RPA-LFD)[J]. *Food Ferment Ind*, 2022, 48(17):291
- [10] 魏晓通,周宇航,刘扬,等. 酶促恒温扩增技术快速鉴定食品中牡蛎成分[J]. 食品科技, 2022, 47(11):255
WEI XT, ZHOU YH, LIU Y, *et al.* Rapid identification of oyster components in food by enzymatic recombinase amplification[J]. *Food Sci Technol*, 2022, 47(11):255
- [11] 沈泓,袁媛,陈碧莲,等. 基于重组酶介导扩增技术的水牛角快速现场鉴别方法[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(17):130
SHEN H, YUAN Y, CHEN BL, *et al.* On-site identification of medicinal Bubali Cornu by recombinase-mediated amplification technique[J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*, 2019, 25(17):130
- [12] 张森豪,王雪莹,蔡李萌,等. 猪流行性腹泻病毒重组酶聚合酶扩增快速诊断方法的建立和应用[J]. 畜牧兽医学报, 2023, 54(6):2498
ZHANG SH, WANG XY, CAI LM, *et al.* Establishment and application of rapid diagnosis method for RPA of porcine epidemic diarrhoea virus[J]. *Acta Vet Zootech Sin*, 2023, 54(6):2498
- [13] 陈德强,孙碧莲,李海登,等. 简单单尖端线虫重组酶聚合酶等温扩增检测方法的建立[J]. 中国食品工业, 2023(2):73
CHEN DQ, SUN BL, LI HD, *et al.* Establishment of an isothermal amplification method for the detection of *Anisakis simplex* recombinase polymerase[J]. *China Food Ind*, 2023(2):73
- [14] 于继彬,李俊,马陈翠,等. 一种常温核酸扩增反应:中国, CN109971834A[P]. 2019-07-05
YU JB, LI J, MA CC, *et al.* A Room Temperature Nucleic Acid Amplification Reaction: China, CN109971834A[P]. 2019-07-05
- [15] PIEPENBURG O, WILLAMS CH, ARMES NA, *et al.* Recombinase Polymerase Amplification: US, US2005112631[P]. 2005-5-26
- [16] 史贇学,王鑫,王峻,等. 重组酶恒温扩增技术在动植物源成分分析中的应用与研究进展[J/OL]. 中国食品卫生杂志 [2024-02-21]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3156.R.20221031.1159.002.html>
SHI YX, WANG X, WANG J, *et al.* Application and research progress of recombinase isothermal amplification technology in the analysis of animal and plant source components[J/OL]. *Chin J Food Hyg* [2024-02-21]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3156.R.20221031.1159.002.html>
- [17] LI J, MACDONALD J, STETTEN FV. Review: a comprehensive summary of a decade development of the recombinase polymerase amplification[J]. *Analyst*, 2019, 144(1):31

(本文于2023年7月14日收到)