



GCMTI RD-4:2026

利用聚合酶链式反应
限制性片段长度多态性
鉴别桃儿七

政府中药检测中心方法



利用聚合酶链式反应限制性片段长度多态性鉴别桃儿七

1 引言

1.1 本方法载列利用聚合酶链式反应限制性片段长度多态性（polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism，简称PCR-RFLP）鉴别桃儿七（*Sinopodophyllum hexandrum* (Royle) Ying）。

注：*Podophyllum emodi* (Wall.) Ying 是*Sinopodophyllum hexandrum* (Royle) Ying的异名。

1.2 桃儿七为小檗科桃儿七属植物。根据《中医药条例》（第549章）及香港中药材标准，药材鬼臼（桃儿七）为植物桃儿七的干燥根和根茎。

1.3 鬼臼的主要混淆品包括威灵仙和龙胆。威灵仙的主要来源为毛茛科植物威灵仙 *Clematis chinensis* Osbeck、棉团铁线莲 *Clematis hexapetala* Pall. 和东北铁线莲 *Clematis manshurica* Rupr. 的干燥根和根茎；龙胆的主要来源为龙胆科植物龙胆 *Gentiana scabra* Bge 或坚龙胆 *Gentiana rigescens* Franch 的干燥根和根茎。由于鬼臼及其混淆品外观相似，因此过往曾发生误将鬼臼当作威灵仙或龙胆服用的中毒事件。

1.4 本方法包含两个分别使用不同引物的测试：

1.4.1 内部阳性扩增对照测定法（internal positive amplification control assay，简称 IPAC）用于确保所测试样本的基因组DNA是可扩增的。IPAC利用通用引物进行聚合酶链式反应（polymerase chain reaction，简称PCR），与植物的部分叶绿体 DNA 区域结合，并呈现阳性扩增。

1.4.2 鉴别测定法（differentiation test，简称 DT）首先利用引物进行PCR，与叶绿体DNA区域ATP synthase CF0 subunit I（简称*atpF*）结合，然后以限制酶*EcoRI*进行限制性消化，产生桃儿七特异性的脱氧核糖核酸（Deoxyribonucleic acid，简称DNA）图谱。

1.5 本方法分为以下步骤：IPAC和DT：（1）样本制备和DNA提取；（2）PCR扩增目标DNA区域；（3）凝胶电泳分析PCR产物；DT：（4）限制性消化PCR产物；（5）凝胶电泳分析限制性消化后的PCR产物。

1.6 本方法适用于完整的原药材。

2 安全预防措施

- 2.1 本方法涉及使用危险物品。使用者有责任在处理相关物品时，根据物质安全数据表采取适当的防护措施，并戴上护眼及护手装备。如有需要，在抽气柜或生物安全柜进行分析。

3 试剂及材料

- 3.1 在可行的情况下，所使用的化学品或试剂须为分子生物或PCR等级。分析用水必须为分子生物等级。在可行的情况下，所使用的化学品、试剂及水须进行高压灭菌。操作人员须全程戴上无粉手套。建议使用含滤芯的移液器吸头以避免交叉污染。制备PCR试剂的层流柜，必须提供高效能空气微粒子过滤的单向空气，以防止污染。
- 3.2 《补充数据》载有本方法进行验证时所使用的试剂及材料，以供参考。

4 器具

- 4.1 《补充数据》载有本方法进行验证时所使用的仪器及器具，以供参考。

5 一般步骤

《补充数据》载有完整的实验步骤。对照应按第7段所述与样本同步进行检测，以检查分析试剂或样本之间有否出现DNA污染。

5.1 配制样本

- 5.1.1 配制样本、提取阳性对照（EPC，参考第7.1段）及提取空白对照（EBC，参考第7.2段）。继续第5.2段。

5.2 DNA提取

- 5.2.1 为取得质量足以进行PCR分析的DNA提取物，建议从药材中去除以下成分：

5.2.1.1 核糖核酸（RNA）；

5.2.1.2 多糖，例如纤维素、淀粉；

5.2.1.3 蛋白质；

5.2.1.4 脂质；以及

5.2.1.5 色素，例如酚类化合物。

- 5.2.2 使用分光亮度法计算DNA提取物的量，然后把DNA浓度均一化。继续第5.3段。

5.3 PCR分析

5.3.1 以PCR阴性对照（PNC，参考第7.3段）作为对照，对样本、EPC和EBC的DNA（参考第5.2.2段）进行PCR，扩增目标DNA区域。《补充资料》载有建议的引物对及PCR条件。

5.3.2 完成PCR后，使用凝胶电泳法检查PCR产物的谱带长度及数目。

5.4 限制性消化分析

5.4.1 以限制性消化阴性对照（RDNC，参考第7.4段）作为对照，对样本和EPC的PCR产物进行限制性消化。《补充资料》载有建议的限制酶及限制性消化条件。

5.4.2 完成限制性消化后，使用凝胶电泳法检查限制性消化产物的谱带长度及数目。

6 结果分析

6.1 为确定样本是否桃儿七，样本必须于内部阳性扩增对照测定法（IPAC）（参考第6.1.1段）和鉴别测定法（DT）（参考第6.1.2段）均应呈现阳性扩增。若其中任何一项测试结果为阴性，则无法确定样本为桃儿七。

6.1.1 IPAC的结果分析是透过检视PCR分析所得的DNA谱带图谱，确定所测试样本的基因组DNA是否可扩增的：

| | PCR 分析所得的 DNA 谱带图谱 | 结果 |
|-----|--------------------|----|
| (a) | 1 条谱带，长度约 130 个碱基对 | 阳性 |
| (b) | 无谱带 | 阴性 |

6.1.2 DT的结果分析是透过检视限制性消化分析所得的DNA谱带图谱，区分桃儿七与其混淆品种（包括威灵仙、东北铁线莲、棉团铁线莲、龙胆、坚龙胆）：

| | 物种 | 限制性消化分析所得的 DNA 谱带图谱 | 结果 |
|-----|---|---------------------------------|----|
| (a) | (1) 桃儿七 (<i>S. hexandrum</i>) | 2 条谱带，长度分别约 180 个碱基对及约 260 个碱基对 | 阳性 |
| (b) | (1) 威灵仙 (<i>C. chinensis</i>) (2) 东北铁线莲 (<i>C. manshurica</i>) (3) 棉团铁线莲 (<i>C. hexapetala</i>) (4) 龙胆 (<i>G. scabra</i>) (5) 坚龙胆 (<i>G. rigescens</i>) | 1 条谱带，长度约 440 个碱基对 | 阴性 |

6.2 质量控制

- 6.2.1 当重复样本在PCR分析或限制性消化分析中出现不一致的结果时，表明样本只含有少量目标DNA，可能触及检测下限。对于不确定的数据，须重复分析以确认检测结果。
- 6.2.2 品质控制参数（包括EPC、EBC、PNC、RDNC）须在PCR分析中获得预期的扩增（参考第6.3段），以及须在限制性消化分析中获得预期的PCR产物切割（参考第6.4段），以确保测试结果有效。控制参数须显出第7段所述的预期表现，若任何控制参数的结果跟其预期表现不一致，须重复分析。

6.3 PCR分析的扩增

- 6.3.1 须以目视方式检查PCR分析中获得的DNA谱带来评估扩增。
- 6.3.2 当观察到符合列定长度的DNA谱带（参考S6—IPAC：约130个碱基对；DT：约260个碱基对）时，扩增被视为阳性。
- 6.3.3 当观察不到符合列定长度的DNA谱带（参考第6.3.2段）时，扩增被视为阴性。
- 6.3.4 当样本和EPC的扩增是阴性，表示：
- 6.3.4.1 在DNA提取过程中，可能同时分离出存在于样本基质内的抑制物。在这种情况下，浓度均一化后的DNA（参考第5.2.2段）在加入PCR预混液前须进行稀释，并须重复PCR分析；或进一步纯化DNA提取物（参考第5.2.1段）（参见S3）及浓度均一化纯化后的DNA提取物，并须重复PCR分析；或
- 6.3.4.2 DNA提取物（参考第5.2段）可能已严重降解或被破坏，导致可扩增的DNA（参考第5.2.2段）量低于检测下限。在这种情况下，须重复PCR分析，并增加浓度均一化的DNA（参考第5.2.2段）的投入量。
- 6.3.5 若执行了第6.3.4.1段或第6.3.4.2段的措施后，PCR分析的扩增仍维持阴性，须中止分析。待修正问题后重新开始分析。

6.4 限制性消化分析的PCR产物切割

- 6.4.1 须以目视检查限制性消化分析中获得的DNA谱带来评估PCR产物切割。
- 6.4.2 当观察到1条长度约180个碱基对和1条长度约260个碱基对的DNA谱带时，PCR产物切割被视为阳性。
- 6.4.3 当出现以下情况，PCR产物切割被视为阴性：

6.4.3.1 观察不到1条长度约180个碱基对和1条长度约260个碱基对的DNA谱带，但却观察到1条长度约440个碱基对的DNA谱带；或

6.4.3.2 观察不到任何DNA谱带。

6.4.4 当在样本和EPC观察不到DNA谱带（参考第6.4.3.2段），这可能表明PCR产物的投入量低于检测下限。在这种情况下，须重复限制性消化分析，并增加PCR产物的投入量。

7 质量控制参数

测试的分析性能是根据质量控制标准来进行评估，以确保分析结果可接受，并且满足方法的目的。为确保符合质量控制计划，根据DNA分析人员的合理的处理能力，使用者应决定在每批次的适当样本数量。每批样本或每15个样本（以较少者为准）须执行以下系统控制。

7.1 提取阳性对照（EPC）：至少1个桃儿七的参考物质须纳入分析，数量以2个为佳。作为阳性对照，EPC须于整个分析程序与样本一同处理。

可接受标准：预期的观察结果须为：

7.1.1 PCR分析的扩增为阳性；及

7.1.2 限制性消化分析的PCR产物切割为阳性。

7.2 提取空白对照（EBC）：至少1个提取空白对照须纳入分析，数量以2个为佳。作为空白对照，EBC须于DNA提取过程中与样本一同处理。

可接受标准：PCR分析的扩增须为阴性。

7.3 PCR阴性对照（PNC）：至少1个PCR阴性对照（在PCR分析中以水代替DNA）须纳入分析，数量以2个为佳。

可接受标准：PCR分析的扩增须为阴性。

7.4 限制性消化阴性对照（RDNC）：作为切割空白对照，至少1个限制性消化阴性对照（在限制性消化分析中以水代替PCR产物）须纳入分析，数量以2个为佳。

可接受标准：限制性消化分析的PCR产物切，不得顯出DNA譜帶（参考第6.4.3.2段）。割须为阴性。

7.5 至少1个随机的重复样本对照须纳入分析，并须于整个分析程序与样本一同处理。

可接受标准：样本与重复样本的分析结果须为一致。

7.6 质量控制结果不符合上述规定的可接受标准时，须重新进行分析，直至符合标准。否则应停止分析。在重新开始分析前识别并解决问题。

8 参考数据

- 8.1 Chen, S., Yao, H., Han, J., Liu, C., Song, J., Shi, L., Zhu, Y., Ma, X., Gao, T., Pang, X., Luo, K., Li, Y., Li, X., Jia, X., Lin, Y., & Leon, C. (2010). Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species. *PloS one*, 5(1), e8613.
- 8.2 Fatima, T., Srivastava, A., Hanur, V. S., & Rao, M. S. (2018). An Effective Wood DNA Extraction Protocol for Three Economic Important Timber Species of India. *American Journal of Plant Sciences*, 09(02), 139-149.
- 8.3 Government Chinese Medicines Testing Institute, Department of Health, Government of Hong Kong Special Administrative Region. (2008-2013). *Hong Kong Chinese Materia Medica Standards (HKCMMS)*. (Vol. 2, 6, 8). Chinese Medicine Division, Department of Health, Government of Hong Kong Special Administrative Region.
- 8.4 Ivanova, N. V., Dewaard, J. R., & Hebert, P. D. N. (2006). An inexpensive, automation-friendly protocol for recovering high-quality DNA. *Molecular Ecology Notes*, 6(4), 998-1002.
- 8.5 National Pharmacopoeia Commission. (2025). *Pharmacopoeia of the People's Republic of China* (2025 ed., Vol. 1). China Medical Science Press.
- 8.6 Thakur, V. V., Tiwari, S., Tripathi, N., & Tiwari, G. (2019). Molecular identification of medicinal plants with amplicon length polymorphism using universal DNA barcodes of the *atpF-atpH*, *trnL* and *trnH-psbA* regions. *3 Biotech*, 9(5), 188.
- 8.7 Wang, L., Hu, W., Huang, Z., Zhou, Z., Chen, N., Li, Y., Hu, Y., Yang, F., Shen, C., Lou, Q., Xin, T., & Pu, X. (2025). Species-specific PCR and HRM assays targeting chloroplast *atpF* gene enable rapid authentication of *Lysimachia christinae* and detection of adulteration in commercial herbal products. *Industrial Crops and Products*, 234, 121587.
- 8.8 Wang, X., Zhang, Z., Shi, Y., Man, J., Huang, Y., Zhang, X., Liu, S., He, G., An, K., Amu, L., Chen, W., Liu, Z., Wang, X., & Wei, S. (2024). Population identification and genetic diversity analysis of *Fritillaria ussuriensis* (Fritillaria) based on chloroplast genes *atpF* and *petB*. *Journal of Applied Genetics*, 65(3), 453-462.
- 8.9 Watanabe, T., Akiyama, H., Maleki, S., Yamakawa, H., Iijima, K., Yamazaki, F., Matsumoto, T.,

- Futo, S., Arakawa, F., Watai, M., & Maitani, T. (2006). A specific qualitative detection method for peanut (*Arachis hypogaea*) in foods using polymerase chain reaction. *Journal of Food Biochemistry*, 30(2), 215-233.
- 8.10 Yao, H., Song, J., Liu, C., Luo, K., Han, J., Li, Y., Pang, X., Xu, H., Zhu, Y., Xiao, P., & Chen, S. (2010). Use of ITS2 Region as the Universal DNA Barcode for Plants and Animals. *PLoS One*, 5(10), e13102.
- 8.11 Zymo Research. (2019). *OneStep™ PCR Inhibitor Removal Kit Protocol* (Ver. 2.0.2). Zymo Research Corporation.