

特异性 PCR 鉴别朝鲜淫羊藿及其同属物种

董伟伟*, 刘闪闪, 郑光发, 吴馨琰, 蒋 宁

上海同济堂药业有限公司 上海

【摘要】目的 建立基于特异性 PCR 技术的朝鲜淫羊藿及其同属近缘物种鉴别方法, 为朝鲜淫羊藿药材鉴定与质量控制提供可靠的分子手段。**方法** 基于朝鲜淫羊藿基因组的微卫星 (STRs) 序列, 设计特异性引物; 对 PCR 反应体系中的聚合酶种类、退火温度、循环数、引物用量及不同 PCR 仪进行考察优化; 验证方法的检出限、适用性。**结果** 针对朝鲜淫羊藿的 STRs 序列, 设计的特异性引物可稳定扩增出 214 bp 的目标条带, 对同属其他物种无扩增, 检出限可达 3.5 ng/μL。**结论** 建立的位点特异性 PCR 鉴别方法可快速、准确鉴别朝鲜淫羊藿及其同属近缘物种, 为朝鲜淫羊藿的药材鉴定及质量控制提供了有效技术支持。

【关键词】 特异性 PCR; 朝鲜淫羊藿; 同属物种; 分子鉴别

【收稿日期】 2026 年 5 月 15 日 **【出刊日期】** 2026 年 6 月 10 日 **【DOI】** 10.12208/j.imrf.20260017

Specific PCR identification of *Epimedium koreanum* and its congeneric species

Weiwei Dong*, Shanshan Liu, Guangfa Zheng, Xinyan Wu, Ning Jiang

Shanghai Tongjitang Pharmaceutical Co., Ltd., Shanghai

【Abstract】Objective This study aimed to develop a specific PCR-based method for the discrimination of *Epimedium koreanum* from its congeneric allied species, offering a robust molecular tool for the authentication and quality assurance of *Epimedium koreanum* herbal material. **Methods** Species-specific primers were designed targeting microsatellite (STRs) sequences in the *Epimedium koreanum* genome. A comprehensive optimization of the PCR reaction system was conducted, including the evaluation of polymerase types, annealing temperatures, cycle numbers, primer concentrations, and PCR instruments. The analytical performance of the method, including detection limit and applicability, was rigorously validated. **Results** The primers specifically designed for the STRs sequences of *Epimedium koreanum* yielded a consistent 214 bp amplification product, with no cross-reactivity observed in other congeneric species. The method demonstrated a low detection limit of 3.5 ng/μL. **Conclusion** The developed locus-specific PCR method enables rapid and accurate discrimination of *Epimedium koreanum* from its congeneric allied species, providing a reliable technical platform for the authentication and quality control of *Epimedium koreanum* herbal medicine.

【Keywords】 Specific PCR; *Epimedium koreanum*; Congeneric species; Molecular identification

引言

淫羊藿作为我国传统补益类中药材, 在中医临床应用历史悠久, 具有补肾阳、强筋骨、祛风湿等功效, 广泛用于治疗阳痿遗精、筋骨痿软、风湿痹痛等病症^[1]。《中国药典》2025 年版规定, 淫羊藿的基原植物包括小檗科植物淫羊藿、箭叶淫羊藿、柔毛淫羊藿和朝鲜淫羊藿的干燥叶^[2]。然而, 淫羊藿属植物种类繁多, 不同物种在形态特征上相似度较高,

尤其是在加工成饮片后, 传统的形态鉴别方法难以准确区分, 导致市场上朝鲜淫羊藿的伪品、混淆品屡见不鲜, 严重影响临床用药的安全性和有效性^[3-4]。

传统中药鉴定方法如形态鉴别、显微鉴别和理化鉴别等, 存在主观性强、灵敏度低、鉴别周期长等局限性^[5-7], 难以满足现代中药质量控制的需求。随着分子生物学技术的发展, DNA 分子标记技术在中药鉴定领域得到广泛应用。特异性 PCR 技术基于物

*通讯作者: 董伟伟

种基因组 DNA 中的序列差异设计特异性引物, 通过 PCR 扩增反应, 根据扩增产物的有无或大小差异判断样品物种来源, 具有特异性强、操作简便、快速高效等优点^[8-10]。

目前已有多篇关于淫羊藿属分子鉴别研究^[11-14], 但尚未有淫羊藿属相关的特异性 PCR 鉴别研究报道。因此, 本研究旨在建立一种基于特异性 PCR 技术的朝鲜淫羊藿及其同属近缘物种鉴别方法, 为朝鲜淫

羊藿的药材鉴定、质量控制及市场监管提供科学依据。

1. 材料与试剂、仪器

1.1 材料

药材购于四川、贵州、安徽等地, 共有 38 批, 经上海同济堂药业有限公司质量管理部鉴定, 具体信息见表 1, 均已将标本保存于上海同济堂药业有限公司标本中心。

表 1 实验药材信息

序号	样品名称	基源	来源	数量
1	对照药材	朝鲜淫羊藿 <i>Epimedium koreanum</i> Nakai.	中国食品药品检定研究院	1
2	朝鲜淫羊藿	朝鲜淫羊藿 <i>Epimedium koreanum</i> Nakai.	安徽省亳州市、河北省安国市	20
3	淫羊藿	淫羊藿 <i>Epimedium brevicornu</i> Maxim.	中国食品药品检定研究院	3
4	柔毛淫羊藿	柔毛淫羊藿 <i>Epimedium pubescens</i> Maxim.	安徽省亳州市	3
5	箭叶淫羊藿	箭叶淫羊藿 <i>Epimedium sagittatum</i> (Sieb. et Zucc.) Maxim.	四川省	3
6	星花淫羊藿	星花淫羊藿 <i>Epimedium stellulatum</i> Stearn	贵州省	2
7	黔岭淫羊藿	黔岭淫羊藿 <i>Epimedium leptorrhizum</i> Stearn	贵州省	2
8	四川淫羊藿	四川淫羊藿 <i>Epimedium sutchuenense</i> Franch.	四川省	2
9	宝兴淫羊藿	宝兴淫羊藿 <i>Epimedium davidii</i> Franch.	四川省	2

1.2 试剂

PrimeSTAR HS DNA 聚合酶、DL1000 DNA Marker 均购自 TaKaRa 公司, 2×M5 Super FastTaq PCR MasterMix (北京聚合美生物科技有限公司), FdCycle 高保真 DNA 聚合酶、2×HyperMB Taq PCR 预混液均购自生工生物工程(上海)股份有限公司; 高效植物基因组 DNA 提取试剂盒、蛋白酶 K 购自天根生化科技(北京)有限公司, GelRed 染料和琼脂糖购自上海源叶生物科技有限公司; 引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成; 水为实验室自制超纯水。

1.3 仪器

干式恒温器(杭州奥盛仪器有限公司), 高速离心机(艾本德公司), 超微量紫外分光光度计 N60 (因普恩), 全自动样品快速研磨仪(上海净信实业发展有限公司), 微型离心机(天根生化科技(北京)有限公司), T100 PCR 仪(美国伯乐生命科技有限公司), MiniAMP Plus PCR 仪(赛默飞世尔科技公司), Sub-Cell®GT 琼脂糖凝胶电泳系统(美国伯乐生命科技有限公司), BIO-RAD 凝胶成像系统(美国伯乐生命科技有限公司)。

2 方法与结果

2.1 特异性引物设计

微卫星序列 (STRs) 作为物种鉴别核心标记, 凭借分布广、多态性高的特性, 能精准区分不同物种及种群。因此本研究通过 NCBI 数据库下载朝鲜淫羊藿的微卫星序列 (GenBank: DQ272282.1), 利用 Primer Premier5 软件, 设计鉴别引物 CX-F: 5'-CATTTACAACGCGGCCGACC-3' 和 CX-R: 5'-GCTGTGTGGATGGGGCTTTATG-3'。经特异性 PCR 扩增后, 扩增产物长度为 214 bp。

2.2 样品基因组提取

采用高效植物基因组 DNA 提取试剂盒对各批次样品的基因组 DNA 进行提取, 通过超微量紫外分光光度计进行检验, 所有批次的样品 A260/A280 均>1.8, DNA 浓度值在 50 ng/μL~95 ng/μL 之间, 并通过 1.5%的琼脂糖凝胶电泳进行检测, 确定样品 DNA 的质量较好, 适合后续研究。

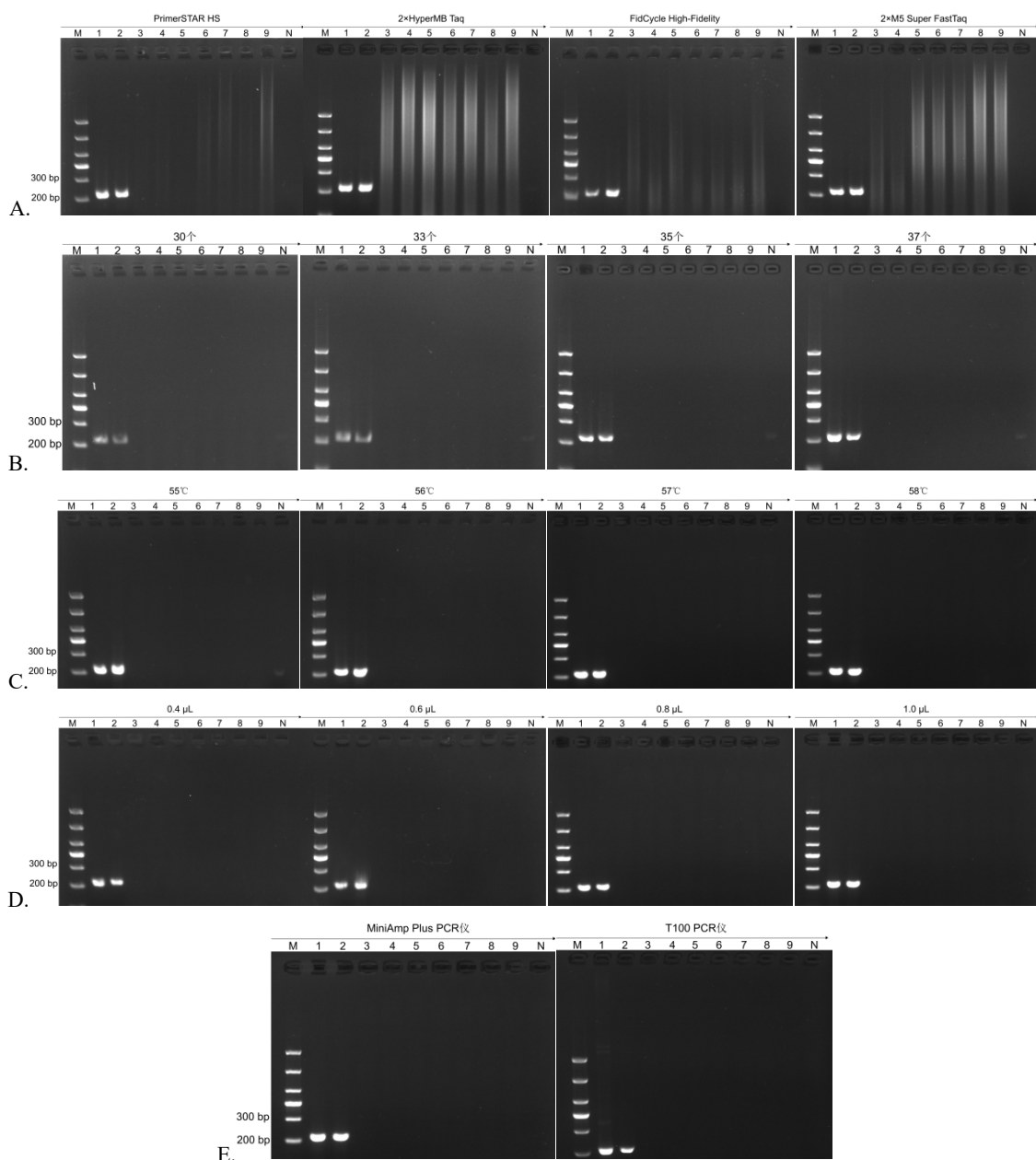
2.3 PCR 反应条件优化

反应体系为 25μL: 2×PCR 缓冲液 12.5μL, 鉴别引物 (10μmol/L) 各 0.6μL, DNA 模板 1.0μL, 高压灭菌超纯水补足至 25μL。PCR 反应参数为: 95℃预变性 5 分钟; 循环反应 33 次 (95℃ 30 秒, 55~58℃ 30 秒, 72℃ 30 秒), 72℃延伸 5 分钟。PCR 产物利用 1.5%的琼脂糖凝胶加入核酸染色剂 GelRed, 通过电泳进行检测, 并利用凝胶成像仪进

行结果观察。

为探索 PCR 反应的最佳条件, 本研究对聚合酶、

循环次数、退火温度、引物量以及不同仪器进行考察, 结果见图 1 所示。



A.不同酶, B.不同循环数, C.不同退火温度, D.不同引物量, E.不同仪器, M.DNA Marker DL 1000, 1.朝鲜淫羊藿对照药材, 2.朝鲜淫羊藿样品, 3.柔毛淫羊藿, 4.淫羊藿, 5.箭叶淫羊藿, 6.星花淫羊藿, 7.黔岭淫羊藿, 8.四川淫羊藿, 9.宝兴淫羊藿, N.空白 (ddH₂O)

图 1 朝鲜淫羊藿不同影响因素考察结果

结果表明, 用 PrimeSTAR HS DNA 聚合酶, 退火温度为 55°C~58°C, 循环数为 30~37 个、引物量为 0.4µL~1.0µL 时, 可获得朝鲜淫羊藿全部 DNA 样品的最佳扩增条带, 且伪品并未有扩增, 不同品牌 PCR 仪, PCR 扩增条带差异较小, 且空白对照均无假阳性出现, 表明该方法的耐用性较好。

3 检出限

考察朝鲜淫羊藿特异性 PCR 鉴别法的灵敏度。选择 1 批朝鲜淫羊藿的 DNA 样品, 分别稀释 1、10、100、1000、10000、100000、1000000 倍, 并测定 DNA 模板浓度, 朝鲜淫羊藿 DNA 稀释浓度见表 2。按朝鲜淫羊藿特异性 PCR 体系和扩增条件

进行扩增, 结果见图 2。

考察结果表明, 朝鲜淫羊藿的 DNA 量为 3.5ng~75ng 时, 按照优化的 PCR 条件可稳定扩增出目标条带, 且空白无干扰, 故朝鲜淫羊藿的检出限为 3.5ng。

4 适用性验证

对收集的 20 份朝鲜淫羊藿样品及 17 份同属其他物种样品进行 PCR 扩增, 结果显示, 20 份朝鲜淫羊藿样品均能扩增出特异性 DNA 片段, 而 17 份同属其他物种样品及空白对照均无特异性扩增产物, 鉴别准确率达 100%, 表明该方法具有良好的适用性, 结果见图 3 所示。

表 2 朝鲜淫羊藿 DNA 稀释浓度

稀释倍数	0	1	10	100	1000	10000	100000	1000000	10000000
DNA 浓度 (ng/μL)	75	35	3.5	0.35	0.035	0.0035	0.00035	0.000035	0.0000035

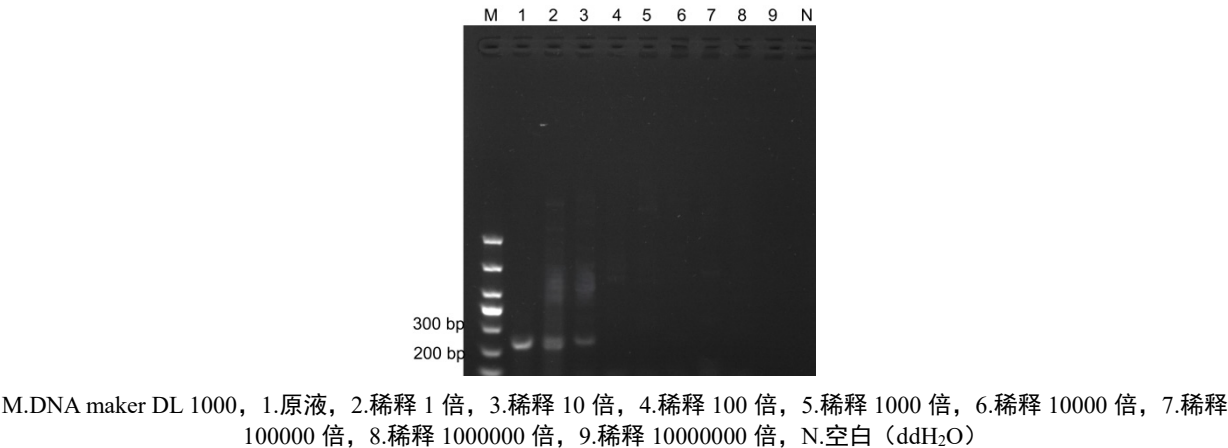


图 2 朝鲜淫羊藿特异性 PCR 检出限考察结果

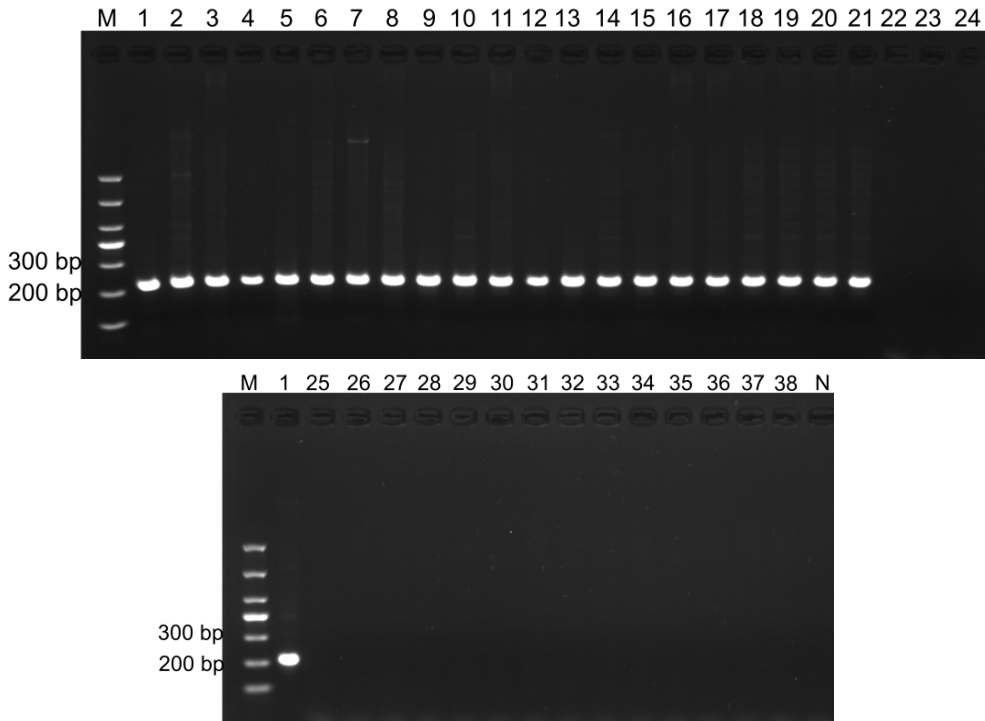


图 3 朝鲜淫羊藿特异性 PCR 适用性结果

5 讨论

5.1 特异性 PCR 技术优势

特异性 PCR 技术基于微卫星 (STRs) 序列设计特异性引物, 能够准确区分物种间的细微差异。与传统中药鉴定方法相比, 该方法不受样品形态、加工方式等因素影响, 可直接对药材基因组 DNA 进行分析, 检测周期短, 可实现高通量检测, 适用于中药材快速鉴定及质量控制。本研究建立的方法仅需少量药材样品, 2~3 小时即可完成检测, 且无需 Sanger 测序, 大大提高了鉴定效率。

5.2 引物设计与反应体系优化

引物的设计与筛选是特异性 PCR 技术的关键, 本研究通过大量序列比对筛选到朝鲜淫羊藿特有的微卫星 (STRs) 序列, 设计的特异性引物确保了鉴别准确性。同时, 对 PCR 反应体系中的聚合酶种类、退火温度、循环数、引物用量等进行优化, 确定了最佳反应条件, 保证了方法的重复性和稳定性。

5.3 方法应用前景

本研究建立的特异性 PCR 鉴别方法可快速、准确鉴别朝鲜淫羊藿及其同属近缘物种, 为朝鲜淫羊藿的药材鉴定、质量控制及市场监管提供了可靠技术手段。该方法操作简便, 不需要复杂仪器设备, 适合在中药材生产企业、药品检验机构等单位推广应用。同时, 该方法也可对其他中药品种的分子鉴定研究提供参考。然而, 本研究仅对部分淫羊藿属物种进行了鉴别, 对于淫羊藿属其他物种, 还需进一步研究验证。

参考文献

- [1] 王义翠, 彭慧霞, 夏子岚, 等. 淫羊藿苷药理作用及应用研究进展[J]. 中华中医药学刊, 2023, 41 (06): 182-186.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 一部. 北京: 中国医药科技出版社, 2025: 350-351.
- [3] 孙淑英. 淫羊藿及其混淆品、伪品的鉴别[J]. 中国中医

药现代远程教育, 2015, 13(18): 12-14.

- [4] 梁利香, 李娟, 郭亚琼. 三种常见淫羊藿伪品的鉴别[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2015, (15): 195-197+301.
- [5] 祝之友. 淫羊藿鉴别要点[J]. 中国中医药现代远程教育, 2018, 16(21): 41.
- [6] 殷少文, 田洪星. 淫羊藿鉴定技术及方法研究进展[J]. 亚太传统医药, 2017, 13(15): 38-41.
- [7] 黄衡. 淫羊藿的显微鉴别研究现状[J]. 中国中医药现代远程教育, 2010, 8 (18): 250-251.
- [8] 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): 197-205.
- [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] 曹晖, 邵鹏柱, 毕培曦. 中药分子鉴定技术与应用[M]. 人民卫生出版社: 2016: 820.
- [11] 王川易. 淫羊藿属的系统发育及药用物种的分子鉴定研究[D]. 中国协和医科大学, 2010.
- [12] 杜明凤, 李明军, 陈庆富. 淫羊藿属植物 PCR-RFLP 遗传多样性研究[J]. 中草药, 2012, 43 (03): 562-567.
- [13] Liu, Xiang et al. Genetic relationship and population genetic diversity of *Epimedium pubescens* and its related species based on ISSR and non-glandular hair characteristic[J]. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi. 2017, 42(16): 3090-3097.
- [14] 杨毅. 重庆地区淫羊藿属植物遗传多样性研究[D]. 西南大学, 2020.

版权声明: ©2026 作者与开放获取期刊研究中心(OAJRC)所有。本文章按照知识共享署名许可条款发表。

<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



OPEN ACCESS