

# 微芯片电泳MultiNA结合PCR法在 中药材真伪鉴别方面的应用 —金银花/山银花、半夏/水半夏、石斛、蕲蛇等—



# 前言

中药材对治疗疾病有很好的效果，然而近年来中药材品种混淆使用问题屡有发生，有的是名称相似易混，有的是外形相似易混，有的则因价格差故意掺混。由于不同品种中药材药效有差异，中药材品种的掺伪势必会对人们的健康造成影响。2015 版《中国药典》中明确规定了一些方剂中药品种的来源及易混淆的不同品种中药材的分别收录，如金银花和山银花，为了保证用药安全，准确地鉴定中药材的品种非常关键。目前采用感官和化学分析仪器检测中药材品种，对于某些品种难以准确测定。

由于不同的物种具有其特异性的生物遗传信息-基因，使用分子生物学手段 PCR 方法结合电泳检测手段，通过检测样品的特异性基因信息，可以实现准确鉴定品种的目的。目前，2015 版《中国药典》已收录了乌梢蛇和蕲蛇饮片、川贝母药材的 DNA 分子鉴定方法。岛津应用全自动化、且具有高分辨率的微芯片电泳仪 MultiNA，即可自动化地检测不同生物品种 PCR 产物的基因检测技术，结合 PCR 方法，目前已开发了多个易混淆中药材品种的鉴定方法：包括金银花/多种山银花、半夏/水半夏、铁皮石斛/紫苑石斛/紫皮石斛、黄喉拟水龟/乌龟/黄缘闭壳龟、川贝母、蕲蛇和乌梢蛇。

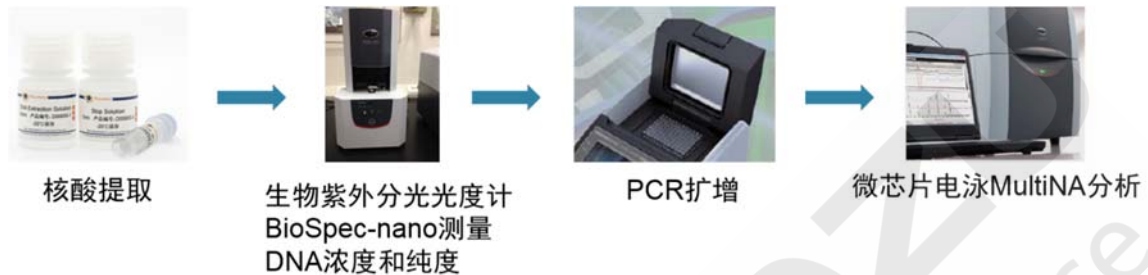
真心期待我们的努力能为您工作提供便利。

岛津企业管理（中国）有限公司



# 分析方法

微芯片电泳 MultiNA 结合 PCR 法鉴定中药材真伪主要包括以下过程：①样品基因组的提取；②提取得到的基因组浓度和纯度的测量；③特异性 PCR 引物设计和 PCR 反应；④微芯片电泳 MultiNA 检测。

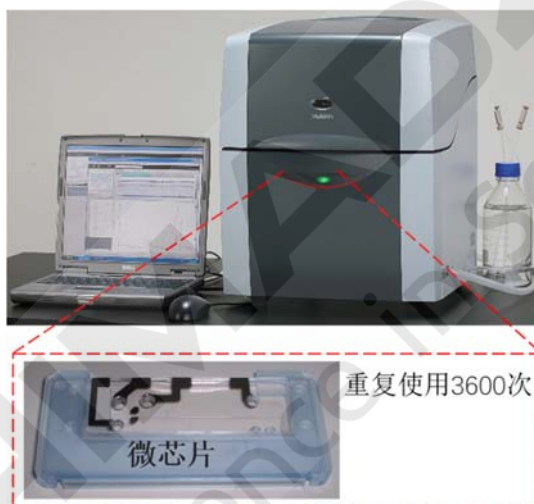


**样品基因组的提取：**目前，针对中药材基因组的提取，主要基于试剂方法或商品化的试剂盒方法。试剂方法中基于 CTAB（十六烷基三甲基溴化铵）法是一种常用的方法，CTAB 是一种阳离子去污剂，具有从低离子强度溶液中沉淀核酸的特性。在高离子强度的溶液中(>0.7 mol/L NaCl)，CTAB 与蛋白质和多聚糖形成复合物，不能沉淀核酸。通过有机溶剂抽提，去除蛋白、多糖、酚类等杂质后加入乙醇沉淀即可使核酸分离出来。商品化的试剂盒通常是基于硅胶膜小柱法，硅胶膜在高盐（如 4M 盐酸胍）低 pH（如 pH 5.0-6.5）会选择性的吸附 DNA、RNA。硅胶膜在低盐浓度高 pH（如 pH8.0）会释放 DNA、RNA。可以利用硅胶膜的这个特性，达到提取和纯化 DNA、RNA。

**基因组量和纯度的测量：**基因组提取之后，需要使用紫外分光光度计测量基因组的浓度和纯度。这是因为 DNA 和 RNA 在紫外区具有较强吸收，波长为 260 nm。而蛋白质在 280 nm 处有强吸收峰，盐和小分子则集中在 230 nm 处。岛津的生物紫外分光光度计 BioSpec-nano 根据以上原理，直接测量得到提取的 DNA 的浓度信息，且同时提供 OD260/OD280 和 OD260/OD230 的值，用于表征 DNA 的纯度。BioSpec-nano 使用时，无需使用比色皿。所需样品体积是 1 μL 或 2 μL，适合样品量少的生物样品分析，且提供测量后样品台和镜头的自动擦拭功能，使用方便。

**特异性 PCR 引物设计和 PCR 反应：**特异性 PCR 引物设计的目标区通常位于差异化的基因区域，如线粒体或核糖体 12S、16S、18S、ITS（内转录间隔区）、5SrRNA、叶绿体基因、COI（细胞色素 c 氧化酶亚基 I）区域等。根据品种特异性的基因序列，设计 PCR 引物，进行 PCR 反应。PCR 反应时，根据反应的结果调整适合的退火温度，退火温度越高，特异性越强。

**微芯片电泳 MultiNA 检测：**PCR 产物进入岛津微芯片电泳 MultiNA 检测其片段大小和浓度，从而验证 PCR 反应的效果及方法的准确性。与传统的琼脂糖凝胶电泳仪相比，微芯片电泳 MultiNA 是全自动化的电泳设备、速度更快、分辨率和灵敏度更高。微芯片流路内壁运用了新开发的涂层工艺，大大提高微芯片性能，使之可重复使用 3600 次以上。MultiNA 最多可同时放置 4 枚微芯片，每个芯片独立运行，大大提高了分析处理速度。与实时荧光 PCR 探针方法比较，MultiNA 结合普通 PCR 的鉴定方法更适合于多个品种的同时鉴定。使用实时荧光 PCR 探针方法，需要逐一加入每一种品种的探针进行 PCR 实验分析，每次实验只能鉴定一个品种是否存在，而 MultiNA 结合普通 PCR 可以实现多个品种的同时鉴定，即一次实验可提供多个品种是否存在的检测结果，大大节省了时间和分析成本。



微芯片电泳 MultiNA

# 目 录

应用微芯片电泳 MultiNA 鉴定中药材金银花和多种山银花 .....	1
微芯片电泳 MultiNA 对中药材半夏及其伪品水半夏的鉴定 .....	5
应用微芯片电泳 MultiNA 结合 PCR 法鉴别中药材铁皮石斛、紫皮石斛和紫苑石斛 .....	8
应用微芯片电泳 MultiNA 结合 PCR 法从黄缘闭壳龟和乌龟龟甲中鉴别黄喉拟水龟龟甲 .....	13
应用微芯片电泳 MultiNA 结合 PCR-RFLP 法鉴定中药材川贝母 .....	16
应用微芯片电泳仪 MultiNA 鉴定中药材蕲蛇 .....	19
应用微芯片电泳仪 MultiNA 鉴定中药材乌梢蛇 .....	23



SHIMADZU  
Excellence in Science

## 应用微芯片电泳 MultiNA 鉴定中药材金银花和多种山银花

**摘要:** 利用改进的基因提取试剂盒方法提取中药材金银花和几种山银花包括红腺忍冬、黄褐毛忍冬和灰毡毛忍冬的基因组, 基于 GenBank 金银花和山银花的基因序列差异, 分别设计金银花和山银花特异性引物, 进行 PCR 扩增, 微芯片电泳仪 MultiNA 检测扩增产物, 实验结果显示 PCR 扩增产物片段长度与预期长度基本一致。另外, 为了验证用于检测山银花的 PCR 引物的特异性, 用山银花引物扩增金银花样品, MultiNA 检测 PCR 产物, 结果未出现特征条带。本实验表明基于微芯片电泳 MultiNA 开发的方法可实现金银花和几种山银花的鉴定。

**关键词:** 微芯片电泳 MultiNA 中药材品种鉴定 金银花 山银花 忍冬 红腺忍冬 黄褐毛忍冬 灰毡毛忍冬



金银花为忍冬科植物忍冬的干燥花蕾或初开的花, 主要活性成分为绿原酸、木樨草苷等黄酮类物质。金银花临床应用非常广泛, 《中国药典》成方和制剂中药中就有 61 个方剂以金银花作为主要的组成成分, 现代药理实验证明其具有抑菌、抗炎、抗病毒、抗氧化、解热、镇痛、调节免疫、保肝、中枢兴奋和神经保护、抗心肌缺血等作用。尽管在 2005 年版《中国药典》中已明确将忍冬作为金银花唯一植物来源, 但之前各版《中国药典》根据临床疗效、地区用药习惯等, 曾先后选定忍冬、红腺忍冬、华南忍冬、水忍冬等为金银花的基原植物。且 2005 年版《中国药典》同时规定红腺忍冬、灰毡毛忍冬和黄褐毛忍冬列为山银花药材基原植物。目前, 金银花和山银花的区分是一个热点话题。

为保证用药安全, 需要准确地鉴定金银花和山银花, 然而两者的形态和化学成分高度相似, 且传统形态学和化学鉴别常受到人为或环境因素的影响。因此, 需要开发一种快速、准确地进行金银花、山银花的鉴定方法。应用分子生物学手段可以实现品种的鉴定, 其原理是不同物种具有不同的基因序列。本文根据 NCBI GenBank 中金银花和山银花的基因序列差异, 设计两者的特异性 PCR 引物。PCR 过程后, 岛津微芯片电泳 MultiNA 检测 PCR 产物。当检测样品为金银花时, 用金银花特异性引物扩增得到的 PCR 产物检测出相应条带, 尺寸与理论基本一致, 而用山银花特异性引物扩增得到的 PCR 产物未能检测出条带; 对于山银花样品, 本文检测了红腺忍冬、黄褐毛忍冬和灰毡毛忍冬样品, 用

山银花特异性引物进行以上样品的 PCR 扩增，MultiNA 检测出相应条带，且尺寸与预期相

符。这表明本文开发的方法可以成功地鉴定金银花和山银花。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器

微芯片电泳MCE-202 MultiNA

### 1.2 试剂

TaKaRa MiniBEST Plant Genomic DNA Extraction Kit (宝生物工程有限公司, 9768)

SYBR® Premix Ex Taq™ II (宝生物工程有限公司, RR820A)

SYBR® Gold Nucleic Acid Gel Stain (Invitrogen, S-11494)

1×TE Buffer

25 bp DNA Ladder (Invitrogen, 10597-011)

DNA-500 Reagent Kit for MultiNA (岛津公司, P/N 292-27910-91)

样品: 金银花、山银花样品为红腺忍冬、黄褐毛忍冬和灰毡毛忍冬。

PCR引物: 根据文献和NCBI序列, 针对金银花和山银花序列差异设计各自对应的特异性引物, 金银花的PCR目标产物长度为468 bp, 山银花的PCR目标产物长度为331 bp。

### 1.3 样品中DNA的提取与纯化

样品的基因提取和纯化基本按照 TaKaRa MiniBEST Plant Genomic DNA 操作方法中富含多糖、多酚及油脂植物材料的提取方法进行, 改动之处为开始时取样量为 50 mg, 加入 Buffer HS II 1 mL, 另外在洗脱 DNA 时, 只用 30 μL Elution Buffer 冲洗了 Spin Column 膜, 以获得高浓度的 DNA。

### 1.4 PCR反应体系

PCR反应试剂与反应条件见表1和表2。

表1 PCR反应试剂

	使用量	终浓度
SYBR® Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus) (2×)	10.0 μL	1×
PCR Forward Primer (10 μM)	0.8 μL	0.4 μM
PCR Reverse Primer (10 μM)	0.8 μL	0.4 μM
DNA 模板	2.0 μL	20 ng/μL
dH <sub>2</sub> O (灭菌蒸馏水)	6.4 μL	
总体积	20.0 μL	

表2 PCR反应参数

作用	时间/s	温度/°C
活化 DNA 活性酶和预变性	30	95
PCR (35 个循环)		
变性	30	94
退火	30	61
延伸	45	72
循环后保持	420	72

### 1.5 MultiNA检测

PCR扩增产物进入MultiNA进行测定。根据理论产物片段大小，实验中选用500 bp的试剂盒进行测定。为了验证测量的准确性，本文同时阴性对照实验，阴性对照的反应体系中以纯水代替DNA模板。

## 2 结果讨论

图1与是微芯片电泳测量金银花和山银花的PCR产物的凝胶图。实验结果显示，金银花+金银花引物的PCR产物及几种山银花+山银花引物的PCR产物都观察到了相应条带，说明基因组被成功的提取出来且PCR过程被顺利执行。另外，金银花+山银花引物未检测出目标条带，验证了用于检测山银花的PCR引物的特异性。阴性对照以纯水代替样品DNA模板，实验没有检测到相关片段，证明无假阳性检出。图2是微芯片电泳MultiNA测量金银花+金银花引物的PCR产物电泳图，实验结果显示基因片段长度为475 bp，与预期的468 bp基本一致。图3、图4和图5分别是红腺忍冬、黄褐毛忍冬和灰毡毛忍冬加入山银花山银花引物的PCR电泳图，实验结果显示基因片段长度分别为342 bp、336 bp和338 bp，由于实验时选用DNA 500试剂盒，仪器具有5%误差，与理论片段长度331 bp相比，结果合理。

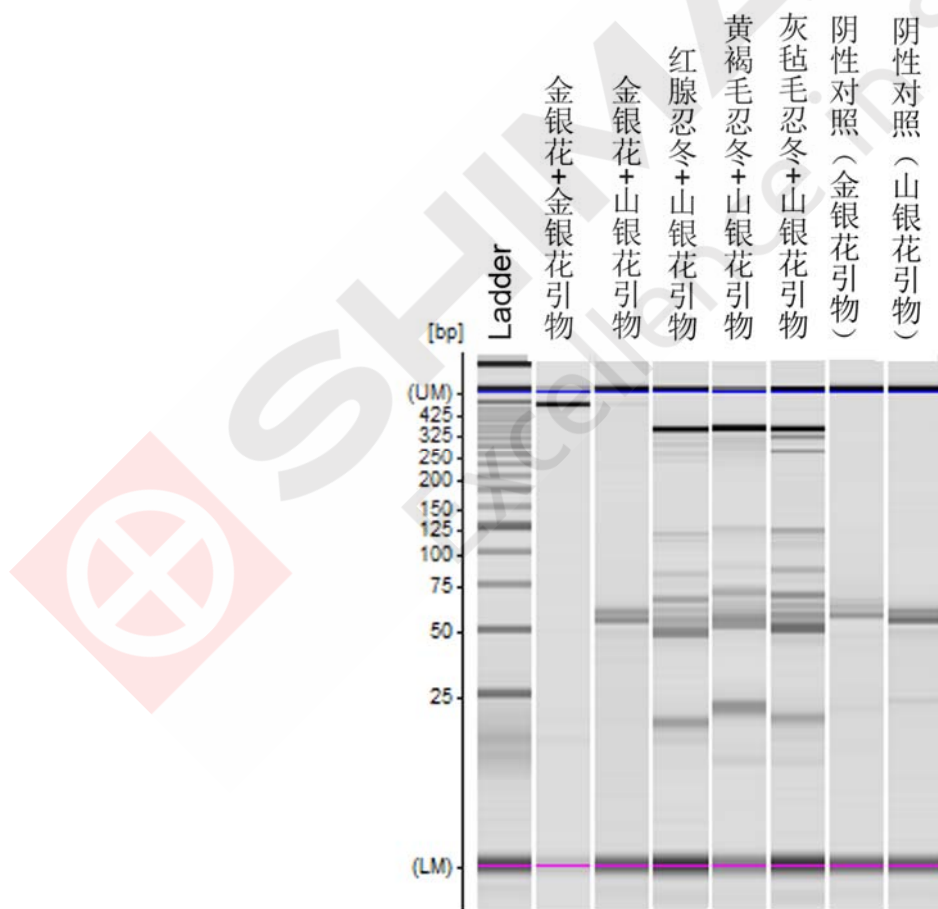


图1 微芯片电泳MultiNA检测金银花引物和山银花引物分别扩增金银花和山银花样品的PCR产物电泳图

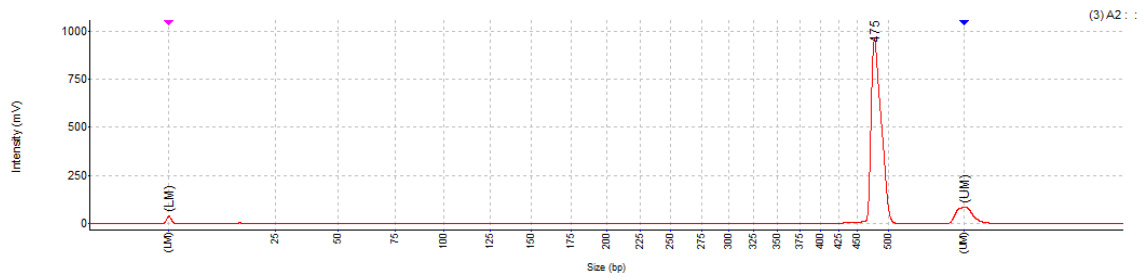


图2 微芯片电泳MultiNA测量金银花+金银花引物的PCR产物电泳图

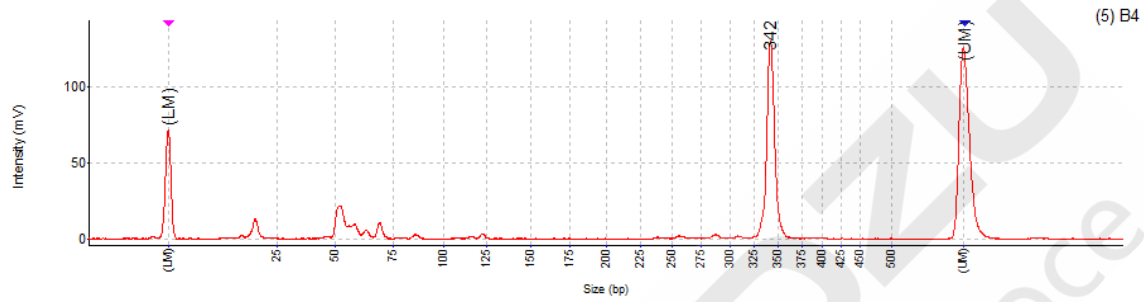


图3 微芯片电泳MultiNA测量红腺忍冬+山银花引物的PCR产物电泳图

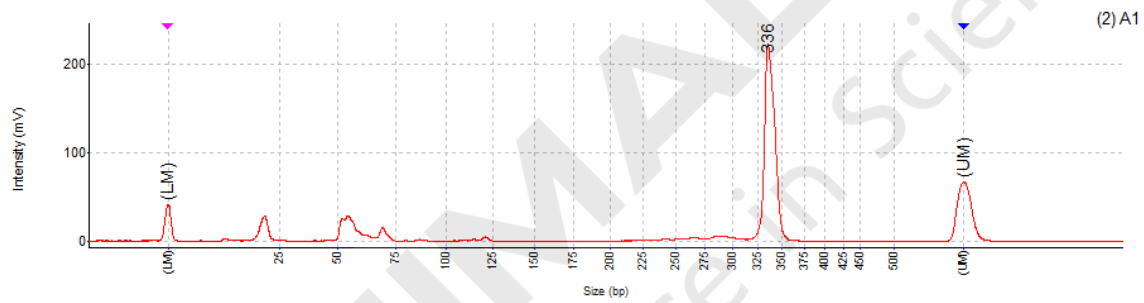


图4 微芯片电泳MultiNA测量黄褐毛忍冬+山银花引物的PCR产物电泳图

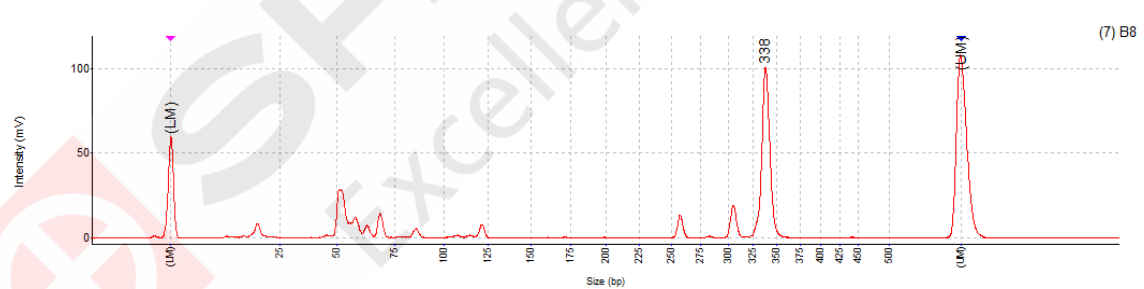


图5 微芯片电泳MultiNA测量灰毡毛忍冬+山银花引物的PCR产物电泳图

### 3 结论

本文应用岛津微芯片电泳 MCE-202 MultiNA 成功建立了鉴定金银花和山银花的方法, 本方法特异性强, 较传统的以测序仪进行基因测序方法相比, 本方法操作简单, 成本低, 速度快, 可供相关检测机构作为参考。

## 微芯片电泳 MultiNA 对中药材半夏及其伪品水半夏的鉴定

**摘要:** 使用基因提取试剂盒方法提取中药材半夏和水半夏的基因组, 基于 GenBank 半夏和水半夏的基因序列差异, 设计了半夏的特异性 PCR 引物, 取半夏和其常见的伪品水半夏进行扩增, 微芯片电泳仪 MultiNA 检测 PCR 产物, 实验结果显示只有半夏样品出现相应的条带, 水半夏样品未出现目标条带。本实验表明基于微芯片电泳 MultiNA 开发的方法可进行中药材半夏及其伪品水半夏的鉴定。

**关键词:** 微芯片电泳 MultiNA PCR 中药材品种鉴定 半夏 水半夏



中药材半夏是天南星科植物半夏的块茎, 具有燥湿化痰, 降逆止呕, 消痞散结的功能, 用于痰多咳喘, 痰饮眩悸, 痰厥头痛, 呕吐反胃, 胸脘痞闷, 梅核气等多种病。随着半夏野生资源的减少致使其掺伪现象较为严重, 如市场上常见的混淆品犁头尖属的块茎水半夏, 仅具有燥湿, 化痰的功能, 用于咳嗽痰多, 支气管炎, 其疗效远不如半夏, 但二药常相混不易分辨。两者的基源、性状、功效均不同, 尤其是价格相差很大, 大约是 8: 1, 近来, 市场上大量水半夏冒充半夏。为保证

用药安全, 需要准确地鉴定半夏及其伪品水半夏。本文基于分子生物学手段, 针对半夏和水半夏的特异性基因位点, 设计半夏的特异性 PCR 产物, PCR 过程后, 岛津微芯片电泳 MultiNA 检测 PCR 产物。实验结果显示, 当样品为半夏时, 用半夏特异性引物扩增得到的 PCR 产物检测出相应条带, 尺寸与理论高度相符, 而水半夏样品的 PCR 扩增产物, 未检测出目标条带, 表明开发的方法可以进行半夏及其伪品水半夏的鉴定。

### 1 实验部分

#### 1.1 仪器

微芯片电泳 MCE-202 MultiNA

#### 1.2 试剂

TaKaRa MiniBEST Plant Genomic DNA Extraction Kit (宝生物工程有限公司, 9768)

SYBR® Premix Ex Taq™ II (宝生物工程有限公司, RR820A)

SYBR<sup>®</sup> Gold Nucleic Acid Gel Stain

P/N 292-27910-91)

(Invitrogen, S-11494)

样品：中药材半夏和水半夏

1×TE Buffer

PCR引物：根据半夏和水半夏的基因序列区

25 bp DNA Ladder (Invitrogen, 10597-011)

别，设计半夏的特异性引物，目标产物长度

DNA-500 Reagent Kit for MultiNA (岛津公司，

为393 bp。

### 1.3 样品中DNA的提取与纯化

样品的基因提取和纯化基本按照 TaKaRa MiniBEST Plant Genomic DNA 操作方法中富含多糖、多酚及油脂植物材料的提取方法进行。

### 1.4 PCR反应体系

PCR反应试剂与反应条件见表1和表2。

表1 PCR反应试剂

	使用量	终浓度
SYBR <sup>®</sup> Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus) (2×)	10.0 μL	1×
PCR Forward Primer (10 μM)	0.8 μL	0.4 μM
PCR Reverse Primer (10 μM)	0.8 μL	0.4 μM
DNA 模板	2.0 μL	20 ng/μL
dH <sub>2</sub> O (灭菌蒸馏水)	6.4 μL	
总体积	20.0 μL	

表2 PCR反应参数

作用	时间/s	温度/°C
活化 DNA 活性酶和预变性	30	95
PCR (35 个循环)		
变性	30	94
退火	30	61
延伸	45	72
循环后保持	420	72

### 1.5 MultiNA检测

PCR扩增产物进入MultiNA进行测定。根据理论产物片段大小，实验中选用500 bp的试剂盒进行测定。为了验证测量的准确性，本文同时阴性对照实验，阴性对照的反应体系中以纯水代替DNA模板。

## 2 结果讨论

图1与是微芯片电泳MultiNA测量半夏特异性引物分别扩增半夏和水半夏样品的PCR产物凝胶图。实验结果显示，使用半夏特异性引物时，半夏样品PCR产物得到目标条带，尺寸与理论大小相符，半夏常见伪品水半夏未检测到相应条带。以上实验结果表明本方法可以将半夏和其掺伪品水半夏进行鉴别。

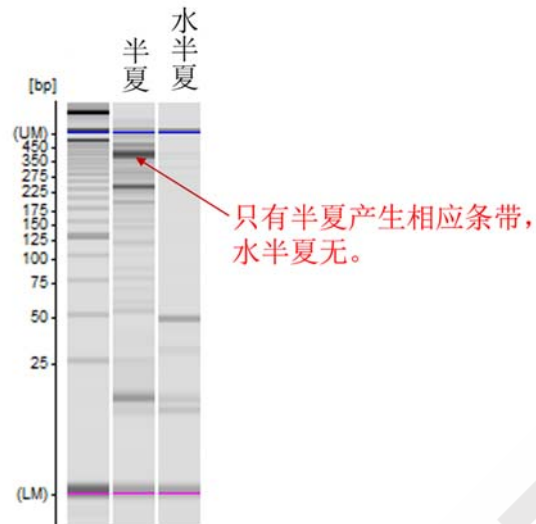


图1 微芯片电泳MultiNA检测半夏引物分别扩增半夏和水半夏样品的PCR产物凝胶图

### 3 结论

本文应用岛津微芯片电泳 MCE-202 MultiNA 建立了鉴定中药材半夏及其常见伪品水半夏的方法，此方法操作鉴定，灵敏度高，分析速度快。



SHIMADZU  
Excellence in Science

## 应用微芯片电泳 MultiNA 结合 PCR 法鉴别中药材铁皮石斛、紫皮石斛和紫苑石斛

**摘要：**针对目前市场上的石斛品种掺混的问题，根据铁皮石斛、紫皮石斛及紫苑石斛的核糖体转录间隔区，设计三种石斛的特异性 PCR 引物，利用基因提取试剂盒方法提取三种石斛的基因组进行 PCR 扩增，微芯片电泳仪 MultiNA 检测 PCR 产物，实验结果验证了三种石斛 PCR 产物的特异性，表明基于微芯片电泳 MultiNA 开发的方法可进行铁皮石斛及其常见掺伪品紫皮石斛及紫苑石斛的品种鉴定。

**关键词：**微芯片电泳 MultiNA PCR 石斛品种鉴定 铁皮石斛 紫皮石斛 紫苑石斛



石斛属是兰科中最大的属别之一，石斛类药材作为名贵中药，药用历史悠久、来源广泛。目前，全世界石斛属有 1000 多种，在我国，一共有 76 个石斛物种，有 33 种作为药用。传统中医认为，石斛，味甘，微寒，甘味入脾，能滋补强壮、补肝悦脾，能提高机体免疫力。在临床上，石斛的主要药效有：增强免疫力、抗疲劳、抗氧化、促消化、降血糖和血压、抗肿瘤、预防白内障、止咳化痰等方面。石斛品种众多，不同的石斛药效不同，其中，铁皮石斛药效和营养价值尤为显著。铁皮石斛现代研究表明，铁皮石斛能显著延长小鼠负重游泳时间，降低血乳酸和肌酸激酶水平，提高运动耐力和加速消除疲劳。铁皮石斛多糖对肝微粒体脂质的过氧化具有抑制作用，同时具有较强的清除自由基和超氧阴离子的功效。研究表明，以铁

皮石斛为主要原料制成的铁皮枫斗胶囊也具有降血糖效果。现代药理学表明，铁皮石斛提取物具有降低易卒中型自发性高血压大鼠的血压，降低中风发生率，延长生存时间等作用。

由于不同石斛价格的差异，目前市场上石斛品种掺混现象屡被报道，紫皮石斛由于与铁皮石斛外观非常相似，且价格仅为铁皮石斛的 1/5-1/4，常掺入或冒充铁皮石斛进行销售。然而，在有效成分种类、含量和质量上，铁皮石斛远优于紫皮石斛，药用功效也比紫皮石斛更明显。与紫皮石斛类似，刚节石斛中的紫苑石斛也与铁皮石斛外观相似而难于分辨。为了保证用药安全，需要准确地鉴定不同石斛品种。本文基于分子生物学手段，针对铁皮石斛、紫皮石斛和紫苑石斛的特异性基因位点，设计三种石斛的特异性

PCR 产物，PCR 扩增后，使用岛津微芯片电泳 MultiNA 检测 PCR 产物。实验结果显示，三种石斛的 PCR 引物具有特异性，可以将三

种石斛成功地进行鉴别。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器

微芯片电泳 MCE-202 MultiNA

### 1.2 试剂

TaKaRa MiniBEST Plant Genomic DNA Extraction Kit (宝生物工程有限公司, 9768)  
Ampdirect® Plus (For International) (WAKO pure chem, Code: 604-21469; Shimadzu corp., Code: S241-08800-99)  
IMMOLASE™ DNA Polymerase (BIOLINE, Code: BIO-21046)  
1×TE Buffer  
25 bp DNA Ladder (Invitrogen, 10597-011)

DNA-500 Reagent Kit for MultiNA (岛津公司, P/N 292-27910-91)

样品: 中药材 铁皮石斛、紫皮石斛和紫苑石斛

PCR引物: 在NCBI数据中查询三种石斛的核糖体转录间隔区的基因序列, 根据序列的差异, 设计三种石斛特异性PCR引物。铁皮石斛、紫皮石斛及紫苑石斛PCR产物的理论长度分别为238 bp、189 bp和164 bp。

### 1.3 样品中DNA的提取与纯化

样品的基因提取和纯化基本按照 TaKaRa MiniBEST Plant Genomic DNA 操作方法中富含多糖、多酚及油脂植物材料的提取方法进行。

### 1.4 PCR反应体系

PCR反应试剂与反应条件见表1和表2。

表1 PCR反应试剂

	使用量	终浓度
Ampdirect® Plus	10.0 μL	1×
IMMOLASE™ DNA Polymerase	0.1 μL	
PCR Forward Primer (10 μM)	1.0 μL	0.4 μM
PCR Reverse Primer (10 μM)	1.0 μL	0.4 μM
DNA 模板	1.5 μL	20 ng/μL
dH <sub>2</sub> O (灭菌蒸馏水)	6.4 μL	
总体积	20.0 μL	

表2 PCR反应参数

作用	时间/s	温度/°C
活化 DNA 活性酶和预变性	600	94
PCR (35 个循环)		
变性	30	94
退火	30	61
延伸	30	72

### 1.5 MultiNA检测

PCR扩增产物进入MultiNA进行测定。根据PCR产物理论大小，实验中选用500 bp的试剂盒进行测定。

## 2 结果讨论

图1与是微芯片电泳MultiNA检测铁皮石斛PCR引物分别扩增铁皮石斛、紫皮石斛和紫苑石斛样品的PCR产物凝胶图。实验结果显示，使用铁皮石斛PCR引物时，铁皮石斛样品PCR产物得到目标条带，尺寸与理论大小基本一致，紫皮石斛和紫苑石斛均未检测到相应条带，验证的铁皮石斛PCR引物的特异性。

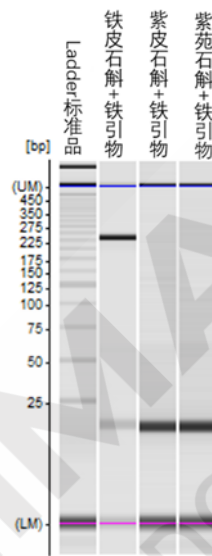


图1 微芯片电泳MultiNA检测铁皮石斛PCR引物分别扩增铁皮石斛、紫皮石斛和紫苑石斛PCR产物凝胶图

(铁引物：铁皮石斛PCR引物)

图2是微芯片电泳MultiNA检测紫皮石斛PCR引物分别扩增铁皮石斛、紫皮石斛、和紫苑石斛样品的PCR产物凝胶图。结果显示，只有紫皮石斛样品产生了与理论尺寸符合的目标条带，铁皮石斛和紫苑石斛则未有响应，验证了紫皮石斛PCR引物的特异性。

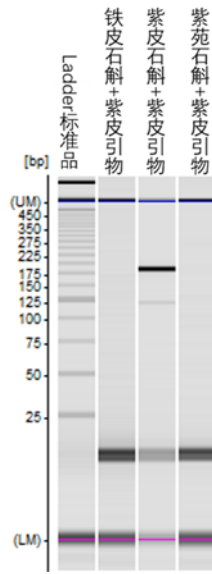


图2 微芯片电泳MultiNA检测紫皮石斛PCR引物分别扩增铁皮石斛、紫皮石斛和紫苑石斛PCR产物凝胶图  
(紫皮引物: 紫皮石斛PCR引物)

图3是微芯片电泳MultiNA检测紫苑石斛PCR引物分别扩增铁皮石斛、紫皮石斛和紫苑石斛样品的PCR产物凝胶图, 结果同样验证了紫苑石斛PCR引物的特异性。

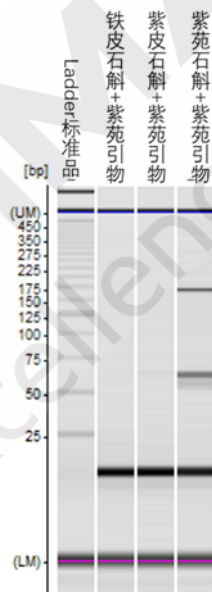


图3 微芯片电泳MultiNA检测紫苑石斛PCR引物分别扩增铁皮石斛、紫皮石斛和紫苑石斛PCR产物凝胶图  
(紫苑引物: 紫苑石斛PCR引物)

图4、图5和图6分别是微芯片电泳MultiNA检测铁皮石斛、紫皮石斛和紫苑石斛PCR产物的电泳图, 电泳图可以直接显示PCR产物的片段长度。考虑到仪器具有5%的测量误差, 三种石斛的PCR产物实际长度与理论长度基本一致, 结果合理。

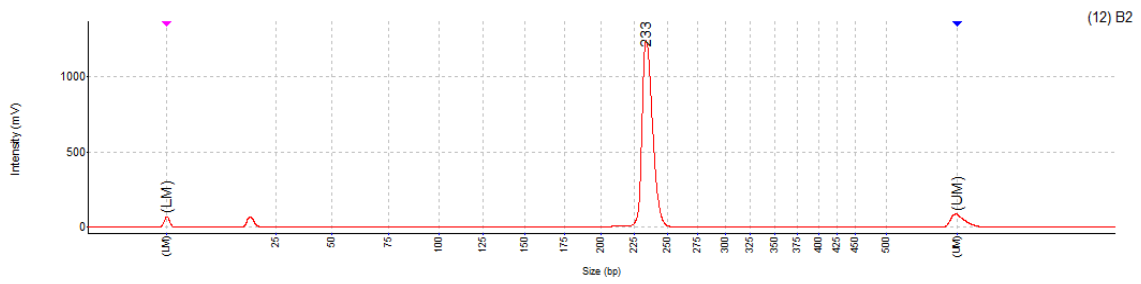


图4 微芯片电泳MultiNA检测铁皮石斛PCR产物电泳图（理论长度：238 bp）

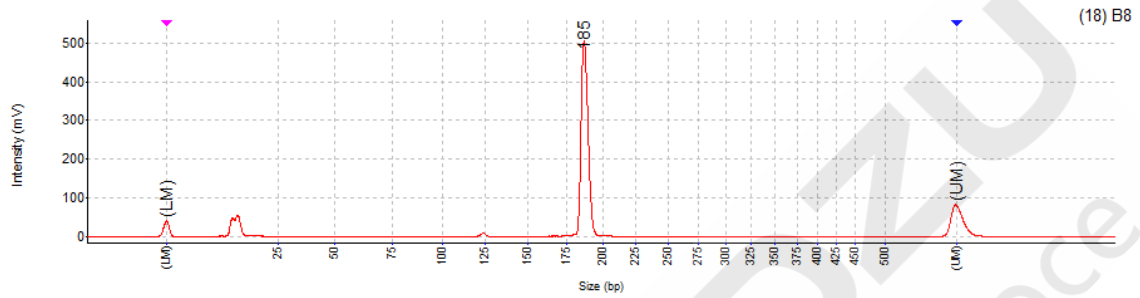


图5 微芯片电泳MultiNA检测紫皮石斛PCR产物电泳图（理论长度：189 bp）

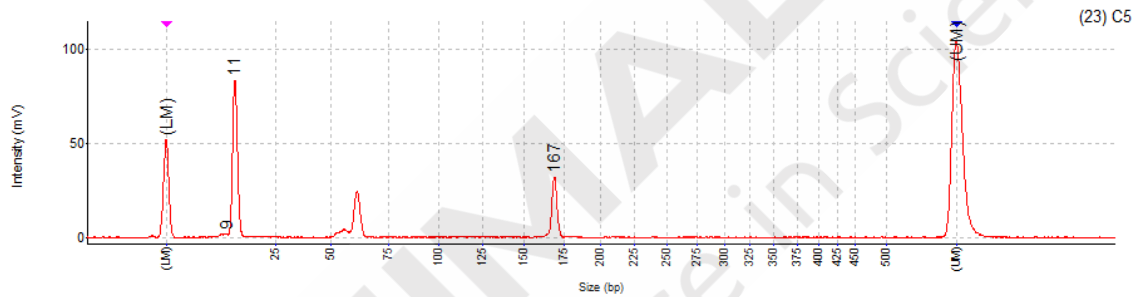


图6 微芯片电泳MultiNA检测紫苑石斛PCR产物电泳图（理论长度：164 bp）

### 3 结论

本文应用岛津微芯片电泳 MultiNA 结合 PCR 法成功建立了鉴定中药材铁皮石斛、紫皮石斛和紫苑石斛的方法，此方法操作简便，灵敏度高，分析速度快，可以作为石斛品种掺混鉴定的参考。

# 应用微芯片电泳 MultiNA 结合 PCR 法从黄缘闭壳龟和乌龟龟甲中鉴别黄喉拟水龟龟甲

**摘要:** 龟甲作为疗效显著的中药材, 近年来用量逐渐加大, 但市场上常有龟甲品种掺伪的问题出现。因此, 本文应用分子生物学手段, 应用微芯片电泳 MultiNA 结合 PCR 法开发了一种对中药材龟甲品种鉴定的方法, 应用此方法将黄喉拟水龟龟甲从乌龟和黄缘闭壳龟龟甲中成功鉴别出来。

**关键词:** 微芯片电泳 MultiNA PCR 中药材龟甲品种鉴定 黄喉拟水龟 黄缘闭壳龟 乌龟



我国使用动物类药材历史悠久, 其中龟甲是常见中药材, 其活性强, 疗效显著。近年来, 由于中药材用量大, 其原动物资源逐年减少, 商品药材中常有伪品和混淆品出现。因此, 准确地对龟甲品种进行鉴定非常重要。

本文基于分子生物学手段, 针对黄喉拟

水龟与乌龟及黄缘闭壳龟特异性基因位点的差异, 设计了黄喉拟水龟的特异性 PCR 引物, PCR 扩增后, 使用微芯片电泳 MultiNA 检测 PCR 产物, 实验结果显示, 黄喉拟水龟的 PCR 引物只对黄喉拟水龟有响应, 可从黄缘闭壳龟和乌龟和中鉴定出黄喉拟水龟。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器

微芯片电泳 MCE-202 MultiNA

### 1.2 试剂

Ampdirect®Plus (For International) (WAKO pure chem, Code: 604-21469; Shimadzu corp., Code: S241-08800-99)

IMMOLASE™ DNA Polymerase (BIOLINE, Code: BIO-21046)

1×TE Buffer

25 bp DNA Ladder (Invitrogen, 10597-011)

DNA-500 Reagent Kit for MultiNA (岛津公司,

P/N 292-27910-91)

样品: 中药材黄喉拟水龟龟甲、黄缘闭壳龟龟甲和乌龟龟甲

PCR引物: 根据NCBI数据库, 查询三种龟的基因序列, 通过Blast对比, 找出黄喉拟水龟与黄缘闭壳龟和乌龟的序列差异位点, 设计黄喉拟水龟特异性PCR引物。

### 1.3 样品中DNA的提取与纯化

样品的基因提取和纯化基本按照 CTAB 法基因组提取方法进行。

### 1.4 PCR反应体系

PCR反应试剂与反应条件见表1和表2。

表1 PCR反应试剂

	使用量	终浓度
Ampdirect® Plus	10.0 μL	1×
IMMOLASE™ DNA Polymerase	0.1 μL	
PCR Forward Primer (10 μM)	1.0 μL	0.4 μM
PCR Reverse Primer (10 μM)	1.0 μL	0.4 μM
DNA 模板	1.5 μL	20 ng/μL
dH <sub>2</sub> O (灭菌蒸馏水)	6.4 μL	
总体积	20.0 μL	

表2 PCR反应参数

作用	时间/s	温度/°C
活化 DNA 活性酶和预变性	600	94
PCR (35 个循环)		
变性	30	94
退火	30	62
延伸	30	72
循环后保持	420	72

### 1.5 MultiNA检测

PCR扩增产物进入MultiNA进行测定。根据PCR产物理论大小，实验中选用500 bp的试剂盒进行测定。

## 2 结果讨论

图1与是微芯片电泳MultiNA检测黄喉拟水龟PCR引物分别扩增黄喉拟水龟、黄缘闭壳龟和乌龟龟甲样品的PCR产物电泳图。黄喉拟水龟PCR引物和黄喉拟水龟样品进行PCR扩增反应时，MultiNA结果检测结果显示产生相应的条带，而当样品为黄缘闭壳龟和乌龟时，未检测到对应的PCR产物条带，验证了黄喉拟水龟PCR引物的特异性，表明此方法可将黄喉拟水龟龟甲与乌龟和黄缘闭壳龟龟甲进行区别。

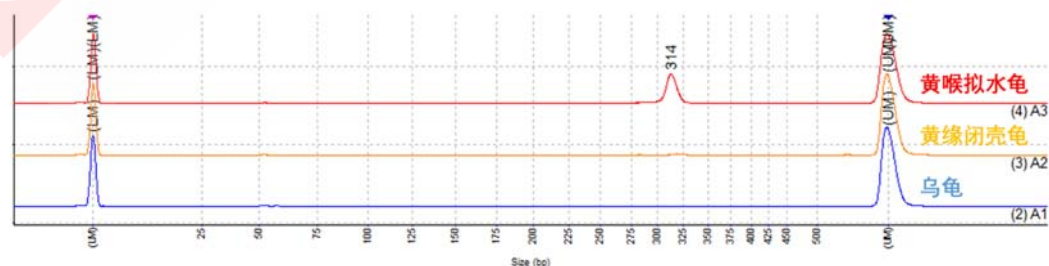


图1 微芯片电泳MultiNA检测黄喉拟水龟PCR引物分别扩增黄喉拟水龟龟甲、黄缘闭壳龟龟甲和乌龟龟甲PCR产物电泳图

### 3 结论

本文应用岛津微芯片电泳 MultiNA 结合 PCR 法成功开发了从黄缘闭壳龟和乌龟龟甲中鉴别出黄喉拟水龟龟甲的方法，此方法操作简便，特异性高，灵敏度好，可以作为中药材龟甲种类鉴别时的参考。



## 应用微芯片电泳 MultiNA 结合 PCR-RFLP 法鉴定中药材川贝母

**摘要:** 本文参照 2015 版《中国药典》中基于 PCR-RFLP (聚合酶链式反应-限制性片段长度多态性)法和电泳检测川贝母的方法,应用微芯片电泳仪 MultiNA 检测川贝母的 PCR-RFLP 产物, MultiNA 实验结果显示在 100 bp-250 bp 得到两条 DNA 条带,与药典中的结果一致,表明 MultiNA 结合 PCR-RFLP 法成功地鉴定了中药材川贝母,与琼脂糖凝胶电泳检测相比,本方法操作简便,灵敏度高,能提供片段的尺寸信息,显示结果更为直观。

**关键词:** 微芯片电泳 MultiNA PCR 中药材品种鉴定 川贝母



川贝母主要分布于四川、云南、西藏等地,品质较优,为百合科植物川贝母、棱砂、乌花等的鳞茎,按形状不同分别称“松贝”、“青贝”、“炉贝”和“栽培品”,具有清热润肺、化痰止咳的功效,药用价值较高。传统的川贝母的鉴别,主要是性状、显微鉴别、光谱法,由于市场上川贝母类药材品质较多,相同品种间会因药源植物来源不一、种植环境、产地和加工等因素存在相对的掺混。因此,准确地鉴定川贝母的品种非常重要。

目前,2015 版《中国药典》中收录了基于 PCR-RFLP (聚合酶链式反应-限制性片段长度多态性)法和电泳检测对川贝母进行鉴定的方法,本文参照此方法,应用岛津微芯片电泳仪 MultiNA 结合 PCR-RFLP 法对川贝母进行了检测,MultiNA 检测结果显示与药典中得到的结果一致,且能提供川贝母 PCR-RFLP 产物片段的尺寸信息,与琼脂糖凝胶电泳方法相比,本方法具有操作简便,自动化程度高、分辨率和灵敏度高的优势。

### 1 实验部分

#### 1.1 仪器

微芯片电泳 MCE-202 MultiNA

#### 1.2 试剂

TaKaRa MiniBEST Plant Genomic DNA

Extraction Kit (宝生物工程有限公司, 9768)

SYBR® Premix Ex Taq™ II (宝生物工程有限公司, RR820A)

SYBR® Gold Nucleic Acid Gel Stain  
(Invitrogen, S-11494)

1×TE Buffer

25 bp DNA Ladder (Invitrogen, 10597-011)

DNA-500 Reagent Kit for MultiNA (岛津公司, P/N 292-27910-91)

样品: 中药材川贝母

PCR 引物：参照 2015 版《中国药典》中川贝母鉴别特异性 PCR 引物序列：  
5'-CGTAACAAGGTTTCGTAGGTGAA-3'和5'-GCTACGTTCTTCATCGAT-3'

### 1.3 样品中DNA的提取与纯化

样品的基因提取和纯化基本按照 TaKaRa MiniBEST Plant Genomic DNA 操作方法中植物材料的提取方法进行。

### 1.4 PCR反应体系

PCR反应试剂与反应条件见表1和表2。

表1 PCR反应试剂

	使用量	终浓度
SYBR® Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus) (2×)	10.0 μL	1×
PCR Forward Primer (10 μM)	0.8 μL	0.4 μM
PCR Reverse Primer (10 μM)	0.8 μL	0.4 μM
DNA 模板	2.0 μL	20 ng/μL
dH <sub>2</sub> O (灭菌蒸馏水)	6.4 μL	
总体积	20.0 μL	

表2 PCR反应参数

作用	时间/s	温度/°C
活化 DNA 活性酶和预变性	30	95
PCR (35 个循环)		
变性	30	95
退火	30	56
延伸	300	72
循环后保持	300	72

### 1.5 酶切反应

取PCR反应液，置于500 μL离心管中，进行酶切反应，反应总体积为20 μL，反应体系包括10×酶切缓冲液 2 μL，PCR反应液6 μL，Sma I (10 U/μL) 0.5 μL，无菌超纯水11.5 μL，酶切反应在30°C水浴反应2小时。

### 1.6 MultiNA检测

将酶切产物进入MultiNA进行测定，根据理论产物片段大小，实验中选用500 bp的试剂盒进行测定。为了验证测量的准确性，本文同时阴性对照实验，阴性对照的反应体系中以纯水代替DNA模板。

## 2 结果讨论

图1与是微芯片电泳MultiNA测量川贝母PCR-RFLP产物的凝胶图。实验结果显示，在川贝母的PCR-RFLP产物在100 bp-250 bp得到两条DNA条带，而空白对照无条带，此结果与2015版《中国药典》中川贝母检测结果一致，验证了基于MultiNA方法对川贝母鉴定的准确性。图2是微芯片电泳MultiNA检测川贝母PCR-RFLP产物的电泳图。电泳图可以得到与凝胶图对应的相应片段的尺寸信息，微芯片电泳检测与琼脂糖凝胶电泳方法相比，数据读取直观，便于直接比较

结果。

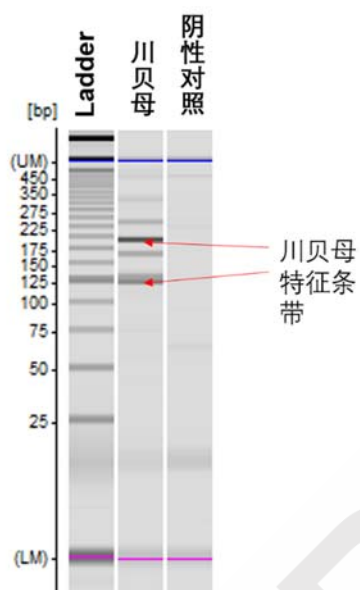


图1 微芯片电泳MultiNA检测川贝母PCR-RFLP产物凝胶图

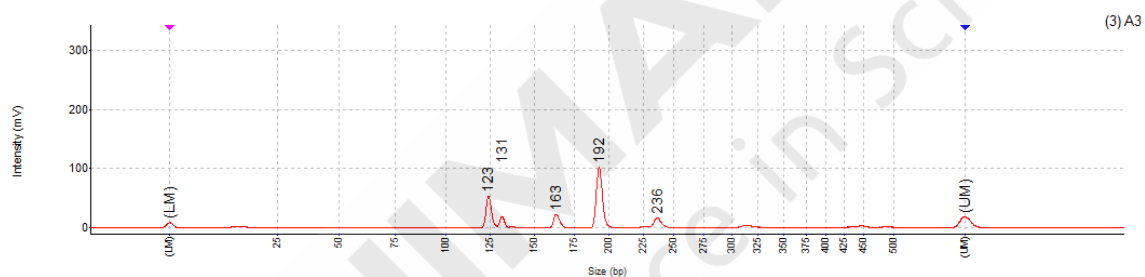


图2 微芯片电泳MultiNA检测川贝母PCR-RFLP产物电泳图

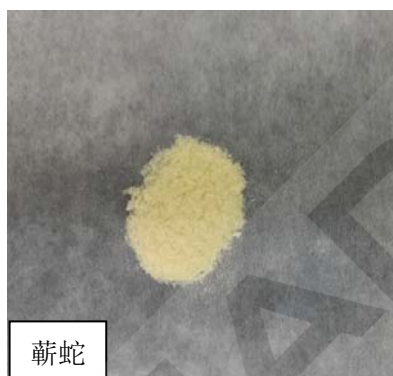
### 3 结论

本文参照 2015 版《中国药典》中的方法，应用岛津微芯片电泳 MultiNA 结合 PCR-RFLP 法成功鉴定了川贝母，与琼脂糖凝胶电泳检测方法相比，本方法操作鉴定，自动化程度高，分析速度快，检测结果更加直观地呈现。

## 应用微芯片电泳仪 MultiNA 鉴定中药材蕲蛇

**摘要:** 本文应用 2015 版《中国药典》中的蕲蛇特异性引物对蕲蛇中药材裂解后的消化产物进行 PCR 扩增反应, 通过微芯片电泳 MultiNA 检测扩增产物, 结果显示其凝胶图谱中不仅在 300-400 bp 之间有单一条带, 电泳图谱中还能得到片段尺寸信息。本实验表明, 相比传统的琼脂糖凝胶电泳, MultiNA 同样适用于《中国药典》中规定的利用聚合酶链式反应法 (PCR) 对中药材蕲蛇的鉴定, 而且分辨率更高、检测更加灵敏、操作简便、快速、全自动化分析, 通量更高, 是中药材品种鉴定的有力分析方法。

**关键词:** MultiNA PCR 蕲蛇 中药材 品种鉴定



中药是中国传统的药材, 中国药文化源远流长、博大精深, 种类繁多, 来源广泛。外观相似的不同品种的中药材可能疗效相差甚远, 价格也有较大差异, 甚至某些不法商家为谋取不当利益, 故意进行掺混或掺假。传统的中药材鉴别方法如感官识别、性状鉴定、显微鉴定和理化鉴定等存在一定局限性, 为保证中药材临床用药安全、准确和有效, 2015 版《中国药典》中规定利用聚合酶链式

反应法对一些方剂中药物品种的来源, 及易混淆的不同品种中药材如川贝母、蕲蛇、乌梢蛇等进行鉴别。为此, 这里应用 PCR 的方法, 结合岛津微芯片电泳仪 MultiNA 实现了对蕲蛇药材的快速检测。相比药典中规定的琼脂糖凝胶电泳检测的方法, 此方法操作简单, 分辨率更高, 可快速实现中药材品种的鉴别。

### 1. 实验部分

#### 1.1 仪器

微芯片电泳 MCE-202 MultiNA

#### 1.2 试剂

Ampdirect® Plus (Shimadzu, S241-08800-99)

IMMOLASE™ DNA Polymerase (Biolone, BIO-21046)

SYBR® Gold Nucleic Acid Gel Stain (Invitrogen, S-11494)

DNA-500 Reagent Kit for MultiNA (Shimadzu, 292-27910-91)

25 bp DNA Ladder (Invitrogen, 10597-011)

样品: 蕲蛇 (中药材)

引物: 引物序列来自 2015 版《中国药典》, 由生工生物公司合成。具体引物信息见表 1。

表1 蕲蛇PCR扩增引物序列

引物	序列	PCR 理论产物大小(bp)
正向引物	5'-GGCAATTCACACTACACAGCCAACATCAACT-3'	343
反向引物	5'-CCATAGTCAGGTGGTTAGTGATAC-3'	

### 1.3 分析条件

DNA-500 on-chip。

### 1.4 实验方法

取适量中药材蕲蛇样品进行液氮研磨，称取100 mg粉末加入1 mL细胞裂解液（0.5% SDS, 400 mM NaCl, 0.1 M EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH 8.0）和5  $\mu$ L蛋白酶K（20  $\mu$ g/ $\mu$ L），混匀后55 $^{\circ}$ C孵育30 min，取消化产物进行PCR扩增反应，PCR反应体系及反应条件分别见表2及表3。为了验证测量的准确性，实验中设计了阴性对照，阴性对照不加入DNA模板。PCR产物进入微芯片电泳仪MultiNA进行测定。根据理论产物片段大小，选用DNA-500的试剂盒进行检测。

表2 PCR反应体系

反应试剂	使用量 ( $\mu$ L)
Ampdirect <sup>®</sup> Plus (2 $\times$ )	10
PCR Forward Primer (10 $\mu$ M)	1
PCR Reverse Primer (10 $\mu$ M)	1
模板（消化产物）	0.2
IMMOLASE <sup>TM</sup> DNA Polymerase (5U/ $\mu$ L)	0.1
dH <sub>2</sub> O（灭菌蒸馏水）	7.7
总体积	20

表3 PCR反应条件

作用	温度/ $^{\circ}$ C	时间
预变性	94	10 min
扩增（35个循环）		
变性	94	30 s
退火	58	30 s
延伸	72	30 s
循环后延伸	72	7 min

## 2. 结果讨论

图1是使用蕲蛇特异性引物进行PCR扩增后，应用MultiNA对扩增产物进行检测的凝胶图，从图上可以看到，只有蕲蛇样品在目的片段大小附近有明显条带，阴性对照没有条带。图2是蕲蛇样品检测的电泳图，图上显示出349 bp的检测峰，与理论大小343 bp接近，考虑到仪器在DNA-500 on-chip模式下具有5%的误差，结果合理，说明使用蕲蛇特异性引物成功鉴定蕲蛇样

品。

2015版《中国药典》中规定对蕲蛇样品进行PCR扩增后，需按照琼脂糖凝胶电泳法进行电泳检测，供试品凝胶电泳图谱中，在与对照药材凝胶电泳图谱相应的位置上，在300-400 bp之间应有单一DNA条带。相比传统的琼脂糖凝胶电泳法，利用MultiNA对PCR产物进行检测，不仅成功在300-400 bp之间显示出单一条带，还能够通过电泳图得到片段的尺寸信息，灵敏度高，为通过片段尺寸大小鉴别不同种类的中药材提供可能。MultiNA操作简便，全自动化分析，相比传统的电泳方法，适用于高通量的中药材样品检测。

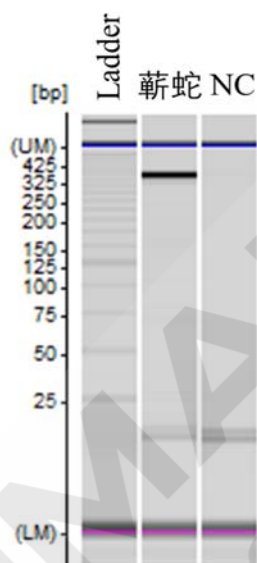


图1 蕲蛇样品MultiNA检测凝胶图（NC：阴性对照）

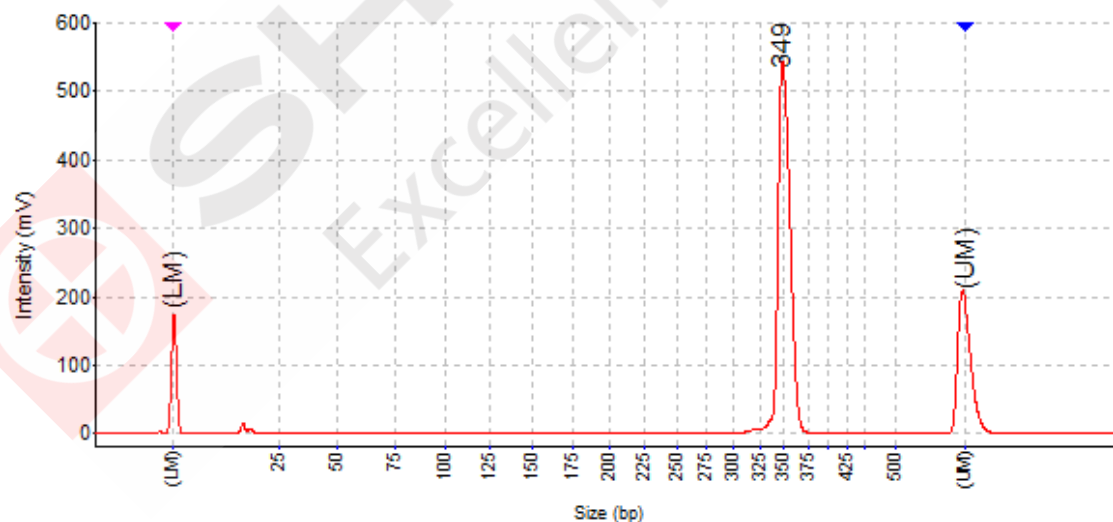


图2 蕲蛇样品MultiNA检测电泳结果

### 3. 结论

本文基于分子生物学技术，采用岛津公司微芯片电泳仪 MultiNA 成功对中药材蕲蛇进行鉴

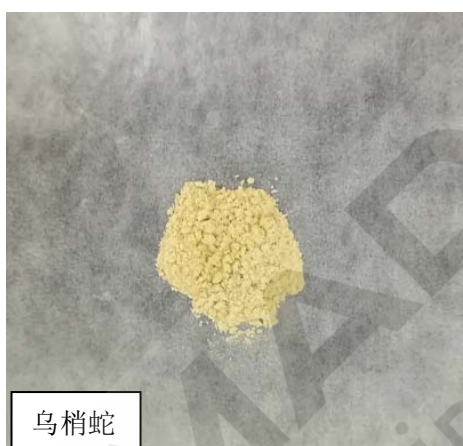
定，不仅在凝胶电泳图谱中 300-400 bp 之间有单一条带，还能通过电泳图得到片段尺寸信息，误差在 5%以内。此方法相比传统的琼脂糖凝胶电泳，更加高效、灵敏，分辨率高，操作简便，全自动化分析，通量高，是中药材品种鉴定有力的分析方法。



## 应用微芯片电泳仪 MultiNA 鉴定中药材乌梢蛇

**摘要:** 本文应用 2015 版《中国药典》中的乌梢蛇特异性引物对乌梢蛇中药材裂解后的消化产物进行 PCR 扩增反应, 通过微芯片电泳 MultiNA 检测扩增产物, 结果显示其凝胶电泳图谱中不仅在 300-400 bp 之间有单一条带, 而且还能得到片段尺寸信息。本实验表明, 相比传统的琼脂糖凝胶电泳, MultiNA 同样适用于《中国药典》中规定的聚合酶链式反应法 (PCR) 对中药材乌梢蛇的鉴定, 而且分辨率更高、操作简便、快速、全自动化分析, 是中药材品种鉴定的有力分析方法。

**关键词:** MultiNA PCR 中药材 乌梢蛇 品种鉴定



乌梢蛇 (*Zaocys dhumnades*) 属蛇目、游蛇科, 是体形较大的一种无毒蛇, 俗称乌蛇、乌风蛇、黑花蛇。分布范围很广, 在国内较为常见, 适宜人工养殖。入药的乌梢蛇为除去内脏后的干燥体。味甘, 性平。具有祛风湿、通经络、止痉的功效, 主治风湿顽痹、麻木拘挛、中风口眼喎斜、半身不遂、抽搐痉挛、破伤风、麻风、疥癣。近年来中药材品种混淆使用问题屡有发生, 外形相近的不同品种中药材可能疗效相去甚远, 为保证临

床用药安全、准确和有效, 2015 版《中国药典》中规定利用聚合酶链式反应法 (PCR) 对乌梢蛇药材或在一些方剂中的药物成分进行鉴别。为此, 这里应用 PCR 的方法, 结合岛津微芯片电泳仪 MultiNA 实现了对乌梢蛇药材的快速检测。相比药典中规定的对 PCR 扩增产物进行检测的琼脂糖凝胶电泳方法, 此方法操作简便, 分辨率高, 可快速实现中药材品种的鉴别。

### 1. 实验部分

#### 1.1 仪器

微芯片电泳 MCE-202 MultiNA

#### 1.2 试剂

Ampdirect® Plus (Shimadzu, S241-08800-99)

IMMOLASE™ DNA Polymerase (Bioline, BIO-21046)

SYBR® Gold Nucleic Acid Gel Stain (Invitrogen, S-11494)

DNA-500 Reagent Kit for MultiNA (Shimadzu, 292-27910-91)

25 bp DNA Ladder (Invitrogen, 10597-011)

样品: 乌梢蛇 (中药材)

引物: 引物序列来自2015版《中国药典》, 由生工生物公司合成。具体引物信息见表1。

表1 乌梢蛇PCR扩增引物序列

引物	序列	PCR 理论产物 大小 (bp)
正向引物	5'-GCGAAAGCTCGACCTAGCAAGGGGACCACA-3'	351
反向引物	5'-CAGGCTCCTCTAGGTTGTATGGGGTACCG-3'	

### 1.3 分析条件

DNA-500 on-chip。

### 1.4 实验方法

取适量中药材乌梢蛇样品进行液氮研磨, 称取100 mg粉末加入1 mL细胞裂解液(0.5% SDS, 400 mM NaCl, 0.1 M EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH 8.0) 和5  $\mu$ L蛋白酶K (20  $\mu$ g/ $\mu$ L), 混匀后55 $^{\circ}$ C 孵育30 min, 取消化产物进行PCR扩增反应, PCR反应体系及反应条件分别见表2及表3。为了验证测量的准确性, 实验中设计了阴性对照, 阴性对照不加入DNA模板。PCR产物进入微芯片电泳仪MultiNA进行测定。根据理论产物片段大小, 选用DNA-500的试剂盒进行检测。

表2 PCR反应体系

反应试剂	使用量 ( $\mu$ L)
Ampdirect <sup>®</sup> Plus (2 $\times$ )	10
PCR Forward Primer (10 $\mu$ M)	1
PCR Reverse Primer (10 $\mu$ M)	1
模板 (消化产物)	0.2
IMMOLASE <sup>TM</sup> DNA Polymerase (5U/ $\mu$ L)	0.1
dH <sub>2</sub> O (灭菌蒸馏水)	7.7
总体积	20

表3 PCR反应条件

作用	温度/ $^{\circ}$ C	时间
预变性	94	10 min
扩增 (35 个循环)		
变性	94	30 s
退火	58	30 s

延伸	72	30 s
循环后延伸	72	7 min

## 2. 结果讨论

图1是使用乌梢蛇特异性引物进行PCR扩增后，应用MultiNA对扩增产物进行检测的凝胶图，从图上可以看到，只有乌梢蛇样品在目的片段大小附近有明显条带，阴性对照没有条带。图2是乌梢蛇样品检测的电泳图，图上显示出357 bp的检测峰，与理论大小351 bp接近，考虑到仪器在DNA-500 on-chip模式下具有5%的误差，结果合理，说明使用乌梢蛇特异性引物成功鉴定乌梢蛇样品。

2015版《中国药典》中规定对乌梢蛇样品进行PCR扩增后，需按照琼脂糖凝胶电泳法进行电泳检测，供试品凝胶电泳图谱中，在与对照药材凝胶电泳图谱相应的位置上，在300-400 bp之间应有单一DNA条带。相比传统的琼脂糖凝胶电泳法，利用MultiNA对PCR产物进行检测，不仅成功在300-400 bp之间显示出单一条带，还能够通过电泳图得到片段尺寸信息，灵敏度高，为通过片段尺寸大小鉴别不同种类的中药材提供可能。MultiNA操作简便，全自动化分析，相比传统的电泳方法，适用于高通量的中药材样品检测。

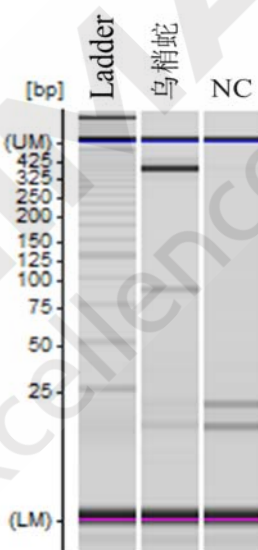


图1 乌梢蛇样品MultiNA检测凝胶图（NC：阴性对照）

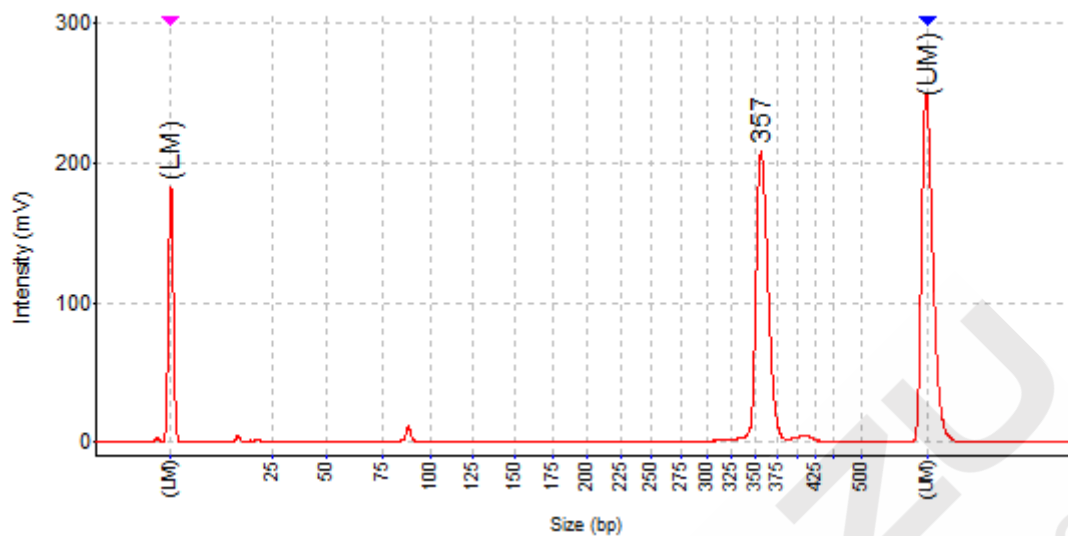


图2 乌梢蛇样品MultiNA检测电泳结果

### 3. 结论

本文应用岛津全自动微芯片电泳仪 MultiNA 结合 PCR 法成功对中药材乌梢蛇进行鉴定，其凝胶电泳图谱中不仅在 300-400 bp 之间显示单一条带，还能通过电泳图得到片段尺寸信息，误差在 5% 以内。此方法相比传统的琼脂糖凝胶电泳，更加高效、灵敏，分辨率高，操作简便，分析通量高，是中药材品种鉴定有力的分析方法。



本公司三条工厂获得 ISO 认证

JQA-0376

## ⊕ 岛津企业管理（中国）有限公司 / 岛津（香港）有限公司

<http://www.shimadzu.com.cn>

### 北京

北京市朝阳区朝外大街 16 号中国人寿大厦 14F  
 邮政编码：100020  
 电话：(010) 8525-2310/2312  
 传真：(010) 8525-2326/2329

### 上海

上海市徐汇区宜州路180号华鑫天地二期C801栋  
 邮政编码：200233  
 电话：(021) 3419-3888  
 传真：(021) 3419-3666

### 沈阳

辽宁省沈阳市青年大街167号北方国际传媒中心11F  
 邮政编码：110016  
 电话：(024) 2325-5577  
 传真：(024) 2383-6378

### 四川

成都市锦江区创意产业商务区三色路38号博瑞创意成都B座12层  
 邮政编码：610015  
 电话：(028) 8619-8421/8422  
 传真：(028) 8619-8420

### 武汉

武汉市汉口建设大道568号新世界国贸大厦I座41层4116室  
 邮政编码：430022  
 电话：(027) 8555-7910  
 传真：(027) 8555-7920

### 广州

广州市流花路109号之9达宝广场7楼  
 邮政编码：510010  
 电话：(020) 8710-8603  
 传真：(020) 8710-8698

### 西安

陕西省西安市锦业一路56号研祥城市广场A座501  
 邮政编码：710000  
 电话：(029) 6273-7878  
 传真：(029) 6273-7879

### 乌鲁木齐

乌鲁木齐市中山路339号中泉广场14层H座  
 邮政编码：830000  
 电话：(0991) 230-6271/6272  
 传真：(0991) 230-6273

### 昆明

昆明市青年路 432 号天恒大酒店 908 室  
 邮政编码：650021  
 电话：(0871) 315-2987  
 传真：(0871) 315-2991

### 南京

南京市鼓楼区汉中中路2号金陵饭店亚太商务楼27层B单元  
 邮政编码：210005  
 电话：(025) 8689-0258  
 传真：(025) 8689-0237

### 重庆

重庆市渝中区青年路 38 号重庆国贸中心 1702 室  
 邮政编码：400010  
 电话：(023) 6380-6057/6058  
 传真：(023) 6380-6551

### 深圳

深圳市福田区天安数码城天展大厦1楼F2.6-1C  
 邮政编码：518042  
 电话：(0755) 8340-2852  
 传真：(0755) 8389-3100

### 河南

郑州市中原路220号裕达国际贸易中心A座20层2011室  
 邮政编码：450007  
 电话：(0371) 8663-2981  
 传真：(0371) 8663-2982

### 香港

Suite 1028, Ocean Centre, Harbour City,  
 Tsim Sha tsui, Kowloon, Hong-Kong  
 电话：(00852) 2375-4979  
 传真：(00852) 2199-7438

用户服务热线电话：800-8100439  
 400-6500439

本产品样本所宣传的内容，以本版本为准  
 样本中的试验数据除注明外为本公司的试验数据

日本总公司工厂已通过ISO质量·环境管理体系的认证

注：此样本所有信息仅供参考，如有变动恕不另行通知