

重楼法定基原与其同属近缘种的多重 PCR 鉴别体系研究

张开元¹, 饶文霞¹, 尹显梅¹, 陈蓉^{2,3}, 崔欣², 唐卓^{2*}, 尹鸿翔^{3*}¹成都中医药大学药学院, 成都 611137, ²中国科学院成都生物研究所天然产物中心, 成都 610041;³成都中医药大学民族医药学院, 成都 611137

摘要:本研究通过分析重楼法定基原(七叶一枝花和云南重楼)与其同属近缘种 ITS 序列的差异设计了 3 对特异性引物。利用多重聚合酶链反应(PCR)原理建立了一套能快速、准确鉴别重楼法定基原与其同属近缘种的方法。最终,七叶一枝花样本可扩增出片段大小为 210 bp 的特异性片段,云南重楼种下的两类基因型(YN-I、YN-II)样本可分别扩增出 248 bp 和 149 bp 的特异性片段。在法定基原得到阳性鉴定的同时,其他同属近缘种无任何片段,避免了干扰。该方法首次实现了,在一套多重 PCR 反应体系中同时鉴别重楼药典法定基原与其同属近缘种,对于提升中药重楼的质量控制技术具有重要水平具有重要意义。

关键词:重楼;法定基原;同属近缘种;多重 PCR;鉴定;七叶一枝花;云南重楼

中图分类号:R932

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2018.12.025

Multiplex PCR System for the Identification of *Paridis Rhizoma*'s Legal Origins and Its Closely Related Species from Genus *Paris*

ZHANG Kai-yuan¹, RAO Wen-xia¹, YIN Xian-mei¹, CHEN Rong^{2,3}, CUI Xin², TANG Zhuo^{2*}, YIN Hong-xiang^{3*}¹College of pharmacy, Chengdu University of TCM, Chengdu 611137, China;²Natural Products Research Center, Chengdu Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Chengdu 610041, China;³College of ethnic medicine, Chengdu University of TCM, Chengdu 611137, China

Abstract: In this study, three specific primers pairs were designed bases on comparison of the difference of the ITS gene sequences of *Rhizoma Paridis*' legal origins (*Paris polyphylla* var. *chinensis* and *P. polyphylla* var. *yunnanensis*) from their closely related species. A fast and accurate method was established to identify *Rhizoma Paridis*' legal origins and their closely related species according to the principles of multiplex polymerase chain reaction(PCR). Eventually, the size of 210 bp specific bands were amplified from the *P. polyphylla* var. *chinensis*; the sizes of 248 bp and 149 bp specific bands were amplified from *P. polyphylla* var. *yunnanensis* samples of two kinds of genotypes (YN-I and YN-II) respectively. The positive identification of legal origins were obtained while their closely related species weren't amplified any bands to interfere with the result. For the first time, this method realized authentication of *Rhizoma Paridis*' legal origins in one multiple PCR identification system simultaneously. This method is of great significance for improving the technical level of quality control of *Rhizoma Paridis*.

Key words: *Rhizoma Paridis*; legal origins; closely related species; multiplex polymerase chain reaction; identification; *Paris polyphylla* var. *chinensis*; *Paris polyphylla* var. *yunnanensis*

中药重楼,来自百合科(Liliaceae)重楼属(*Paris* L.)多年生草本植物。其中,七叶一枝花(*Paris polyphylla* Smith var. *chinensis* (Franch.) Hara)与云南重楼(*P. polyphylla* Smith var. *yunnanensis* (Franch.))

Hand.-Mazz.)的干燥根茎被历版《中国药典》作为正品收载。重楼药用历史悠久,以“蚤休”之名始载于《神农本草经》,具有清热解毒,消肿止痛,凉肝定惊之功效,可用于疔疮痈肿,咽喉肿痛,蛇虫咬伤,跌扑伤痛,惊风抽搐的治疗^[1],是很多著名中成药如云南白药、宫血宁胶囊、抗病毒颗粒等的重要原料。

经过课题组前期对我国西南地区重楼人工种植基地的考察发现,由于重楼栽培正处于野生变家种的阶段,种苗的生产和贸易缺乏行业规范,来源混

收稿日期:2018-01-15 接受日期:2018-04-17

基金项目:国家自然科学基金(81573545,81001606);霍英东教育基金(121045);四川省科技厅应用基础研究项目(2017JY0136);四川省崇州市现代农业创新驱动试点区(2015-CX00-00004-ZF)

*通信作者 Tel:86-013880625680; E-mail: hongxiangy@126.com; tangzhuo@cib.ac.cn

乱,人工栽培品种除七叶一枝花(*P. polyphylla* var. *chinensis*)与云南重楼(*P. polyphylla* var. *yunnanensis*)之外,还包括多叶重楼(*P. polyphylla* var. *polyphylla*),狭叶重楼(*P. polyphylla* var. *stenophylla*),南重楼(*P. vietnamensis*),五指莲(*P. axialis* var. *axialis*),平伐重楼(*P. vaniotii*),球药隔重楼(*P. fargesii*),黑籽重楼(*P. thibetica* var. *thibetica*),长柱重楼(*P. forrestii*)等多个近缘类群,品种十分混乱。而重楼以根茎入药,根据性状及显微等特征难以对正品及其近缘混用种药材进行有效区分,这给中医处方和中成药的质量控制方面带来了极大的安全隐患^[2]。因此,对正品重楼及其混用近缘种进行有效区分,在药材生产和贸易中建立一种快速、准确的鉴别方法,对于重楼的用药安全、质量控制以及重楼属中濒危种群的保护都有着十分重要的意义。

随着分子生物学迅速发展,植物在DNA水平上的多样性研究取得突破性进展,用于药用植物的分子鉴定技术也日渐成熟^[3]。对于重楼这一基原复杂的中药,商品药材的真伪鉴定工作既要实现药典法定种和多个混用种的区分,又要兼顾2个药典法定种的同时鉴别,另外还要避免云南重楼2个基因型导致的“假阴性”结果。然而,仅凭“1对引物”的

普通PCR方法,将会需要3次PCR才能完成一份样品的鉴别,显然效率低、成本高。为了解决这一问题,本研究选择rDNA-ITS作为鉴别序列,并将3对特异性引物集成到一个PCR体系中,仅需一次PCR即可实现上述鉴定效果,从而建立了对药典法定重楼基原与其混用近缘种进行快速鉴别的多重PCR鉴别体系。

1 材料

1.1 药材样品

本次实验材料包括七叶一枝花34份,云南重楼65份,多叶重楼17份,狭叶重楼10份,南重楼8份,五指莲重楼5份,平伐重楼7份,球药隔重楼22份,黑籽重楼13份,长柱重楼3份。实验材料样本采集地等详细信息见表1。样品经成都中医药大学尹鸿翔副教授鉴定,保存于成都中医药大学民族医药学院实验室。

1.2 试剂

琼脂糖(广州赛国生物科技有限公司),Goldview I型核酸染色剂(北京索莱宝科技有限公司),EasyTaq DNA polymerase,10 × EasyTaq Buffer(Mg²⁺ plus)(北京全式金生物技术有限公司),DNA

表1 实验样本信息

Table 1 Sample information of Paris

样品名称 Sample name	采集地点 Source	部位 Part	份数 Sample quantity	样品名称 Sample name	采集地点 Source	部位 Part	份数 Sample quantity	
七叶一枝花(H) <i>Paris polyphylla</i> var. <i>chinensis</i>	四川大邑	叶	2	狭叶重楼(XY) <i>P. polyphylla</i> var. <i>stenophylla</i>	四川平武	叶	1	
	四川石棉	叶	1		四川北川	叶	5	
	四川平武	叶	2		四川彭州	叶	6	
	四川彭州	叶	7		湖北兴山	根茎	1	
	四川峨眉山	叶	2		甘肃文县	叶	1	
	四川雅安	根茎	5		四川彭州	叶	1	
	四川都江堰	根茎	1		四川大邑	叶	1	
	四川古蔺	根茎	2		四川古蔺	根茎	1	
	四川安县	叶	2		四川雅安	根茎	1	
	四川北川	叶	2		四川崇州	叶	4	
	四川崇州	叶	3		贵州水城	叶	2	
	湖北兴山	叶、根茎	2		南重楼(N) <i>P. vietnamensis</i>	云南金平	叶	4
	江西丰城	叶	1		越南老街黄连山	叶	2	
	贵州黎平	叶	2		老挝丰沙里乌德	叶	2	
云南重楼(YN) <i>P. polyphylla</i> var. <i>yunnanensis</i>	贵州毕节	叶	4	五指莲(WZL) <i>P. axialis</i> var. <i>axialis</i>	四川北川	叶	2	
	贵州大方	叶	2		四川崇州	叶	2	
	贵州大方	叶	5*		四川雅安	叶	1	
	贵州龙里	叶	3*		平伐重楼(PF) <i>P. vaniotii</i>	四川崇州	叶	3
	贵州兴义	叶	1		四川大邑	叶	1	

续表 1 (Continued Tab. 1)

样品名称 Sample name	采集地点 Source	部位 Part	份数 Sample quantity	样品名称 Sample name	采集地点 Source	部位 Part	份数 Sample quantity
	贵州长顺	叶	2				
	贵州长顺	叶	2 *	四川石棉	叶	1	
	贵州安顺	叶	2 *	球药隔重楼(Q)	四川彭州	叶	2
	贵州六枝	叶	7 *	<i>P. fargesii</i>	四川崇州	叶	6
	四川石棉	叶	4		四川平武	叶	1
	四川会理	叶	1		四川大邑	叶	1
	四川大邑	叶	3 *		四川彭州	叶	7
	四川彭州	叶	3 *		江西黄洋界	叶	1
	四川彭州	叶	3		湖南双牌	叶	2
	四川盐源	叶、根茎	2		湖北来凤	叶、根茎	3
	四川盐边	叶、根茎	2		贵州水城	叶	1
	云南腾冲	叶	4	黑籽重楼(HZ)	四川大邑	叶	1
	云南金平	叶	1 *	<i>P. tibetica</i> var. <i>tibetica</i>	四川平武	叶	1
	云南耿马	叶	2 *		四川安县	叶	2
	云南普洱	叶	2		四川北川	叶	2
	云南普洱	叶	2 *		四川彭州	叶	2
	云南宣威	叶	8		四川崇州	叶	2
多叶重楼(DY)	四川崇州	叶	1		四川峨眉山	叶	2
<i>P. polyphylla</i> var. <i>polyphylla</i>	四川雅安	叶	1		甘肃文县	叶	1
	四川普格	叶	1	长柱重楼(CZ)	云南腾冲	叶、根茎	3
				<i>P. forrestii</i>			

注:云南重楼样品有“*”标识的为基因型 II,未有标识的为基因型 I。

Note: *P. polyphylla* var. *yunnanensis* samples of genotype II were marked with “*”, while samples of genotype I were unmarked.

Marker -B, dNTPs Mixture Solution (生工生物工程股份有限公司), 植物组 DNA 提取试剂盒(成都福际生物技术有限公司), α -高聚淀粉酶(思科生物科技有限公司)。

1.3 仪器

Legend Micro 21R 离心机(美国 Thermo), BSA124S 分析天平(Sartorius 科学仪器有限公司), MK-10 干式恒温器(杭州奥盛仪器有限公司), PCR 仪(杭州博日科技有限公司), DDY-12 电泳系统(北京六一仪器厂), 激光成像仪 Typhoon 7000(通用电气医疗集团生命科技部), 微量紫外-分光光度仪(Thermo Nanodrop 2000)。

2 方法

2.1 基因组 DNA 提取

叶片样品硅胶干燥,取 30 mg,用植物组 DNA 提取试剂盒提取总 DNA。根茎样品研粉,过 3 号筛,取 20 mg 粉末,按照植物组 DNA 提取试剂盒说明书进行改进,加蛋白酶的同时添加 20 μ L 的 75%

α -高聚淀粉酶提取总 DNA,4 $^{\circ}$ C 保存。DNA 提取物用通用引物 ITS-4/ITS-L^[4]进行 PCR 扩增,扩增产物取 7.5 μ L,采用 3% 的琼脂糖凝胶电泳成像和微量紫外-分光光度仪验证 DNA 质量。通用引物序列见表 2。

2.2 ITS 测序及特异性引物设计与筛选

在多重 PCR 鉴别体系中,多对特异性引物的设计是最为关键的技术环节。用通用引物 ITS-4/ITS-L 对提取的重楼样品 DNA 模板进行 ITS 序列扩增,每个样品平行扩增 3 次,扩增产物送成都擎科梓熙生物科技有限公司进行测序。用 Megalign 软件对测序结果进行序列校对与分析,找出具有稳定差异的 SNP 位点,用 Pirmer premier 5.0 软件在七叶一枝花和云南重楼的特有 SNP 位点区域分别设计特异性引物,并用设计的引物对重楼样品 DNA 模板进行 PCR 扩增,筛选出特异性好,能够准确区分两个法定品种并能有效鉴别其他常见伪品的引物。

2.3 重楼多重 PCR 扩增体系的建立

PCR 反应体系总体积 25 μ L,其中包括 10 \times EasyTaq Buffer 2.5 μ L, dNTPs mixture 280 μ M,引物对

H-F/H-R 用量 0.15/0.2 μM , 引物对 YN-IF2/YN-IR2 用量 0.25/0.15 μM , 引物对 YN-IIF3/YN-IIR21 用量 0.2/0.25 μM , EasyTaq DNA polymerase 1.5 U, 模板 DNA 30 ng, 无菌双蒸水补充体系至 25 μL 。PCR 反应参数: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 64 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s, 27 个循环后, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min, 12 $^{\circ}\text{C}$ 保存。PCR 扩增反应结束后, 取 PCR 反应产物 7.5 μL , 加 6 \times Loading buffer 混匀后, 于 Goldview I 染色的 3% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 220 V 电压下电泳 20 min, 凝胶成像系统下观察并拍照保存。

3 结果

3.1 模板质量

采用通用引物 ITS 对本实验所有的模板 DNA

进行扩增, 均得到约 700 bp 左右的扩增条带, 表明本实验的模板 DNA 质量符合 PCR 扩增要求。

3.2 法定基原重楼 ITS 序列的 SNP 位点分析及引物设计

在对 65 份不同产地的云南重楼样本的 ITS 序列进行分析时, 发现依据 SNP 位点可以划分为 2 种基因型, 二者在 SNP 上的多样性表现为 40 个位点, 分别编号为: YN-I 和 YN-II, 基因型具体划分标准见表 3。其中, YN-I 型样本有 35 份, YN-II 型样本有 30 份, 为了避免漏检其中之一基因型, 出现云南重楼检测的假阴性, 需要同时设计两个引物对。设计并命名鉴别七叶一枝花的特异性引物对 H-F/H-R, 鉴别云南重楼基因型 I、II 的特异性引物对 YN-IF2/YN-IR2, YN-IIF3/YN-IIR21。引物序列由擎科梓熙生物科技有限公司合成。三对特异性引物序列见表 2。

表 2 引物序列表

Table 2 Primers used in this study

	引物名称 Primers	序列 5'-3' Sequence from 5' to 3'
内转录间隔区 Internal transcribed spacer	ITS-4	TCCTCCGCTTATTGATATGC
	ITS-L	TCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTC
七叶一枝花特异性引物对 Specific primers pair of H	H-F	GCTAGGCAACGCCTACAGCAT
	H-R	GCGAACTACGCCCTGTGGAT
云南重楼特异性引物对 Specific primers pairs of YN	YN-IF2	ACTTTTGACCCACGGGCA
	YN-IR2	CTGTCATTAGATGATGCAGTGGC
	YN-IIF3	CACTCGCCGTGTGCTCTCA
	YN-IIR21	CTGCCTGTGGACACGCTTTATA

表 3 云南重楼两类基因型的 SNP 位点特征

Table 3 SNP site characteristics in two genotypes of *P. polyphylla* var. *yunnanensis*

基因型 Genotypes	变异位点 Variation sites (bp)										
	9	10	34	36	42	55	62	93	127	131	180
YN-I	T	G	C	T	C	T	A	C	G	A	T
YN-II	C	T	T	C	T	C	G	T	A	T	C
	183	193	197	201	211	212	223	395	411	412	413
YN-I	G	A	C	C	A	T	C	T	G	C	G
YN-II	A	G	T	T	C	C	T	C	A	T	A
	439	443	462	471	476	482	500	520	521	526	527
YN-I	G	A	T	G	T	C	C	G	T	G	G
YN-II	A	G	C	A	C	T	T	T	G	C	A
	594	596	599	604	612	615	622				
YN-I	A	G	A	A	G	C	T				
YN-II	G	C	G	G	T	T	C				

3.3 多重 PCR 反应体系的建立及优化

3.3.1 最适引物浓度的考察

设置三对特异性引物 H-F/H-R, YN-IF2/YN-IR2, YN-IIF3/YN-IIR21 的不同浓度比例, 见表 4。考察不同引物浓度对 PCR 扩增反应的影响, 筛选最适引物浓度。通过调整引物用量, 在保证特异性条

带亮度的同时削弱非特异性条带, 并综合考虑节约引物用量, 选择引物浓度比例 E。保证七叶一枝花在 210 bp 有一条明亮条带, 云南重楼基因型 I (YN-I) 在 248 bp 有一条明亮条带, 云南重楼基因型 II (YN-II) 在 149 bp 有一条明亮条带, 见图 1。

表 4 引物浓度优化条件

Table 4 Optimal conditions of specific primers' concentration

组别 Group	引物浓度 Concentration of specific primers (μM)		
	H-F/H-R	YN-IF2/YN-IR2	YN-IIF3/YN-IIR21
A	0.25/0.25	0.25/0.25	0.25/0.25
B	0.2/0.2	0.25/0.2	0.2/0.25
C	0.125/0.125	0.2/0.2	0.125/0.2
D	0.2/0.2	0.25/0.15	0.2/0.25
E	0.15/0.2	0.25/0.15	0.2/0.25
F	0.15/0.2	0.25/0.15	0.15/0.25

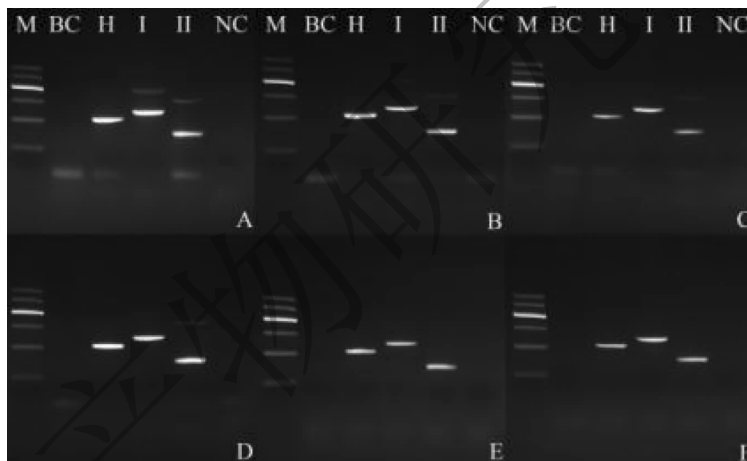


图 1 多重 PCR 体系引物浓度考察电泳图

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of primers concentration investigation

注: M: DNA Marker, 从上至下依次为: 600 bp, 500 bp, 400 bp, 300 bp, 200 bp, 100 bp; BC 为空白对照, H 为七叶一枝花, I 为云南重楼 (基因型 YN-I), II 为云南重楼 (基因型 YN-II), NC 为近缘种多叶重楼阴性对照, 下同。图 A、B、C、D、E、F 中三引物对浓度比即为文中所述。

Note: M: DNA Marker, from top to bottom, the following is: 600 bp, 500 bp, 400 bp, 300 bp, 200 bp and 100 bp; BC is Blank control, H is *P. polyphylla* var. *chinensis*, I is *P. polyphylla* var. *yunnanensis* (YN-I), II is *P. polyphylla* var. *yunnanensis* (YN-II), NC is *P. polyphylla* var. *polyphylla* as the negative control, similarly hereinafter. The concentration of three specific primer pairs in figure A, B, C, D, E and F are as described in the article.

3.3.2 最适 dNTP 浓度的考察

dNTP 浓度分别设置为 120、200、280、400 μM , 考察不同 dNTP 浓度对 PCR 扩增反应的影响, 筛选最适 dNTP 浓度 (图 2)。结果表明, dNTP 随浓度的增加, 对多重 PCR 反应具有抑制作用。当 dNTP 浓度为 120 至 280 μM 时, 可逐渐抑制非特异性条带的产生; 当浓度高于 280 μM 时, 则会开始对特异性鉴别条带产生抑制。因此, 本研究选择 dNTP 浓度

为 280 μM 。

3.3.3 最适 Taq 酶用量的考察

25 μL 体系中 Taq 酶用量分别设置为 0.5、1.5、2.5、3.5 U, 考察不同 Taq 酶用量对 PCR 扩增反应的影响, 筛选最适 Taq 酶用量 (图 3)。结果表明, 0.5 至 3.5 U 的 Taq 酶均可扩增出特异性条带, 当用量达到 1.5 U 以上时, 三条特异性条带亮度较高, 为了弱化非特异性条带的扩增, 本研究选择 Taq 酶用量为 1.5 U。

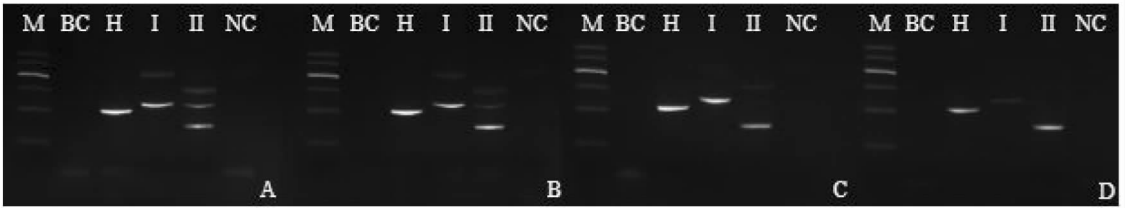


图2 多重 PCR 体系 dNTP 浓度考察电泳图

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of dNTP concentration investigation

注:图 A、B、C、D 中 dNTP 浓度依次为 120、200、280、400 μM

Note: The concentration of dNTP in figure A, B, C and D are 120, 200, 280 and 400 μM

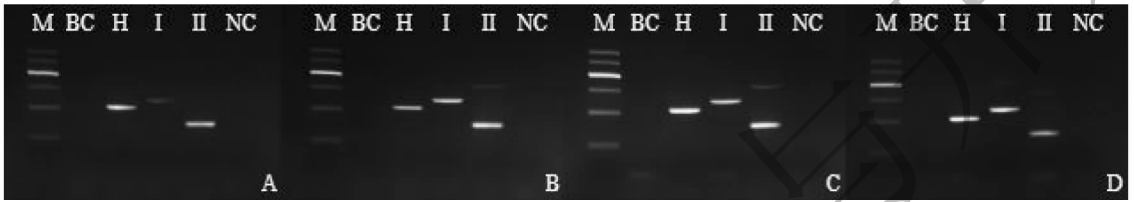


图3 多重 PCR 体系 Taq 酶用量考察电泳图

Fig. 3 Agarose gel electrophoresis of Taq polymerase dosage investigation

注:图 A、B、C、D 中 Taq 酶用量依次为 0.5、1.5、2.5、3.5 U

Note: The dosage of Taq polymerase in figure A, B, C and D are 0.5, 1.5, 2.5 and 3.5 U

3.3.4 最适退火温度的考察

分别设置退火温度为 60、62.4、64.3、66 $^{\circ}\text{C}$, 考察不同退火温度对 PCR 扩增反应的影响, 筛选最适退火温度(图 4)。结果显示, 温度的升高可提高反

应的特异性, 但当退火温度高达 66 $^{\circ}\text{C}$ 时, 特异性鉴别条带亮度较弱, YN-I 的特异性条带甚至几乎无法扩增。因此, 综合考虑退火温度对三对特异性引物扩增效率的影响, 选择 64 $^{\circ}\text{C}$ 为本体系的退火温度。

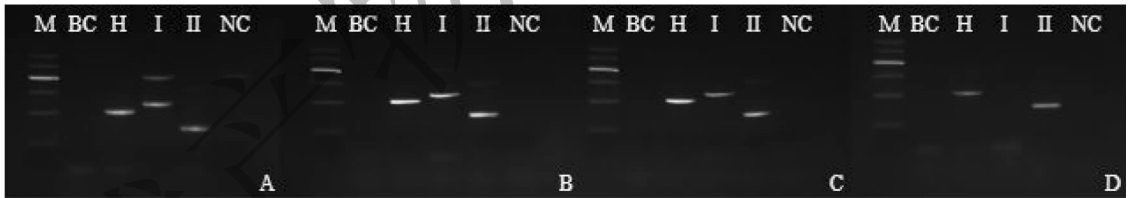


图4 多重 PCR 体系退火温度考察电泳图

Fig. 4 Agarose gel electrophoresis of annealing temperature investigation

注:图 A、B、C、D 中退火温度依次为 60、62.4、64.3、66 $^{\circ}\text{C}$

Note: The annealing temperature in figure A, B, C and D are 60, 62.4, 64.3 and 66 $^{\circ}\text{C}$

3.3.5 最适循环数的考察

分别选用 26、27、28、30 和 32 个循环进行考察,

考察不同循环数对 PCR 扩增反应的影响, 筛选最适扩增循环次数(图 5)。结果表明, 26 至 32 循环时

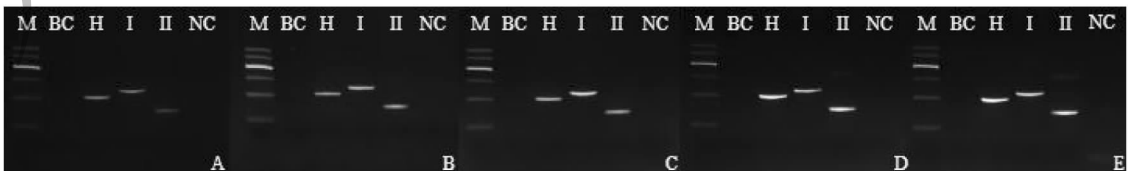


图5 多重 PCR 体系循环数考察电泳图

Fig. 5 Agarose gel electrophoresis of cycles investigation

注:图 A、B、C、D、E 中循环数依次为 26、27、28、30、32

Note: The cycles in figure A, B, C, D and E are 26, 27, 28, 30 and 32

均能扩增出三者的特异性鉴别条带。为保证结果的准确性及避免因循环数过多导致可能的非特异性条带扩增,选择为 27 个循环进行 PCR 反应。

3.3.6 模板量的考察

对反应体系中模板 DNA 的用量进行了考察,分

别设置 10、30、60、90 ng 的模板 DNA 用量(图 6)。结果表明,模板量在 10 ~ 90 ng 时均能扩增出特异性条带,且随着模板 DNA 的增加,扩增条带的亮度呈递增趋势。

具体优化结果见表 5。

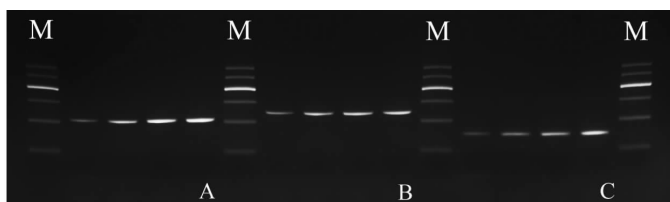


图 6 多重 PCR 体系模板量考察电泳图

Fig. 6 Agarose gel electrophoresis of template quantity investigation

注:图 A、B、C 中样品分别为 H、I、II,每幅图中模板量依次为 10、30、60、90 ng

Note: The samples in figure A, B and C are H, I and II. The template quantities in each figure are 10, 30, 60 and 90 ng

表 5 多重 PCR 体系的优化

Table 5 Optimization of multiplex PCR identification system

优化因素 Optimization factors	条件 Conditions	H	YN-I	YN-II	NC
引物浓度 Primers' concentration (μM)	A	+	△ +	△ +	-
	B	+	△ +	△ +	-
	C	+	+	△ +	-
	D	+	+	△ +	-
	E	+	+	+	-
	F	+	+	+	-
dNTP 浓度 DNTP concentration (μM)	120	+	△ +	△△△ +	△
	200	+	△ +	△△ +	△
	280	+	+	△ +	-
	400	+	△	+	-
Taq 酶用量 Taq polymerase dosage (U)	0.5	+	△	+	-
	1.5	+	+	△ +	-
	2.5	+	+	△ +	-
	3.5	+	△ +	△ +	-
退火温度 Annealing temperature (°C)	60	+	△ +	△△ +	△
	62.4	+	△ +	△ +	△
	64.3	+	+	△ +	-
	66	+	△	+	-
循环数 Cycles	26	+	+	+	-
	27	+	+	+	-
	28	+	+	+	-
	30	+	+	△ +	-
	32	+	△ +	△ +	-

续表 5 (Continued Tab. 5)

优化因素 Optimization factors	条件 Conditions	H	YN-I	YN-II	NC
模板量 Template quantity (ng)	10	+	+	+	-
	30	+	+	+	-
	60	+	+	+	-
	90	+	+	+	-

注：“+”一条亮带，“△”一条暗带，“-”无条带。

Note: “+” one bright band, “△” one dark band, “-” no band.

3.4 多重 PCR 特异性鉴别结果

采用上述所确定的最佳反应体系和反应参数, 用法定基原种及 8 种常见的同属近缘人工栽培品种对所建立的多重 PCR 鉴别体系进行方法适用性验证(图 7)。结果显示七叶一枝花样本可扩增出片段

大小为 210 bp 的特异性片段, 云南重楼种下的两类基因型(YN-I、YN-II)样本可分别扩增出 248 bp 和 149 bp 的特异性片段, 同时得到了阳性鉴定, 而其他同属近缘种无任何片段, 避免了干扰, 易于直观、准确的鉴别。

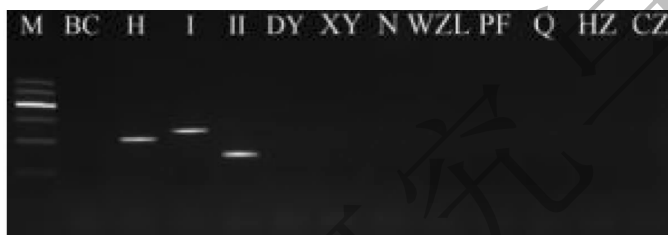


图 7 法定基原种及其常见的 8 种同属近缘人工栽培种的多重 PCR 鉴别电泳图

Fig. 7 Agarose gel electrophoresis of legal origins and their 8 closely related species from cultivated investigation

注: M: DNA Marker, BC 为空白对照, H 为七叶一枝花, I 为云南重楼(YN-I), II 为云南重楼(YN-II), DY 为多叶重楼, XY 为狭叶重楼, N 为南重楼, WZL 为五指莲, PF 为平伐重楼, Q 为球药隔重楼, HZ 为黑籽重楼, CZ 为长柱重楼。

Note: M: DNA Marker, BC is Blank control, H is *P. polyphylla* var. *chinensis*, I is *P. polyphylla* var. *yunnanensis* (YN-I), II is *P. polyphylla* var. *yunnanensis* (YN-II), DY is *P. polyphylla* var. *polyphylla*, XY is *P. polyphylla* var. *stenophylla*, N is *P. vietnamensis*, WZL is *P. axialis* var. *axialis*, PF is *P. vaniotii*, Q is *P. fargesii*, HZ is *P. thibetica* var. *thibetica*, CZ is *P. forrestii*.

4 讨论

在多重 PCR 技术的适用性方面, 该技术能够实现单个反应管中一次性检测多个靶标的目的, 相比普通 PCR 单个反应管中只能通过一对特异性引物检测单个靶标的反应更加高效、经济、快捷, 在农作物^[5-7]、动物^[8,9]、微生物^[10,11]和肿瘤细胞^[12,13]等的鉴别中应用广泛, 也逐渐应用到金钱白花蛇^[14]、人参、西洋参、三七^[15,16]等中药材的鉴别中。在靶序列的选择方面, 朱英杰^[17]等用 6 种 DNA 条形码候选序列对重楼属 11 个物种不同序列的鉴定能力进行评价, 发现 ITS2 序列与其他 DNA 条形码候选序列相比具有明显的优势。姜黎^[4]等对重楼属 8 个物种 4 条 DNA 条形码候选序列进行考察, 认为 ITS 序列能够鉴定重楼与其常见近缘种及饮片, 显示 ITS 序列适宜作为重楼属下鉴定的靶序列。

在对 65 份云南重楼样品进行测序时发现, 云南

重楼序列的种内差异较大, 根据 ITS 序列的 SNP 可分为两种类型。这也符合陈士林^[18]《中药 DNA 条形码分子鉴定》中对 4 条长度为 231bp 的云南重楼 DNA 条形码 ITS2 参考序列对比发现有 27 个变异位点的表述。因此, 本研究首次提出云南重楼应该区分为两类基因型: YN-I 和 YN-II, 为了兼顾两类基因型的云南重楼药材的鉴别, 避免假阴性结果, 分别对两类基因型的云南重楼设计特异性引物。

建立多重 PCR 扩增体系, 引物的设计至关重要, 尤其是同属近缘种之间变异位点少, 保证引物的特异性及引物之间相互不干扰是鉴别成功的关键^[19]。本研究的引物的设计将针对重楼的法定基原七叶一枝花及两种基因型的云南重楼分别设计三对特异性引物。为了保证引物特异性, 本研究把引物 YN-IIR21 的 5'端第八位和第十二位引入了错配, 将原本的核苷酸 G 和 T 突变为核苷酸 T 和 A, 把引物 H-F 的 3'端第二位的核苷酸 G 突变为 A, 把引物

H-R 的 3'端第二位的核苷酸 T 突变为 A,并且所有特异性引物的 T_m 值相差在 4 以内,以保证扩增效率一致。另外,相对于单一引物对 PCR 体系,在建立多重 PCR 扩增体系时,不同引物对的浓度比是影响多重 PCR 特异性和稳定性的关键因素,引物对之间存在相互竞争和互配关系,适宜的浓度比是多重 PCR 体系能稳定扩增的关键因素^[20]。在多基原中药品种重楼同属近缘种繁多的情况下,确定多重引物的浓度是本研究成功的重点及难点,本方法是经过多次试验和条件优化而确定最佳反应体系。

为了保证样品基原的正确,本实验在原植物形态学鉴定的基础之上,对各样本 ITS 序列的单一 PCR 扩增产物进行回收测序,并进行 Genbank 数据库同源性比对分析,从而保证了样品基原的准确性,为实验结果的可靠性奠定了基础。

同属近缘种的混用情况一直是影响中药材质量的一个重要因素,由于其外观性状及显微结构相似,化学成分交叉重叠,导致鉴定困难^[19],重楼作为典型的“同属多基原”品种更是如此。本实验首次建立了重楼药典法定基原与其同属近缘种的多重 PCR 鉴别体系,该方法特异性高,适用性强,只通过一次 PCR 扩增即可准确、快速、可靠地鉴别七叶一枝花和云南重楼这两种药典法定重楼基原,并且能兼顾两类基因型云南重楼药材,避免假阴性,在重楼药材和饮片的真伪鉴别,重楼人工栽培的种子种苗质量控制中值得推广和应用。

参考文献

- Chinese Pharmacopoeia Commission (国家药典委员会). Pharmacopoeia of the People's Republic of China: Vol I (中华人民共和国药典:第一部) [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2015: 260.
- Liu T(刘涛), Zhao YL(赵英良), Yang Y(杨莹), et al. Molecular Identification of *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* using *psbA-trnH* DNA Barcoding [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2015, 27: 758-762.
- Xin BH(辛本华). Genetic diversity and Quality evaluation Studies on Traditional Chinese Medicines of Paridis [M]. Chengdu: Sichuan Agricultural University(四川农业大学), 2012.
- Jiang L(姜黎), Sun Q(孙琴), Zhang C(张春), et al. Molecular identification of Paridis Rhizoma and its adulterants by ITS sequence analysis [J]. *Chin J New Drug* (中国新药杂志), 2013, 22: 2439-2444.
- Dong LM(董立明), Li CC(李葱葱), Xing ZJ(刑珍娟), et al. Rapid Detection of Five Genetically Modified Soybean Lines by Multiplex PCR Method [J]. *Soyb Sci* (大豆科学), 2016, 35: 1002-1006.
- Chen HD(陈浩东), Liu F(刘方), Wang W(王为), et al. Preliminary Study on Multiplex PCR Technique and Its Application in Hybrid Cotton Seed Purity Test [J]. *Cotton Sci* (棉花学报), 2011, 23(1): 22-27.
- Zhang XK(张晓科), Xia XC(夏先春), Wang ZW(王忠伟), et al. Establishment of Multiplex-PCR for Quality Traits in Common Wheat [J]. *Acta Agron Sin* (作物学报), 2007: 1703-1710.
- Wang JB(王金斌), Bai L(白蓝), Li W(李文), et al. Optimization of Five-plex PCR Method for the Identification of Five Animal Species and Analysis of Its Detection Limit [J/OL]. *J Nucl Agric Sci* (核农学报), 2018, 3: 506-514.
- He WL(何玮玲), Zhang C(张弛), Yang J(杨静), et al. A Quick Multiplex PCR Method for the Identification of Four Meat Ingredients in Food Products [J]. *Scientia Agricultura Sinica* (中国农业科学), 2012, 45: 1873-1880.
- Zhang M(张曼), Han F(韩飞). Establishment and application of multiplex PCR assay for detecting avian influenza virus, newcastle disease virus and angara disease virus [J/OL]. *J Northwest Sci-Tech Univ Agri For: Nat Sci* (西北农林科技大学学报, 自科版), 2018, 2: 1-6.
- Wei S(魏霜), Xian YY(洗钰茵), Zhao H(赵晖), et al. Simultaneous Detection of *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahemolyticus*, *Vibrio vulnificus* and *Vibrio cholerae* Using Multiplex PCR [J]. *Sci Agric Sin* (中国农业科学), 2013, 46: 1682-1686.
- Zheng WJ(郑文娟), Chen LJ(陈丽娟), Wu YJ(吴雨洁), et al. Detection of IgVH Mutation Status in Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia by Multiplex PCR [J]. *J Exp Hematol* (中国实验血液学杂志), 2006, 6: 1101-1104.
- Liang LZ(梁立治), He Y(何云), Zhuang ZX(庄志雄), et al. Detection of hMSH2 gene mutations in gynecologic tumor population by multiple PCR-SSCP [J]. *Chin Oncol* (中国癌症杂志), 2003, 2: 32-34.
- Zhang X(张鑫), Wang F(王福), Chen MJ(陈美君), et al. Multiple PCR identification method of *Bungarus multicinctus* and three common adulterants [J]. *Lishizhen Med Mat Med Res* (时珍国医国药), 2015, 26: 2927-2929.
- Liu L(刘丽), Xiao BY(肖炳焱), Luo HM(罗晖明), et al. Identification of *Panax ginseng*, *Panax quinquefolium* and *Panax notoginseng* by multiplex PCR assay [J]. *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 2016, 36: 668-677.
- Jiang C(蒋超), Luo YQ(罗宇琴), Yuan Y(袁媛), et al. I-

- dentification of *Panax ginseng*, *P. notoginseng* and *P. quinquefolius* admixture by multiplex allele-specific polymerase chain reaction[J]. *Chin J Chin Mat Med*(中国中药杂志), 2017,42;1319-1323.
- 17 Zhu YJ(朱英杰), Chen SL(陈士林), Yao H(姚辉), et al. DNA barcoding the medicinal plants of the genus *Paris*[J]. *Acta Pharm Sin*(药学报), 2010,45;376-382.
- 18 Chen SL(陈士林). Molecular Identification of Traditional Chinese Materia Medica using DNA Barcoding(中药 DNA 条形码分子鉴定)[M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2011;350-352.
- 19 Yin XM(尹显梅), Zhang KY(张开元), Rao WX(饶文霞), et al. Development and Application of Multiplex PCR Method for Rapid Detection of *Paris Polyphylla* Smith var. *Chinensis*(Franch). Hara and It's Common Adulterants from Sichuan Province[J]. *Sci Tech Engin*(科学技术与工程), 2017,17;179-185.
- 20 You C(尤超), Zhao DQ(赵大球), Liang CB(梁乘榜), et al. Review of the PCR Primer Design Method[J]. *Mod Agric Sci Technol*(现代农业科技), 2011,17(3):48.
- (上接第 2174 页)
- 6 Ma LH(马利华), He JP(贺菊萍), Qin WD(秦卫东), et al. Study on antioxidant activities of pogadatre tree flower (*Robinia pseudocacia* L.) extract[J]. *Food Sci*(食品科学), 2007,28(9):75-77.
- 7 Lai JS, Lin C, Chiang TM. Tyrosinase inhibitory activity and thermostability of the flavonoid complex from *Sophora japonica* L. (Fabaceae)[J]. *Trop J Pharm. Res*, 2014,13;243.
- 8 Liu JL, Li LY, He GH. Optimization of microwave-assisted extraction conditions for five major bioactive compounds from *Flos Sophorae Immaturus*(cultivars of *Sophora japonica* L.) using response surface methodology[J]. *Molecules*, 2016,21;296.
- 9 Xie Z, Lam S, Wu J, et al. Chemical fingerprint and simultaneous determination of flavonoids in *Flos Sophorae Immaturus* by HPLC-DAD and HPLC-DAD-ESI-MS/MS combine with chemometrics analysis[J]. *Anal Methods*, 2014,6:4328-4335.
- 10 Li ZZ(李振志), Zhu H(朱华), Xie F(谢峰), et al. Determination of rutin in *Flos Sophorae* from different growing areas[J]. *World Chin Med*(世界中医药), 2013,8;952-954.
- 11 Wang J(王憬), Liu HM(刘慧敏), Zhang SF(张书峰), et al. Comparative study on the flavonoids of *Sophora japonica* L. f. *pendula* Lound. Arb. Brit. during different flowering stages[J]. *J Bethune Med Sci*(白求恩医学杂志), 2014,12;561-562.
- 12 Bahchevanska S, Koleva I. A study on the autohydrolysis of rutin to quercetin from *Sophora Japonica* blossoms[J]. *Bio-technology & Biotec Eq*, 2014,10(1):56-58.
- 13 Jeong MK, Hye SYC. Anti-platelet effects of flavonoids and flavonoid-glycosides from *Sophora japonica*[J]. *Arch Pharm Res*, 2008,31;886-890.
- 14 Liu Y(刘宇), Yang J(杨娟), Tuo YL(拖扬凌), et al. Determination of plasma concentration of quercetin, kaempferid and isorhamnetin in *Hippophae rhamnoides* extract by HPLC-MS/MS and pharmacokinetics in rats[J]. *Chin J Chin Mater Med*(中国中药杂志), 2015,40;3859-3865.
- 15 Xu WJ(徐文杰), Zhu Y(朱颖), Chen Z(陈昭), et al. Pharmacokinetics of vitexin, isovitexin and narcissus glycosides from total flavonoids of *Microcos paniculata* L. in rabbits[J]. *Chin Hosp Pharm J*(中国医院药学杂志), 2016,36;1847-1852.
- 16 Fu LN(付丽娜), Liu WH(刘维红), Xu AJ(徐爱军), et al. Inhibition of quercetin on human gastric carcinoma MKN45 cells[J]. *Drugs & Clinic*(现代药物与临床), 2017,32;983-986.
- 17 Yang HX(杨红霞), Wei LX(魏立新), Du YZ(杜玉枝), et al. Analysis of traditional chinese medicine constituents from *Swertia chuanxiong* at different altitudes by HPLC[J]. *Chin Med Mat*(中药材), 2010,33;867-869.
- 18 Zhou Y(周云), Li Y(李延), Wang XM(王戎梅). Suitable habitats prediction of original plants of *Rhei Radix* et *Rhizoma* under climate change[J]. *Chin Med Mat*(中药材), 2015,38;467-472.
- 19 Qin WH(秦伟瀚), Yang Y(阳勇), Liu X(刘翔), et al. Correlations between quality and species, altitude, taxa of *Epimedium* plants by UPLC-MS/MS[J]. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2017,29;278-283.