

• 药材与资源 •

浙贝母特异性 PCR 鉴定方法研究

李 敏, 黄龙妹, 赵 欣, 陈 强

浙江工业大学药学院, 浙江 杭州 310032

摘要: 目的 利用特异性引物对浙贝母 *Fritillaria thunbergii* 进行特异性 PCR 鉴定。方法 回收 RAPD 扩增筛选到的浙贝母分子标记 ZB1 基因, 将其连接进入 T-载体克隆并测序。根据测序结果设计一对特异性引物 P2/P3, 以贝母基因组 DNA 为模板进行特异性 PCR 扩增。结果 特异性 PCR 鉴定结果为浙贝母在约 750 bp 处出现特异性条带, 其他贝母品种则未出现条带。结论 浙贝母特异性 PCR 鉴定方法操作简单, 准确、灵敏、重复性好, 具有较好的应用前景。

关键词: 浙贝母; RAPD; 分子鉴定; 特异性 PCR; 分子标记

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2014)12-1754-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.12.020

Specific PCR identification of *Fritillaria thunbergii*

LI Min, HUANG Long-mei, ZHAO Xin, CHEN Qiang

College of Pharmaceutical Science, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310032, China

Abstract: **Objective** To identify *Fritillaria thunbergii* using special primer by specific PCR. **Methods** Gene footprint of *F. thunbergii* named ZB1 was screened from RAPD amplification. Reclaimed ZB1 gene was inserted into T-vector to be cloned and sequenced. One pair of specific primers P2/P3 were designed according to the ZB1 sequence, and applied in specific PCR reaction using genome DNA of *F. thunbergii* as template. **Results** A specific band around 750 bp was detected in *F. thunbergii*, while nothing appeared in other varieties. **Conclusion** The method is convenient, reproducible, and precise, with broad application prospects.

Key words: *Fritillaria thunbergii* Miq.; RAPD; molecular identification; specific PCR; molecular marker

浙贝母为道地药材“浙八味”之一, 具有润肺止咳的功效, 用药历史悠久。贝母品种较多, 除了浙贝母外, 贝母主要品种还包括川贝母、湖北贝母、平贝母和伊贝母, 另外流通领域还存在较多贝母伪品。不同品种的贝母药效差异显著, 而且价格相差较大, 需要建立一种准确、高效的鉴定方法^[1-2]。目前, 较多学者利用 RAPD 技术对浙贝母及其他药材进行分子鉴定, 但是由于 RAPD 实验应用的是随机引物, 导致实验结果重复性差, 无法推广应用^[3-9]。

本实验室在贝母 RAPD 实验^[10]的基础上筛选到一条浙贝母分子标记, 命名为 ZB1 基因。ZB1 基因作为浙贝母分子标记, 只存在于浙贝母中, 在其他品种中不存在, 具有很高的特异性。本实验研究 ZB1 基因的克隆和测序, 以及利用测序结果设计的特异性引物, 实现浙贝母特异性 PCR 鉴定。这种方法由于使用了特异性引物, 具有准确、高效的优点, 兼具灵敏度和适用性, 可以制备成试剂盒推广应用,

具有极佳的应用前景。

1 材料与方法

1.1 材料

贝母品种包括浙贝母 *Fritillaria thunbergii* Miq.、川贝母 *F. cirrhosa* D. Don、湖北贝母 *F. hupehensis* Hsiao et K. C. Hsia、平贝母 *F. ussuriensis* Maxim 和伊贝母 *F. pallidiflora* Schrenk, 分别采自于浙江、四川、湖北、吉林和伊犁贝母主产地。其中浙贝母来自鄞州、磐安和象山 3 个不同产地。样品经浙江工业大学华云芬副教授鉴定为正品。

快速植物基因组提取试剂盒、UNIQ-10 柱式 DNA 回收试剂盒、EZ-10 Spin Column Plasmid DNA Minipreps Kit 及 PCR 相关试剂购自生工®生物工程(上海)有限公司。RAPD 引物 P1 和特异性引物 P2/P3 由生工®生物工程(上海)有限公司合成。pMD®18-T Vector 载体试剂盒由宝生物工程(大连)有限公司生产。*E. coli* DH₅ α 为实验室保存菌种。琼

收稿日期: 2013-12-07

作者简介: 李 敏 (1975—), 女, 浙江杭州人, 副教授, 硕士生导师, 研究方向为中药分子鉴定。Tel: 13757155117 E-mail: limin@zjut.edu.cn

脂糖、溴化乙锭、X-gal、IPTG、Amp、LB 液体培养基、琼脂粉购自生工[®]生物工程(上海)有限公司。实验使用的 PCR 扩增仪 MyCycle[™] Thermal Cycler, 电泳仪 Power Pac[™] Basic, 凝胶成像系统 Molecular Imager[®] Gel Doc[™] XR+Imaging System, 均为 Bio-Rad 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 RAPD 扩增 用快速植物基因组提取试剂盒提取贝母基因组 DNA。以贝母基因组 DNA 为模板, 进行 RAPD 扩增, RAPD 引物 P1 的序列为 5'-CGACGAAGAA-3'。RAPD 扩增体系为: 2 μ L 10 $\times$ PCR 缓冲液, 1.2 μ L MgCl₂ (25 mmol/L), 0.5 μ L dNTPs (10 mmol/L), 0.3 μ L Taq DNA polymerase, 0.5 μ L RAPD 引物 P1 (20 μ mol/L), 1.2 μ L 贝母基因组 DNA 模板, 补加 ddH₂O 至总体积为 20 μ L。RAPD 扩增条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 42 $^{\circ}$ C 复性 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min, 30 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。RAPD 扩增产物在 1.2% 琼脂糖凝胶中进行电泳, 胶板经溴化乙锭染色后在凝胶成像系统中进行观察, 并照相保存。

1.2.2 浙贝母分子鉴定标记的回收、克隆和测序分析 RAPD 扩增结果, 将浙贝母分子标记用刀片小心切下, 用 UNIQ-10 柱式 DNA 回收试剂盒回收纯化。将纯化产物与 pMD[®]18-T Vector 载体进行连接, 导入大肠杆菌 *E. coli* DH_{5 α 感受态细胞中进行增殖。用灭菌牙签随机挑取数个在含有 X-gal、IPTG、Amp 的 LB 琼脂平板培养基上长出的白色单菌落, 分别接种于含 AMP 0.1 mg/mL 的 50 mL LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C、300 r/min 振荡培养 10~12 h。用 EZ-10 Spin Column Plasmid DNA Minipreps Kit 从菌体培养液中提取质粒。经过凝胶电泳鉴定后的重组质粒由南京金斯瑞生物科技有限公司用 M13-47 (5'-CGCCAGGGTTTCCAGTCACGAC-3') 通用引物进行序列测定。}

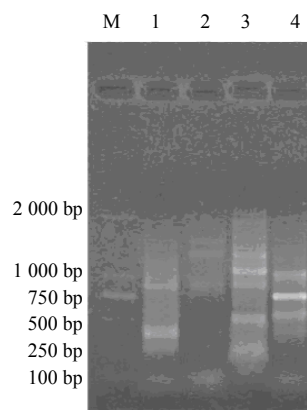
1.2.3 浙贝母特异性 PCR 鉴定方法 根据测序结果, 设计并合成一对特异性引物 P2/P3, 以贝母基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增。PCR 扩增体系: 2 μ L 10 $\times$ PCR 缓冲液, 1.2 μ L MgCl₂ (25 mmol/L), 0.5 μ L dNTPs (10 mmol/L), 0.3 μ L Taq DNA polymerase, 0.5 μ L 上游引物 P2 (20 mmol/L), 0.5 μ L 下游引物 P3 (20 μ mol/L), 1.2 μ L 贝母基因组 DNA 模板 (50 ng/ μ L), 补加 ddH₂O 至反应液总体积 20 μ L。PCR 扩增条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 94 $^{\circ}$ C

变性 30 s, 60 $^{\circ}$ C 复性 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min, 30 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。PCR 扩增产物在 1.2% 琼脂糖凝胶中进行电泳, 胶板经溴化乙锭染色后在凝胶成像系统中进行观察, 并照相保存。为了检测浙贝母特异性 PCR 鉴定方法的灵敏度和适用范围, 将贝母基因组 DNA 模板分别进行梯度稀释和等量混合后按照上述方法进行 PCR。

2 结果与分析

2.1 RAPD 扩增结果

RAPD 扩增图谱如图 1 所示, 该图谱条带清晰, 呈多态性分布, 在 750 bp 处出现了只有浙贝母有, 而其他贝母均无的条带, 表明其所含的基因片段为浙贝母品种所特有, 可以作为浙贝母分子标记, 命名为 ZB1 基因。



M-Marker 1-平贝母 2-湖北贝母 3-川贝母 4-浙贝母
M-Marker 1-*F. cirrhosa* 2-*F. hupehensis* 3-*F. cirrhosa*
4-*F. thunbergii*

图 1 RAPD 扩增图谱

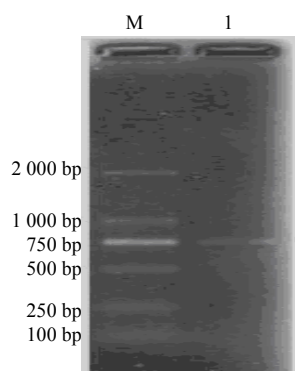
Fig. 1 RAPD amplification

2.2 浙贝母分子标记的回收、克隆和测序

用刀片将 750 bp 处的条带小心切下后用胶回收试剂盒进行回收, 电泳检测结果见图 2。回收片段大小约为 750 bp, 条带清晰完整, 没有降解弥散现象, 表明回收质量佳。将回收的 ZB1 基因与 T 载体相连形成重组质粒后转化入大肠杆菌进行克隆。挑选克隆子, 提取重组质粒进行测序。测序结果(图 3)显示浙贝母分子标记的序列总长度为 745 bp, 5'端和 3'端出现了跟 RAPD 引物 P1 序列一致的回文序列, 表明此序列确为 ZB1 基因序列。

2.3 浙贝母特异性 PCR 鉴定方法

根据测序结果设计并合成一对特异性引物 P2/P3。引物序列为 P2: 5'-ACAGTACTGGGGGA-



M-Marker 1-浙贝母分子标记 ZB1 基因

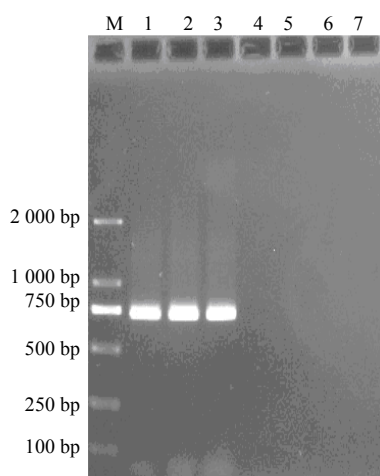
M-Marker 1-Molecular marker ZB1 from *F. thunbergii*

图2 浙贝母分子标记 ZB1 基因电泳图

Fig. 2 Electrophoresis results of ZB1 gene from *F. thunbergii*

5'-CGACGAAGAACGGACAGTACTGGGGGAGAAGTCAAATACTGTTTATCTGCCTGAAGGCTGCTTCGCACTCTTCCGTCATTCAAACCTCTCTGCTTCCTCATAGCATCGCTGTAAAAGTTTTATCTTGTCGGATGATCTTGATATGAAGCGGTAAAGGGCTGCTATCTTCCACTCAGTACCTGTATGCTTTCACTGTTTTGGGGCTTTCCATCCCCAGTATCGATTTTGTGCGCTGGATCTGCGCTGATTCTTCTTGTGCACTATGTGCCCTAAGAACTTACCTAAAGCTACTCCAAATATGCATTTTTTGGATTCAATTTCAAGGGAGAAGATGCGTAATCGGTGCAAGGCCTCCTCTAGGTTCTGGATATGATCCTCCTTTTTAGAACTTTTACCAGTAAATCATCAATTTATGTGCCCTACTGTTTCCCTAGTAGCCCTTGAAAGATTCTGGTAATCAACCGTTGAAAAGTTGCTCCTGCATCTTAAAGTCCAAAGGGCATCACCGTGTAGCAATATAACCTAAGGGAGTAGTGAAACTGGTGTGTTCTCATCTTGCAGATTAACTTGATTTGATTATAGCCTGAACAGGCATCCAAAAAAGATATCCTCTCGTGACCCACCAAGTCCACCAACTGGCATATCCGTGGTAGCGGGAACTGTCTCTGGGACAGGCTTTATTTAGATCTGTGTAGTCGACACATACCTCCATTGCGGTTCTTCGTCG-3'

图3 浙贝母分子标记 ZB1 基因的测序结果

Fig. 3 Sequence of ZB1 gene from *F. thunbergii*

M-Marker 1-鄞州产浙贝母 2-磐安产浙贝母 3-象山产浙贝母 4-川贝母 5-湖北贝母 6-平贝母 7-伊贝母

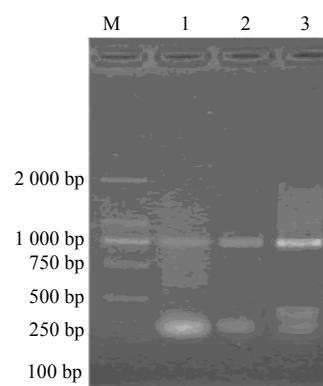
M-Marker 1-*F. thunbergii* from Yinzhou 2-*F. thunbergii* from Panan 3-*F. thunbergii* from Xiangshan 4-*F. cirrhosa* 5-*F. hupehensis* 6-*F. ussuriensis* 7-*F. pallidiflora*

图4 浙贝母特异性 PCR 扩增图谱

Fig. 4 Specific PCR amplification of *F. thunbergii*

GAAGTC-3', P3: 5'-CAAATGGAGGGTATGTGTCG-3', 其分别对应于 ZB1 基因上的 14~33 位点和 713~732 位点。以贝母基因组 DNA 为模板, 特异性引物 P2/P3 为引物进行特异性 PCR 扩增, 实验结果见图 4。来自 3 个不同产地的浙贝母基因组 DNA 均在约 750 bp 处扩增出单一明亮的条带, 其他贝母品种在此位点上均无条带出现。实验重复 5 次, 实验结果均保持稳定, 证明应用浙贝母特异性 PCR 鉴定方法, 可以鉴定浙贝母, 并且重复性好, 明显改善了 RAPD 反应重复性差的缺点。

浙贝母基因组 DNA 模板的浓度被梯度稀释后进行 PCR。PCR 结果见图 5, 当模板浓度稀释 1 000 倍后, 即用量为 0.06 ng 时, 在约 750 bp 处依然出现浙贝母的特异性条带, 经过多次重复验证, 结果保持稳



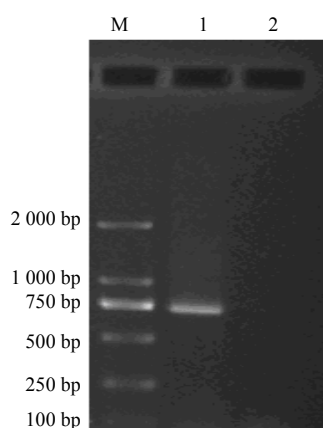
M-Marker 1-0.1%浙贝母基因组 DNA 2-1%浙贝母基 DNA 3-10%浙贝母基因组 DNA

M-Marker 1-0.1% DNA of *F. thunbergii* 2-1% DNA of *F. thunbergii* 3-10% DNA of *F. thunbergii*

图5 浙贝母特异性 PCR 鉴定方法对不同浓度样品的鉴定图谱

Fig. 5 Specific PCR amplification of *F. thunbergii* with different concentration

定,证明浙贝母特异性 PCR 鉴定方法的灵敏度很高,含量极微弱的浙贝母也能够被鉴定出来。将贝母基因组 DNA 等量混合后进行 PCR。PCR 结果见图 6,泳道 2 中为川贝母、湖北贝母、平贝母和伊贝母基因组 DNA 的等量混合物,没有加入浙贝母基因组 DNA,结果显示无扩增条带出现。泳道 1 中加入的为浙贝母、川贝母、湖北贝母、平贝母和伊贝母基因组 DNA 的等量混合物,结果显示,750 bp 处出现了明亮的条带,浙贝母在 5 种贝母的混合材料中被很好地鉴定了出来。经过重复验证,结果保持稳定,表明浙贝母特异性 PCR 鉴定方法不仅可以检测单个浙贝母样品,还可以在混合物中检测出浙贝母,适用范围较广。



M-Marker 1-浙贝母、川贝母、湖北贝母、平贝母和伊贝母混合基因组 DNA 2-川贝母、湖北贝母、平贝母和伊贝母混合基因组 DNA
M-Marker 1-mixed DNA samples of *F. thunbergii*, *F. cirrhosa*, *F. hupehensis*, *F. ussuriensis*, and *F. pallidiflora* 2-mixed DNA sample of *F. cirrhosa*, *F. hupehensis*, *F. ussuriensis*, and *F. pallidiflora*

图 6 浙贝母特异性 PCR 鉴定方法对混合样品的鉴定图谱

Fig. 6 Specific PCR amplification of mixed samples

3 讨论

利用 RAPD 引物 P1 进行 RAPD 扩增后得到的浙贝母分子标记 ZB1 基因是本实验室在大量工作(近千条 RAPD 引物)基础上筛选出来的。该分子标记在 RAPD 多态性分布良好的情况下,显示出特异性条带清晰、明亮,是一条十分理想的分子标记。ZB1 基因进行测序后,对其序列编码的蛋白质信息进行了分析,发现该片段为非编码区。目前 GenBank 中尚未存储浙贝母基因序列,ZB1 基因序列是首个被测定的浙贝母基因组 DNA 序列。在建立浙贝母

PCR 鉴定方法时,对退火温度进行了研究,当退火温度低于 60 °C 时,图谱中会出现一些非特异性扩增条带,所以浙贝母特异性 PCR 鉴定方法中的关键条件为退火温度。本实验建立的浙贝母特异性 PCR 鉴定方法可以直接对单一样品进行鉴定,不需要通过多种样品间的相互比较图谱来做出鉴定,这是该法与 RAPD 的最大不同之处,因此该法具有操作简单、准确、应用范围广等优点。浙贝母特异性 PCR 鉴定方法使用的是特异性引物,与 RAPD 相比,结果重复性好、灵敏度高,适合开发成检测试剂盒,具有很好的应用前景。

在检验特异性 PCR 鉴定方法时使用了 5 种贝母主要品种,浙贝母选用了 3 个产地。今后打算将研究内容扩展到其他贝母药用品种、贝母伪品以及百合科非中药植物,以它们的基因组 DNA 为模板来进一步验证该方法的准确性。还将在 ZB1 基因内部设计一条套嵌引物,与特异性引物 P2/P3 联合使用,利用套嵌引物进行浙贝母 PCR 鉴定,其准确性将会进一步得到提高。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [2] 王蕊,周红超. 浅议贝母药材的生药学鉴定 [J]. 中国实用医药, 2011, 6(15): 244-245.
- [3] 刘春林,官春云,李 桐. 植物 RAPD 标记的可靠性研究 [J]. 生物技术通报, 1999(2): 31-34.
- [4] 卞云云,李 萍,高志秋,等. RAPD 技术在中药贝母类研究中的应用 [J]. 中草药, 2000, 31(1): 13-15.
- [5] 陆 含,朱世华,周书军,等. 浙贝母 4 品种及 5 种贝母遗传多样性的 RAPD 分析 [J]. 宁波大学学报: 理工版, 2009, 22(1): 44-47.
- [6] 李玉峰,唐 琳,陈 放. 8 种贝母的 RAPD 分析 [J]. 中成药, 2006, 28(10): 1528-1529.
- [7] 田俊生,史碧云,张福生,等. 驴皮药材 RAPD 分析方法建立及其与伪品马皮的鉴别 [J]. 中草药, 2013, 44(3): 354-358.
- [8] 尹春萍,刘文涛,徐顺清,等. 湖北贝母与川贝母随机扩增引物 DNA 的鉴别 [J]. 医药导报, 2007, 26(4): 359-361.
- [9] 李隆云,陈大霞,钟国跃,等. 我国仙茅属植物遗传关系的 RAPD 分析 [J]. 中草药, 2011, 42(5): 980-984.
- [10] 李 敏,赵 欣. 三种南方贝母的 RAPD 分析 [J]. 浙江工业大学学报, 2012, 40(6): 634-638.