

快速 PCR 法鉴别鱼腥草与百部还魂的方法研究

魏艺聪¹, 袁媛², 陈建雄¹, 车苏容¹, 赵玉洋^{2*}, 梁一池¹

1. 福建中医药大学药学院, 福建 福州 350122

2. 中国中医科学院中药资源中心, 道地药材国家重点实验室培育基地, 北京 100700

摘要: 目的 建立鉴别鱼腥草 *Houttuynia cordata* 与百部还魂 *Gymnotheca chinensis* 的特异性 PCR 方法。方法 采集不同产地的鱼腥草与百部还魂样品各 8 份, 所有样品提取总 DNA。通过对其 matK 片段进行扩增、测序, 进行同源比对后根据其变异位点设计特异鉴别引物, 建立特异 PCR 鉴别方法, 并通过加入 SYBR Green I 染料法对 2 种中药进行快速检测。另外, 构建多重 PCR 体系, 只经一个 PCR 反应, 就能对鱼腥草与百部还魂进行快速分子鉴定。结果 所构建特异 PCR 与多重 PCR 体系均能产生鱼腥草 185 bp 的特异鉴别条带, 百部还魂 389 bp 的特异鉴别条带, SYBR Green I 染料可进行快速检测方法。结论 建立的鱼腥草与百部还魂 2 种中药的快速 PCR 鉴别方法简便、可靠。

关键词: 鱼腥草; 百部还魂; 特异性 PCR; 多重 PCR 体系; matK

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2016)12-2163-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.12.025

Rapid PCR identification of *Houttuynia cordata* and *Gymnotheca chinensis*

WEI Yi-cong¹, YUAN Yuan², CHEN Jian-xiong¹, CHE Su-rong¹, ZHAO Yu-yang², LIANG Yi-chi¹

1. College of Pharmacy, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China

2 State Key Laboratory of Dao-di Herbs, National Resource Center for Chinese Materia, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China

Abstract: Objective For rapid identification of *Houttuynia cordata* and *Gymnotheca chinensis*, the specific PCR for mutual authentication of them was established based on the SNPs in matK sequence. **Methods** *H. cordata* and *G. chinensis* samples from different origins were collected, total DNA of all samples was extracted, and the matK gene was sequenced. SNPs in the matK sequences of all the samples were found by ClustalX 2.1 program. Primers for identifying *H. cordata* and *G. chinensis* were designed according to the SNP site, and specific PCR method was established to identify them, for rapid detection by addition of SYBR Green I dye. In addition, constructing a multi-PCR reaction system, and then the PCR reaction system was optimized. **Results** The band special for *H. cordata* (185 bp) and band special for *G. chinensis* (389 bp) were found using specific PCR reaction and multi-PCR reaction, and SYBR Green I dye can be used for rapid detection. **Conclusion** The multi-PCR reaction system could be used to identify *H. cordata* and *G. chinensis*.

Key words: *Houttuynia cordata* Thunb.; *Gymnotheca chinensis* Decne.; SNP; multi-PCR reaction system; matK

鱼腥草为三白草科植物蕺菜 *Houttuynia cordata* Thunb. 的新鲜全草或干燥地上部分。百部还魂为同科植物裸蒴 *Gymnotheca chinensis* Decne. 的全草或叶。两者功效和主治均不相同, 但由于分布相同, 常混生, 形态相似, 因此极易误采误用^[1]; 鱼腥草与百部还魂的鉴别可从原植物的形态与显微特征等传统手段进行。但是对于干燥或经过加工的样品,

传统方法进行准确鉴别具有难度。而利用化学成分的分析进行鉴定, 则非常繁琐复杂, 且当二者有混杂时, 难以判断。因此急需建立二者间的快速鉴定方法。由于叶绿体 DNA 较核基因组 DNA 具有更高的拷贝数, 在植物相关产品中更为稳定, 本研究分析了来源于不同居群的鱼腥草与百部还魂的叶绿体 DNA matK 区的 SNP, 获得相互鉴别稳定的 SNP 位

收稿日期: 2016-01-23

基金项目: 中医药行业专项资助 (201407003); 校管-科研创新平台专项资助 (X2015014-平台)

作者简介: 魏艺聪 (1981—), 男, 讲师, 研究方向为中药生物技术。E-mail: yicongwei@126.com

*通信作者 赵玉洋, 主要从事分子生药学研究。Tel: (010)64014411-2956 E-mail: zhaoyuyang0618@163.com

点, 基于这些位点设计相互鉴别的特异引物, 并利用这些特异引物分别建立了特异扩增鱼腥草与百部还魂的 PCR 体系。在 PCR 产物中加入 SYBR Green I 染料对真伪结果可进行快速检测。结合 DNA 快速提取技术, 可大大提高检测效率, 从而建立便捷的 2 种药材的鉴定方法。为了进一步实验同时对受试样品进行阳性检测, 可帮助判断受试样品具有相互混杂, 本研究进一步建立多重 PCR 体系, 可进行快速、有效、稳定地鉴定鱼腥草与百部还魂, 以监控这些产品的质量。

1 仪器与材料

1.1 仪器

5332PCR 仪(Eppendorf), DYY-12 电泳系统(北京市六一仪器厂), 凝胶成像分析仪 (BIO-RAD ChemiDoc XRS), 5810R 低温冷冻离心机(Eppendorf), 微量移液器 (Eppendorf), ZF-7A 型手持式紫外灯 (Eppendorf)。

1.2 材料

琼脂糖 (Promega 公司), Goldview (北京索莱宝科技有限公司), TransStart[®]TopTaq DNA Polymerase (北京全式金公司), 1 000 SYBR Green I 染料 (Invitrogen 公司)。样品由福建中医药大学陈建雄教授鉴定并收集不同产地的样品为鱼腥草 *Houttuynia cordata* Thunb 和百部还魂 *Gymnotheca chinensis* Decne., 具体信息见表 1。

表 1 材料信息

Table 1 Basic information of materials

编号	物种	产地
1	鱼腥草 <i>Houttuynia cordata</i>	福建建阳
2	鱼腥草 <i>Houttuynia cordata</i>	福建建阳
3	鱼腥草 <i>Houttuynia cordata</i>	福建南平
4	鱼腥草 <i>Houttuynia cordata</i>	广东揭阳
5	鱼腥草 <i>Houttuynia cordata</i>	广东河源
6	鱼腥草 <i>Houttuynia cordata</i>	广西百色
7	鱼腥草 <i>Houttuynia cordata</i>	湖北宜昌
8	鱼腥草 <i>Houttuynia cordata</i>	湖北宜昌
9	百部还魂 <i>Gymnotheca chinensis</i>	广东河源
10	百部还魂 <i>Gymnotheca chinensis</i>	广东河源
11	百部还魂 <i>Gymnotheca chinensis</i>	广西百色
12	百部还魂 <i>Gymnotheca chinensis</i>	广西百色
13	百部还魂 <i>Gymnotheca chinensis</i>	广西河池
14	百部还魂 <i>Gymnotheca chinensis</i>	广西崇左
15	百部还魂 <i>Gymnotheca chinensis</i>	湖北宜昌
16	百部还魂 <i>Gymnotheca chinensis</i>	湖北宜昌

2 方法

2.1 基因组 DNA 的提取和纯化

干燥样品采用碱裂解法进行基因组 DNA 的提取^[2], 所提 DNA 稀释 20~100 倍后作为 PCR 模版, 进行后续实验检测。

2.2 通用引物 matkF 与 matkR 扩增 matK 基因序列

扩增序列的通用反应体系: 总体积 20 μ L, 其中包括 Taq 酶 1 U, 10 \times buffer 缓冲液 2.0 μ L, dNTP 20 nmol, 2 μ mol/L 引物各 2 μ L, 灭菌蒸馏水补足 20 μ L。PCR 反应程序: 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min 后, 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 30 个循环后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。获得 PCR 产物通过 1.2% 琼脂糖凝胶电泳, 并用 Goldview 染色观察。

2.3 引物设计

对所获得的 PCR 产物进行测序, 获得 16 条序列; 用 ClustalX 2.1 软件对所有序列进行多重比对, 筛选鱼腥草与百部还魂的特异位点, 根据特异引物设计的优化原则, 通过特异位点设计鱼腥草与百部还魂的相互鉴别的特异引物。

2.4 特异性 PCR 鉴别鱼腥草与百部还魂

分别利用鱼腥草及百部还魂的特异性引物 HcF、GcF 与通用引物反向 HgR 构建 2 个 PCR 体系, 反应体系同上, 应用 TopTaq DNA 聚合酶热反应体系, 通过设置退火温度梯度 (50.0、50.5、51.6、53.2、55.1、56.7、57.6、58.0 $^{\circ}$ C) 考察不同退火温度对特异性 PCR 扩增稳定性的影响。为了建立更加简便的检测方法, 在 20 μ L PCR 产物中加入 2 μ L SYBR Green I 染料于 365 nm 紫外波长下检测荧光。

2.5 多重 PCR 鉴定体系建立及样品检测

利用鱼腥草及百部还魂的特异性引物 HcF、GcF 与通用反向引物 HgR 构建一个多重 PCR 体系, 除了特异引物 HcF、GcF 的浓度减半, 其余反应体系同上, 应用 TopTaq DNA 聚合酶热反应体系, 通过设置退火温度梯度 (50.0、50.5、51.6、53.2、55.1、56.7、57.6、58.0 $^{\circ}$ C) 考察不同退火温度对多重 PCR 扩增稳定性的影响。利用所构建的多重 PCR 体系, 选择最合适退火温度对候选样品进行多重 PCR 扩增检测, 循环数设置 30 个循环。

3 结果分析

3.1 引物设计

经测序, 获得鱼腥草与百部还魂样品 936 bp 的 matK 序列, 用 ClustalX 2.1 软件对所有序列进行多重比对, 筛选获得鱼腥草、百部还魂的特异位点,

发现在该 936 bp 的序列区中, 位于该序列第 654~678 位点间有多个 SNP 位点及第 371~372 位点间有 2 个 SNP 位点, 根据第 654~678 位点间的 SNP 位点设计鱼腥草的鉴别引物 HcF, 为了提高该引物的特异性, 在其 3' 端倒数第 2 个碱基有 C 转换成 G。另外根据第 371~372 位点间有 2 个 SNP 位点设计百部还魂特异的鉴别引物 GcF, 同时设计这 2 个特异引物的共同反向引物 HgR。(图 1 和表 2)。

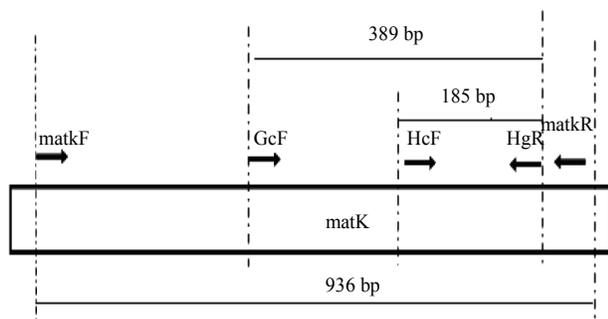


图 1 鱼腥草与百部还魂鉴别方法示意图

Fig. 1 Theory for authentication of *H. cordata* and *G. chinensis*

表 2 所用引物

Table 2 Primers in this paper

名称	序列(5'→3')
matkF	CGATCTATTCATTCAATATTTTC
matkR	TCTAGCACACGAAAGTCGAAGT
HcF	AAGGAGTAACATGCTAGAGAACTGG
GcF	TGTCAGATATCAAGGAAAATCTA
HgR	CAAATCGCTCCATAATATCAGAATC

3.2 特异性 PCR 快速鉴别受试鱼腥草与百部还魂

分别利用鱼腥草与百部还魂的特异性引物 HcF、GcF 与共同的反向引物 HgR 构建了 2 个 PCR 体系, 通过退火温度梯度实验, 分析退火温度对 PCR 反应效率的影响, 结果显示, 这 2 个反应体系在退火温度 50~58 °C 条件下均能扩增出鱼腥草 185 bp 的特异鉴别条带, 百部还魂 389 bp 的特异鉴别条带。

选择退火温度 52 °C, 使用以上建立的反应体系, 分别对来源于不同居群的鱼腥草、百部还魂样品进行鉴别, 受试 8 个鱼腥草样品, 8 个百部还魂样品分别检测到相应的阳性特异性条带(图 2、3), 而阴性样品则扩增不到条带。表明该体系具有特异性, 可以直接鉴别鱼腥草和百部还魂样品。

为了建立更加简便的检测方法, 在 20 μL PCR

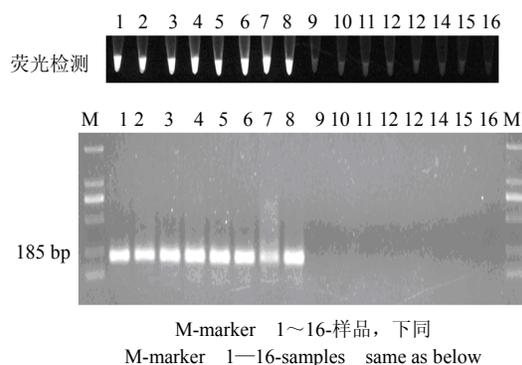


图 2 185 bp 条带特异性 PCR 鉴别鱼腥草与百部还魂凝胶电泳

Fig. 2 Amplification of *H. cordata* and *G. chinensis* in 185 bp strip

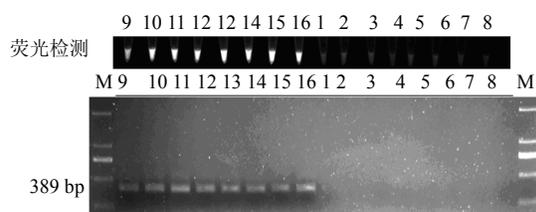


图 3 389 bp 条带特异性 PCR 鉴别鱼腥草与百部还魂凝胶电泳

Fig. 3 Amplification of *H. cordata* and *G. chinensis* in 389bp strip

产物中加入 2 μL SYBR Green I 染料于 365 nm 紫外波长下检测荧光, 2 个特异引物扩增体系所检测的阳性样品均可发出荧光, 而阴性样品均未见荧光。表明该方法可更简便对受试样品进行鉴别。

3.3 建立鉴别鱼腥草和百部还魂的多重 PCR 体系

为了同时鉴别鱼腥草与百部还魂的阳性样品, 用于检测受试样品是否相互混杂, 本研究进一步建立多重 PCR 体系。利用鱼腥草与百部还魂的特异性引物 HcF、GcF 与共同的反向引物 HgR 构建多重 PCR 体系, 通过退火温度梯度实验, 分析退火温度对 PCR 反应效率的影响, 结果显示, 反应体系在退火温度 50~54 °C 条件下均能扩增出鱼腥草 185 bp 的特异性鉴别条带, 百部还魂 389 bp 的特异性片段。

选择退火温度 52 °C, 使用以上建立的多重 PCR 体系, 对 1~8 号鱼腥草样品、百部还魂样品以及由 1 号鱼腥草样品与 9 号百部还魂样品的混合样品进行鉴别, 受试 8 个鱼腥草样品(1~8), 7 个百部还魂样品(9~15)分别检测到相应的阳性特异性条带, 同时 1 个混杂样品(16)可同时扩增到 2 个阳性特异性条带, 显示所建立多重 PCR 体系, 可用于检测鱼腥草与百部还魂及其混杂品(图 4)。

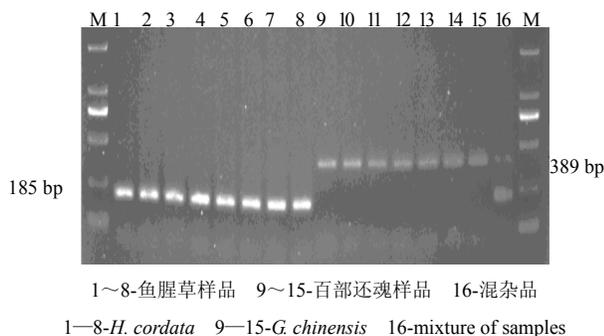


图 4 多重 PCR 鉴别鱼腥草与百部还魂凝胶电泳
Fig. 4 Amplification of *H. cordata* and *G. chinensis*

4 讨论

近年来, 基于 SNP 位点的特异 PCR 方法为解决药材的鉴别问题提供了有效的手段。位点特异性 PCR 方法已成功应用于人参、金银花、陈皮等中药材的真伪鉴别^[3-4]。经典 PCR 检测方法, 需经过制胶、凝胶、电泳与成像等多个步骤, 检测比较繁琐, 本研究建立了更加快速简便的检测体系。

已有报道^[5-6]多见利用单一特异性位点进行药材的辨别, 而这种方法不能同时对正品与混杂品进行阳性鉴定, 因此, 通过构建多重 PCR 对中药材真伪鉴别中的应用越来越受重视。本实验中, 在基于特异差异位点的基础上, 在引物的 3'端主动引入个别错配的突变, 可进一步提高引物的鉴别特异性。本研究为了同时对鱼腥草与百部还魂及其混杂品进行阳性鉴定, 设计双位点特异性引物, 构建多重 PCR 进行两种药材的快速鉴别, 可一次同时对 2 种样品进行阳性鉴定, 并可判断其是否相互混杂。该技术的前提是双个特异位点的筛选。本研究在多重 PCR 体系的优化实验中发现, 引物浓度与退火问题均较低于普通特异 PCR 的效果更佳。另外, 不同活

性的 Taq DNA 聚合酶的应用对多重 PCR 具有重要影响, 利用适合于热启动的 Taq DNA 聚合酶可以提高成功率。

本研究建立了特异 PCR 方法, 可用于鱼腥草与百部还魂植物及其药材的简便鉴别, 且建立的多重 PCR 方法通过单次 PCR 即可对 2 种样品进行阳性鉴定, 可用于判断是否相互混杂, 将为今后有关鱼腥草与百部还魂的相互鉴别提供思路。由于两者的功效和主治均不相同, 本实验也对防止药材混用误用具有实际应用价值。

参考文献

- [1] 陆海琳, 郭敏, 廖月葵, 等. 鱼腥草与其易淆品百部还魂的叶形态——脉序图谱的鉴别特征 [J]. 中草药, 2011, 35(11): 1763-1768.
- [2] Jigden B, Wang H, Kyum K M, *et al.* Authentication of the oriental medicinal plant *Ligusticum tenuissimum* (Nakai) Kitagawa (Korean Go-Bon) by multiplex PCR [J]. *Planta Med*, 2010, 76(6): 648-652.
- [3] Wang H, Kim M K, Kwon W S, *et al.* Molecular authentication of *Panax ginseng* and ginseng products using robust SNP markers in ribosomal external transcribed spacer region [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2011, 55(5): 972-976.
- [4] Wang H, Kim M K, Kim Y J, *et al.* Molecular authentication of the oriental medicines *Pericarpium citri reticulatae* and *Citri unshius pericarpium* using SNP markers [J]. *Gene*, 2012, 494(1): 92-98.
- [5] 徐旭栋, 蒋瑞彬, 蓝小明, 等. 铁皮石斛 SCoT-PCR 反应体系的优化 [J]. 中草药, 2012, 43(12): 2481-2484.
- [6] 李敏, 黄龙妹, 赵欣, 等. 浙贝母特异性 PCR 鉴定方法研究 [J]. 中草药, 2014, 45(12): 1754-1757.