

中药材品种高特异性 PCR 鉴别原理及其应用前景[△]

南京师范大学遗传资源研究所(210097) 王义权* 周开亚
中国药科大学生药学研究室 徐珞珊 徐国钧

摘 要 中药材品种高特异性 PCR 鉴别是新近报道的一种具有实用价值的中药材品种分子遗传标记鉴别方法。概述了中药材品种高特异性 PCR 鉴别的原理,归纳了鉴别引物的设计原则,展望了该方法在中药材品种鉴定中良好的应用前景。

关键词 PCR 鉴别 原理 生药鉴定

随着分子生物学技术的迅速发展,DNA 分子标记技术已越来越多地用于中药材品种鉴别的研究^[1~14]。在已有的研究报道中使用的鉴别方法可归为三类:1)基于 PCR 反应的方法,包括 RAPD、AP-PCR、微卫星 DNA 和扩增片段长度多态(Amplified Fragment Length Polymorphism,AFLP)等;2)限制性片段长度多态(Restriction Fragment Length Polymorphism,RFLP)和 PCR 产物的 RFLP 分析(PCR-RFLP);3)DNA 测序,已报道了 5S rRNA 间隔区、ITS1、ITS2、Cyt b 和 12S rRNA 等基因片段的序列分析^[2,15~19]。然而,在中药材品种鉴定的实际工作中,所有这些 DNA 分子标记鉴别方法都有一定的局限性。因此,国内外研究者们都在寻找更为实用、方便的新方法。最近我们报道了在蛇类药材的分子标记鉴别中,借助高特异性的鉴别引物,成功地鉴别了金钱白花蛇及其伪品。这一方法适用于动物类和植物类药材的 DNA 分子标记鉴别,同时具有准确、快速、简便、价廉、重现性好等优点,是一种有推广价值的分子标记鉴别方法^[20,21]。笔者就已报道过的中药材分子标记鉴别方法的不足和高特异性 PCR 鉴别方法的原理及其应用前景讨论如下:

1 几种中药材分子标记鉴定方法的局限性

AP-PCR 或 RAPD 标记都是用任意核苷酸序列的单一引物进行 PCR 扩增,比较 DNA 的多态性,从而区分不同基源的药材。由于该方法在扩增反应时使用的是低温复性(通常为 36℃),特异性不高,引物与模板间有较高的错配率,结果容易受到多种因素的影响,不同的实验室之间有时不能重复。即使在同一实验室内,每次检测样品时,均须用已知的正品药材作为对照,同时进行 AP-PCR 或 RAPD 扩增反应和电泳检测,才能比较正品药材与待检样品扩增产物电泳图谱的异同,得到较为准确的鉴定结果。此外,该方法要求 PCR 模板的 DNA 质量高、定量准,操作要求较严格^[22],检验成本相对较高。

微卫星 DNA、AFLP 和 RFLP 分析只适用于 DNA 未明显降解的新鲜材料,中药材在加工、贮运过程中,DNA 一般均已严重降解,因此这些方法也难用于商品药材的鉴别。虽然 PCR-RFLP 分析能通过 PCR 扩增出特定的 DNA 片段,再经限制性内切酶分析,以寻找多态性位点,达到鉴别的目的,克服了商品药材中 DNA 降解的困难,但 PCR 扩增的片段长度有限,通常仅能扩增出 1~1.5 kb

* Address: Wang Yiquan, Nanjing Normal University, Nanjing

王义权 男,1957 年 12 月生,博士学位,教授,从事分子遗传标记和生药鉴定研究。完成国家“八·五”攻关项目 2 子专题,国家自然科学基金 2 项。现主持国家自然科学基金 1 项,江苏省“333”人才培养基金 1 项,江苏省教委科学基金 1 项。已发表论文 40 篇,合编专著 1 部,发明专利 1 项。

[△]国家自然科学基金(No. 39570865)和中国博士后科学基金(No. 1996[2])资助项目,基金资助批准号 No. 39870913

以下的 DNA 片段,这样可找到的能用于药材品种鉴别的限制性位点数有限,因此 PCR-RFLP 的应用目前仍有困难。加之这些检测方法需要价格较为昂贵的内切酶,操作较繁琐,成本高。

用 PCR 产物进行测序的方法,能对特定的基因片段进行精确的序列分析,重现性好,鉴定结果准确可靠。不足之处是 DNA 测序成本高,目前一个约 400 bp 的 DNA 片段测序所消耗的试剂至少为 50~100 元/样,这尚不包括 DNA 提取和 PCR 扩增的费用,用自动测序仪测序则需 400 元/样。DNA 测序实验操作复杂,任何少量的 DNA 污染(如空气中的花粉、孢子和细菌,操作人员的头屑等)都会造成假阳性扩增,致使测序的片段来自 DNA 污染物,出现鉴定错误。如 PCR 产物经克隆后测序,无论是实验周期还是费用上都还将大大增加。因此 DNA 序列分析方法由于检测成本和仪器设备等要求都很高,在药材鉴定的应用中,特别是在药检部门进行常规检验的应用中目前不易实现。

2 中药材高特异性 PCR 鉴别

2.1 基本原理:常规 PCR 的目的是扩增出研究对象的某一特定基因片段。这需要在待扩增的特定基因片段的上、下游找到一个高度保守的区域,根据此区域中的 DNA 序列资料,设计一对引物,这对引物通常称为通用引物(universal primers)。用此引物就可以对研究对象的特定基因片段进行有效的扩增。在特定的基因片段得到大量扩增后,将其分离纯化,进而对该基因段进行克隆、测序等方面的研究。

中药材高特异性 PCR 鉴别则是根据正品及其伪、混品药材生物特定区域的 DNA 序列数据,设计有高度特异性的某种正品药材的鉴别引物。与通用引物不同的是,这对引物在 PCR 扩增时只能对来自正品药材的 DNA 模板中特定的区域进行有效的扩增,而对来自伪、混品或其他生物的 DNA 模板中的该区域不能进行扩增。当有样品待鉴定时,

从待鉴定样品中提取少量 DNA,以此为模板,用高特异性的鉴别引物在适当的条件下进行 PCR 扩增,然后电泳检测扩增结果,如为阳性,则为正品药材,否则即非正品药材,这样便可准确地判断被检物的真伪。高特异性鉴别引物设计所依据的 DNA 序列资料,一方面可以通过对相关物种的 DNA 进行测序研究得到,另一方面有些物种的 DNA 序列资料可以通过计算机网络,从 GenBank 或 EMBL 等 DNA 数据库中直接查得。

2.2 引物设计:高特异性 PCR 鉴别引物的设计,除遵循一般引物设计原则外,还须考虑到以下原则:1)要在被鉴别的物种种内变异很小,但与伪、混品间差异较大的 DNA 分子区域寻找标记。如我们在金钱白花蛇的 PCR 鉴别研究中的 Cyt b 基因片段^[21]。2)设计的鉴别引物与正品物种在上述 DNA 分子区域内有合适的引物结合位点,与模板 DNA 在此位点上的碱基配对比例极高,并确保引物 3'端与模板完全配对;而引物与伪、混品间在此 DNA 分子区域内无合适的结合位点,即引物的碱基与伪、混品的 DNA 碱基间能够配对的比例尽量低,特别是引物的 3'端与伪、混品模板间的碱基不能配对。3)由于药材中的 DNA 多已发生不同程度的降解。因此设计的引物在上述分子区域内扩增的片段不易过大,在便于检测的前提下以小一些为好,一般为 100~300 bp,以保证阳性样品的有效扩增。4)设计的引物 T_m 值以高一些为好,即引物应有足够长度的同时尽量提高 GC 含量。并且两引物 T_m 值要匹配,以便达到高严谨条件下扩增的目的。 T_m 值的计算方法为:

$$T_m = (G+C) \times 4 + (A+T) \times 2,$$

其中 G,C,A,T 分别为引物中 G,C,A,T 的数目。

5)3'端最好选择 A,而尽量避免用 T。在同样条件下,当 3'端错配时,末位碱基是 T 时引发效率最高,而末位碱基是 A 时引发效率最低^[23],这样可以降低假阳性的出现概率,提高鉴别的准确性。

新设计的鉴别引物是否有效,要通过鉴别试验来检验。当用鉴别引物对正品和伪、混样品的 DNA 进行高特异性 PCR 鉴别时,如仅能扩增出正品药材的特定 DNA 片段,而伪、混品种无相应的扩增片段,则该鉴别引物可用于该正品药材的高特异性 PCR 鉴别;如两者都扩增出特定 DNA 片段或都没有扩增出 DNA 片段,则该鉴别引物尚不能对这种药材进行高特异性 PCR 鉴别,需修改引物的设计,直至鉴别引物只能特异性地扩增出正品药材的特定 DNA 片段为止。

2.3 反应的条件和结果检测:高特异性 PCR 鉴别反应条件与普通 PCR 基本一样,但在 PCR 循环中复性温度较高,一般在 60℃ 左右。在这样的 PCR 扩增条件下,如果引物设计合理,假阳性出现概率可以降至 0,而不影响正品药材的 PCR 扩增。PCR 产物用 0.8%~1.2% 的琼脂糖凝胶电泳,紫外灯下观察有无特定 DNA 片段的扩增,如有则为正品,否则为其他品种。可见只要有了鉴别引物,样品检验将非常简单^[20]。

3 前景展望

分子遗传标记用于中药材品种鉴别首先遇到的是实用性问题。分子生物学研究中的各种试剂和其他消耗品一般都较昂贵,因此,鉴别试验的步骤越多,过程越复杂,其鉴别成本就越高。其次,是鉴别实验的操作是否易于掌握,鉴别结果的准确性如何。

在一定研究积累的基础上,设计出某种药材品种的鉴别引物后,当有样品待检时,只需经 DNA 提取、高特异性 PCR 扩增和电泳观察三步即可完成鉴别。用鉴别引物开发出药材品种鉴定用的检测试剂盒后,一个熟练的检验人员 3~5 h 便可检验数十个样品,而全部成本按现行各种试剂和消耗品的平均价计算,也不会超过 5 元/样。可见中药材的高特异性 PCR 鉴别有很高的实际应用价值。

由于步骤简化,操作简单,有一定专业基础的人,无需任何训练即可掌握。从我们对金

钱白花蛇及其伪品的 PCR 鉴别试验结果看,对正品与伪品的鉴别正确率达到 100%^[21],重现性很好,表明鉴别结果准确可靠。此外,还能在混合粉末中检测出有无正品金钱白花蛇成分的存在。这一方面表明该方法能抗生物源的污染,对实验环境条件的要求较简单,不会因为少量的 DNA 污染而对鉴定结果的正确性产生影响。另一方面也提示,该方法有可能成为中药复方制剂中用组分的检测手段之一。

与其它 DNA 分子标记鉴别方法一样,由于生物体内的遗传信息不随生物发育的不同阶段而变化,同一个体的成、幼体阶段和同一个体的不同器官具有同样的遗传信息,因此高特异性 PCR 鉴别不能区别出个体的发育阶段(即成、幼体)和同种的器官组织的差异。此外,这种方法虽能在混合组分中检测出是否有正品药材成分的存在,但尚不能确定混合成分中被检测组分的含量。

参考文献

- 1 王义权,等. 中国中药杂志,1997,22(10):583
- 2 Shaw P C, *et al.* J Food and Drug Anal, 1997, 5(4):273
- 3 王义权,等. 药学报, 1997, 32(5):384
- 4 吴 弢,等. 中草药, 1998, 29(1):37
- 5 张 荣,等. 中草药, 1996, 27(11):686
- 6 张 荣,等. 中国中药杂志, 1997, 22(2):72
- 7 曹 晖,等. 中药材, 1996, 19(12):608
- 8 曹 晖,等. 中国中药杂志, 1997, 22(4):197
- 9 Cao H, *et al.* 药学报, 1996, 31(7):543
- 10 Cheung K S, *et al.* J Ethnopharmacol, 1994, 42:67
- 11 Nakai R, *et al.* Biol Pharm Bull, 1996, 19(1):67
- 12 Shaw P C, *et al.* Planta Med, 1995, 61:466
- 13 Yamazaki M, *et al.* Biol Pharm Bull, 1994, 17(11):1529
- 14 Kohjiyuma M, *et al.* Biol Pharm Bull, 1997, 20(5):502
- 15 王建云,等. 中国药科大学学报, 1996, 27(8):471
- 16 王建云,等. 中国中药杂志, 1997, 22(10):579
- 17 吴 平,等. 药学报, 1998, 33(3):226
- 18 吴 平,等. 药学报, 1998, 33(4):304
- 19 Mizukami H. Biol Pharm Bull, 1995, 18(9):1299
- 20 王义权,等. 南京大学学报(自然科学版), 1997, 33(博士专稿):136
- 21 王义权,等. 药学报, 1998, 33(12):941
- 22 Muralidharan K, *et al.* Bio Techniques, 1993, 14(3):362
- 23 Kwok S, *et al.* Nucl Acids Res, 1990, 18(4):999

(1998-08-14 收稿)