

## 环介导等温扩增法鉴定检测冬虫夏草

李奎<sup>1</sup>, 李琦<sup>1</sup>, 袁媛<sup>2</sup>, 陈江源<sup>1</sup>, 黄璐琦<sup>2</sup>, 刘志国<sup>1\*</sup>

1. 武汉工业学院生物与制药工程学院, 湖北 武汉 430023
2. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700

**摘要:** **目的** 建立冬虫夏草的环介导等温扩增 (loop-mediated isothermal amplification, LAMP) 方法, 实现对冬虫夏草的快速检测。**方法** 针对冬虫夏草的 *CS2 serine protease (csp2)* 基因设计 LAMP 内外引物对; 利用 CTAB 法提取冬虫夏草 DNA; 优化扩增反应条件; 采用包括冬虫夏草在内的 6 种不同虫草进行 LAMP 扩增, 并对阳性产物酶切鉴定以检测其特异性, 通过对模板 DNA 的 10 倍梯度稀释检测其灵敏度; 紫外灯下观察凝胶电泳或加入荧光染料 SYBR Green I 的扩增产物。**结果** 设计的 LAMP 引物可以特异地针对冬虫夏草的 *csp2* 基因进行 LAMP 扩增, 产物可被限制性内切酶 *Taq1* 酶切, 且有较高的灵敏度, 检出限达 6 pg/mL。**结论** LAMP 法可以实现对冬虫夏草的快速鉴定检测, 在中药鉴定中有着广阔的应用前景。

**关键词:** 冬虫夏草; 环介导等温扩增; 鉴定; 检测; 检出限

中图分类号: R282.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)08-1605-04

## Identification and detection of *Cordyceps sinensis* with LAMP

LI Kui<sup>1</sup>, LI Qi<sup>1</sup>, YUAN Yuan<sup>2</sup>, CHEN Jiang-yuan<sup>1</sup>, HUANG Lu-qi<sup>2</sup>, LIU Zhi-guo<sup>1</sup>

1. School of Biology and Pharmaceutical Engineering, Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430023, China
2. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100700, China

**Abstract: Objective** The method of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) was employed to detect and identify *Cordyceps sinensis* rapidly. **Methods** Specific LAMP primers were designed according to the *CS2 serine protease (csp2)* gene of *Cordyceps sinensis*. *C. sinensis* DNA was extracted using CTAB method. The reaction conditions of LAMP were optimized. Specificity of LAMP reaction was validated by six different strains and using restriction enzyme *Taq1* digested the LAMP products. Sensitivity of LAMP was tested with diluted *C. sinensis* solution with 10-fold gradient. LAMP products were shown by gel electrophoresis or adding SYBR Green I. **Results** The method of LAMP for detecting *C. sinensis* was effective and specific. The detection limit of LAMP assay was up to 6 pg/mL. **Conclusion** LAMP protocol is a promising method for the identification and detection of *C. sinensis* and Chinese materia medica as well.

**Key words:** *Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc.; loop-mediated isothermal amplification (LAMP); identification; detection; detection limit

冬虫夏草是我国名贵中药材, 因其经济价值高, 常有伪冒品扰乱市场, 因此冬虫夏草的快速鉴定检测具有重要意义。目前, 冬虫夏草检测方法包括分离培养、子囊孢子微循环产孢、子实体人工诱发、菌丝蛋白酶谱检测、PCR-限制性片段长度多态性 (PCR-RFLP) 分析、随机扩增多态性 DNA (RAPD) 分析等<sup>[1-3]</sup>。这些方法由于周期长, 特异性及灵敏度不够, 操作繁杂, 检测成本高等原因而不适于推广应用。环介导等温扩增<sup>[4]</sup>

(loop-mediated isothermal amplification, LAMP) 是一种快速的核酸扩增技术, 利用特异引物及链置换 DNA 聚合酶在恒温条件下自循环几十分钟, 就可完成核酸扩增反应。该方法具有高特异性、高灵敏度、简便、快速、低成本等特点, 已在诸多领域应用。本研究拟采用 LAMP 方法, 实现冬虫夏草的快速检测与鉴定。

### 1 材料

冬虫夏草 *Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc. 子实

收稿日期: 2011-03-29

基金项目: 湖北省楚天学者计划项目; 武汉市科技局对外科技合作与交流计划项目 (201070934341)

作者简介: 李奎 (1986—), 男, 湖北宜昌人, 硕士研究生, 研究方向为中药材鉴定。Tel: 13277078375 E-mail: lk87282240@163.com

\*通讯作者 刘志国 Tel: (027) 83956899 E-mail: zhiguo\_l@126.com

体、虫体由北京同仁堂提供, 亚香棒虫草 *Cordyceps hawkesii* Gray、分枝虫草 *Cordyceps ramosa* Teng、新疆虫草 *Cordyceps gracilis* (Grev.) Dur. et Mont.、蛹虫草 *Cordyceps militaris* (L.) Link 购自青海玉树尼达大药房。

*Bst* DNA 聚合酶购自纽英伦生物技术有限公司; LAMP 引物由上海生工生物工程有限公司合成; SYBR Green I、dNTPs、DNA Marker DL2000、DL1000 购自上海捷瑞公司。

电热恒温水浴箱 (武汉市琴台医疗器械厂); 超净工作台 (YJ-1450) (江苏苏州净化设备公司); 聚合酶链式反应仪 Biometre UNO II; 核酸电泳仪

(北京六一厂); UV-2000 GIS 紫外分析仪 (日本 HITACHI)。

## 2 方法

### 2.1 DNA 提取

按文献采用 CTAB 法<sup>[5]</sup>提取冬虫夏草 DNA, 测定 DNA 量, 作扩增模板用。

### 2.2 LAMP 反应

通过 Genebank Blast 比对, 选择冬虫夏草特异性基因 *CS2 serine protease (csp2)* 上的保守序列作为模板靶序列, 利用 PrimerExplorer V4 软件设计 LAMP 内外引物对 (表 1)。

25  $\mu$ L LAMP 反应体系含 1.6  $\mu$ mol/L FIP、1.6

表 1 冬虫夏草 *csp2* 基因的 LAMP 引物  
Table 1 LAMP primers for *csp2* gene of *C. sinensis*

名称	序列
F <sub>3</sub>	GGAGTAGTTGCACCACCAC
B <sub>3</sub>	TAGCGAGGTATGTGGCGG
FIP	TCGCATCGCAAGCCTTCGTC-CTCGCTCGAGAAGGTCAAG
BIP	AGAAGTTGCGAAACTCGAGCCG-AGTGCCAGTTGAGTGAATG

$\mu$ mol/L BIP、0.2  $\mu$ mol/L F<sub>3</sub>、0.2  $\mu$ mol/L B<sub>3</sub>、20 mmol/L Tris-HCl (pH 8.8)、10 mmol/L KCl、2 mmol/L MgSO<sub>4</sub>、10 mmol/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、0.1% Triton X-100、1.4 mmol/L dNTPs、8 U *Bst* DNA 聚合酶、1.0~4.0  $\mu$ L 模板 DNA。在 EP 管中先加入除 *Bst* DNA 聚合酶以外的所有反应物, 在 95  $^{\circ}$ C 水浴 5 min, 然后迅速放在冰上冷却, 冷却后加入 *Bst* DNA 聚合酶, 63  $^{\circ}$ C 反应 60 min, 80  $^{\circ}$ C 孵育 10 min 终止酶活性即完成 LAMP 反应。扩增产物在含 0.5  $\mu$ g/mL 溴化乙锭 (EB) 的 1.5% 琼脂糖凝胶上电泳, 紫外观察结果; 由于荧光染料 SYBR Green I 分子可嵌入核苷酸链中, 可产生绿色荧光, 因而加入 0.5  $\mu$ L SYBR-Green I 于紫外光下观察扩增产物。

### 2.3 LAMP 反应条件的确定

分别设定反应温度为 60、63、65  $^{\circ}$ C, 反应时间为 40、60、80 min 等不同条件下进行 LAMP 扩增, 根据扩增结果确定最佳反应温度和反应时间。

### 2.4 LAMP 特异性检测

分别对包括冬虫夏草在内的 6 种不同虫草扩增, 由于 LAMP 阳性扩增产物是由若干茎环结构和类似花椰菜结构的 DNA 组成的混合物, 电泳后凝胶上会呈现出梯状条带。利用靶序列中含有的 *Taq1* 限制性酶切位点, 对电泳呈阳性的 LAMP 产物与

*Taq1* 混合, 37  $^{\circ}$ C 酶切过夜, 电泳, 进一步检测冬虫夏草 LAMP 扩增的特异性。

### 2.5 LAMP 灵敏度检测

利用  $A_{260}$  值, 测定冬虫夏草 DNA 模板浓度, 用三蒸水对模板进行 10 倍梯度稀释, 最低稀释至 10<sup>9</sup> 倍, 对每一质量浓度梯度 DNA 模板进行 LAMP 扩增, 扩增产物电泳分析, 确定检测限。

以 LAMP 外引物 F<sub>3</sub> 和 B<sub>3</sub> 对冬虫夏草各稀释模板进行 PCR, 条件为 94  $^{\circ}$ C 变性 45 s; 53  $^{\circ}$ C 退火 45 s; 72  $^{\circ}$ C 延伸 45 s, 35 个循环。扩增产物进行电泳分析, 确定检出限。

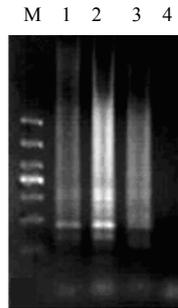
## 3 结果

### 3.1 LAMP 反应条件的确定

结果显示 LAMP 反应最佳反应温度为 63  $^{\circ}$ C (图 1), 最佳反应时间为 60 min (图 2), 阳性结果电泳呈典型梯状条带。

### 3.2 LAMP 的特异性

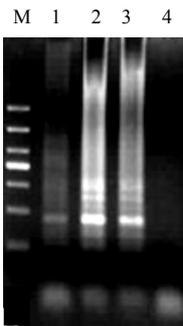
对 6 种虫草 DNA 模板分别进行 LAMP 扩增, 结果除冬虫夏草扩增产物呈阳性梯状条带外, 其他均为阴性 (图 3), 表明针对冬虫夏草的 LAMP 引物具有高特异性。对冬虫夏草 LAMP 扩增阳性产物经 *Taq1* 酶切过夜, 梯状条带消失 (图 4), 表明 LAMP 产物为特异性扩增。



M-DNA Marker (DL1 000) 1-60 °C 2-63 °C 3-65 °C 4-空白对照  
M-DNA Marker (DL1000) 1-60 °C 2-63 °C 3-65 °C  
4-blank control

图 1 LAMP 反应温度的确定

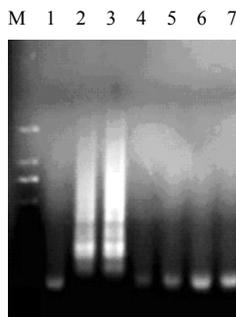
Fig. 1 Optimal reaction temperature of LAMP



M-DNA Marker (DL1 000) 1~3-分别是在 63 °C 时扩增 40、60、80 min 后电泳结果 4-空白对照  
M-DNA Marker (DL1 000) 1-3-LAMP amplicons for 40, 60, and 80 min, respectively 4-blank control

图 2 LAMP 反应时间的确定

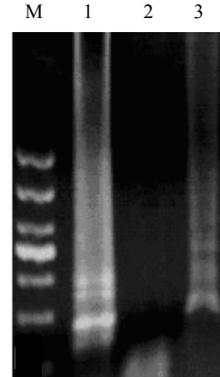
Fig. 2 Optimal reaction time conditions of LAMP



M-DNA Marker (DL2000) 1-空白对照 2-冬虫夏草子实体  
3-冬虫夏草虫体 4-亚香棒虫草 5-分枝虫草  
6-新疆虫草 7-蛹虫草  
M-DNA Marker (DL2000) 1-blank control 2-*C. sinensis*  
fruiting bodies 3-*C. sinensis* larvae 4-*C. hawkesii*  
5-*C. ramose* 6-*C. grsacilis* 7-*C. militaris*

图 3 不同虫草的 LAMP 扩增

Fig. 3 Specificity of LAMP for different species in *C. sinensis*



M-DNA Marker (DL1000) 1-LAMP 阳性产物 2-LAMP 阳性产物经 *TaqI* 酶切 3-LAMP 阳性产物经 *EcoRI* 酶切  
M-DNA Marker (DL1000) 1-LAMP products of *C. sinensis csp2*  
2-*C. sinensis csp2* LAMP products carried out digestion with *TaqI*  
3-*C. sinensis csp2* LAMP products carried out digestion with *EcoRI*

图 4 冬虫夏草 LAMP 阳性扩增产物的酶切

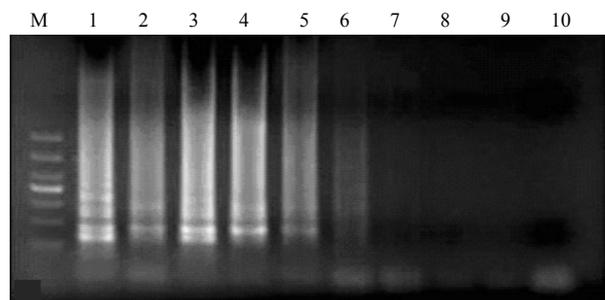
Fig. 4 Restriction analysis of *C. sinensis csp2* LAMP positive products

### 3.3 LAMP 的灵敏度

通过测定  $A_{260}$  数值, 计算得到 0.1 g 冬虫夏草所提的 DNA 的量为 600  $\mu\text{g/mL}$ , 模板梯度稀释后, 各取 1  $\mu\text{L}$  进行 LAMP 扩增, 结果见图 5。当模板 DNA 样品稀释至  $10^{-5}$  倍时, 依然可检出, 检出限为 6  $\text{pg/mL}$ 。以  $F_3$  和  $B_3$  引物对冬虫夏草进行 PCR, 得到预期片段 (图 6), 而检出限为 6  $\text{ng/mL}$ 。可见, LAMP 扩增比普通 PCR 扩增灵敏度约 1 000 倍。

### 3.4 LAMP 产物的荧光染色

LAMP 扩增产物中加入 SYBR Green I 后在紫外灯下观察, 空白管无荧光反应, 阳性结果管呈明

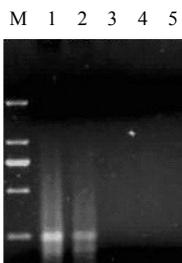


M-DNA Marker (DL1000) 1~9-分别是模板稀释至  $10^{-1}$ ~ $10^{-9}$  倍后的 LAMP 扩增 10-空白对照

M-DNA marker (DL1000) 1-9-LAMP reaction carried out with *C. sinensis* DNA template diluted by  $10^{-1}$ ~ $10^{-9}$ -fold 10-blank control

图 5 冬虫夏草 DNA 梯度稀释后的 LAMP 扩增

Fig. 5 LAMP products with serial dilution of *C. sinensis* DNA template



M-DNA Marker (DL2000) 1—4分别为模板稀释至 $10^{-1}$ ~ $10^{-4}$ 倍后的PCR 5-空白对照

M-DNA Marker (DL2000) 1—4-PCR-reaction carried out with *C. sinensis* DNA template diluted by  $10^{-1}$ — $10^{-4}$ -fold 5- blank control

图 6 冬虫夏草 DNA 10 倍系列稀释后的 PCR 扩增

Fig. 6 PCR products with 10-fold serial dilution of *C. sinensis* DNA template

显的绿色荧光反应。SYBR Green I 可用于 LAMP 结果的快速检测。

#### 4 讨论

冬虫夏草是十分珍贵的中药材,在实物检测中,LAMP 法只需要约为 0.05 g 子实体样品就可对样品做出检测和鉴定,耗材极少;且 LAMP 法操作简便,只需恒温水浴锅等简单设备即可完成反应。目前核酸探针、Real time PCR、RAPD、RFLP 等分子生物学检测手段,虽然有较高灵敏度,但是操作较 LAMP 复杂,都需要特殊的仪器<sup>[6-10]</sup>。本实验通过特异靶序列的 LAMP 引物实现冬虫夏草特异性扩增,对其他虫草无交叉反应,模板 DNA 检出限达 6 pg/mL,比普通 PCR 灵敏度高约 1 000 倍。整个反应在数十分钟即可完成,而且 LAMP 扩增产物检测方便多样,可肉眼观察沉淀物,或电泳检测,或加入荧光染料紫外观察颜色变化。可见冬虫夏草的 LAMP 检测快速、便捷,适于基层推广应用。

自从 LAMP 技术被发明之后,凭借其高灵敏度、简便、快速的特性,迅速在食品安全检测、疫病检测、性别鉴定等多个方面得到了广泛应用<sup>[11-12]</sup>。此外,通过 LAMP 法与其他技术联合,开发出多种检测方法,例如环介导逆转录等温扩增技术(RT-LAMP)<sup>[13]</sup>、原位 LAMP (*in-situ* LAMP)<sup>[14]</sup>等,使 LAMP 技术不断深化,应用领域更广阔。

#### 参考文献

- [1] 于洪飞. 冬虫夏草无性型鉴定的几种方法 [J]. 安徽农业科学, 2006, 34(12): 2763-2787.
- [2] 邵鹏柱, 曹 晖, 王 骏, 等. 中药分子鉴定 [M]. 上海: 复旦大学出版社, 2004.
- [3] Feng K, Wang S, Hu D J, *et al.* Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis and the nucleosides assessment of fungal strains isolated from natural *Cordyceps sinensis*. [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2009, 50(3): 522-526.
- [4] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, *et al.* Loop-mediated isothermal amplification of DNA [J]. *Nucl Acids Res*, 2000, 28(12): e63.
- [5] 段中岗, 黄琼林. 适合中药材 DNA 条形码分析的 DNA 提取方法的研究 [J]. 中药新药与临床药理, 2009, 20(5): 480-484.
- [6] 于 超, 何俊琳, 曾 玮, 等. 康定冬虫夏草与人工虫草的 RAPD 指纹图谱比较研究 [J]. 中草药, 2005, 36(2): 274-277.
- [7] 翁榕安, 李树华. 冬虫夏草与其混伪品北虫草的 ITS 测序鉴别 [J]. 湖南师范大学学报, 2008, 5(3): 42-45.
- [8] 曹 亮, 李顺祥, 魏宝阳, 等. 吴茱萸 RAPD 体系构建及道地性遗传背景研究 [J]. 中草药, 2010, 41(6): 975-978.
- [9] 周 娟, 罗 育, 吴耀生, 等. 绞股蓝 RAPD 标记及序列分析 [J]. 中草药, 2010, 41(10): 1692-1696.
- [10] 张阵阵, 郭美丽, 张军东, 等. 红花 RAPD 和 AFLP 分子标记技术多态性效率比较 [J]. 中草药, 2007, 38(3): 449-451.
- [11] 曾冰冰, 肖凯军, 石 磊, 等. LAMP 方法在食品微生物检测中的应用 [J]. 现代食品与药品杂志, 2007, 17(1): 22-25.
- [12] 李志强. LAMP 技术在微生物检测中的应用 [J]. 生命科学仪器, 2009, 7: 7-10.
- [13] 李启明, 马学军, 周 蕊. 环介导逆转录等温扩增技术 (RT-LAMP) 在丙型肝炎病毒基因检测中的应用 [J]. 病毒学报, 2006, 22(5): 334-338.
- [14] Maruyama F, Kenzaka T, Yamaguchi N, *et al.* Detection of bacteria carrying the *stx2* gene by *in situ* loop-mediated isothermal amplification [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2003, 69(8): 5023-5028.