生物检定

# 多重 PCR 方法同时鉴别人参、西洋参、三七 *

刘丽 [1,2], 肖炳燚 [2], 罗晖明 [2], 聂平 [2], 李文莉 [1,2**], 丁野 [2], 孙辉 [2], 李玲 [1,2]

（1. 中南大学药学院, 长沙 410013 ;2. 湖南省食品药品检验研究院, 长沙 410001）

摘要　目的 :建立一种能同时鉴别人参属人参、西洋参、三七 3 种药材的多重聚合酶链反应（PCR）方法。方法 :通过分析人参、西洋参、三七 psbA-trnH 基因序列的差异设计了特异性引物对 1, 利用随机扩增多态性 DNA（RAPD）分子标记技术筛选获得的特异性片段的基因序列, 设计了特异性引物对 2 ;优化了多重 PCR 鉴别体系并验证其耐受性和实用性。结果 :构建的多重 PCR 鉴别体系能够成功地鉴别人参、西洋参、三七, 人参样本可扩增出片段大小约为 150 bp 的特异性条带, 西洋参样本可扩增片段大小出约为 150 bp 和 400 bp 2 条特异性片段, 三七样本可扩增出片段大小约为 400 bp 的特异性条带。结论 :本多重 PCR 鉴别体系特异性好, 可准确、可靠地鉴别人参、西洋参、三七。

关键词 :中药材分子鉴别 ;psbA-trnH 基因序列分析 ;DNA 分子标记技术 ;多重聚合酶链反应 ;多重 PCR 方法 ;人参 ;西洋参 ;三七

中图分类号 :R 917　　文献标识码 :A　　文章编号 :0254-1793（2016）04-0668-10

doi :10.16155/j. 0254-1793.2016.04.17

# Identification of Panax ginseng, Panax quinquefolium and Panax notoginseng by multiplex PCR assay*

LIU Li[1,2], XIAO Bing-yi[2], LUO Hui-ming[2], NIE Ping[2], LI Wen-li[1,2**], DING Ye[2], SUN Hui[2], LI Ling[1,2]

（1. School of Pharmaceutical Sciences, Central South University, Changsha 410013, China ;
2. Hunan Institute for Food and Drug Control, Changsha 410001, China）

Abstract　Objective :To establish a multiplex polymerase chain reaction（PCR）method for identification of Panax ginseng C. A. Mey. , Panax quinquefolium L. and Panax notoginseng F. H. Chen. Methods :The specific primers pair 1 was designed bases on comparison of the difference of the psbA-trnH gene sequences from P. ginseng, P. quinquefolium and P. notoginseng. The pair of specific primers 2 was selected by Random amplified polymorphic DNA（RAPD）molecular marker technology. The multiplex PCR identification system were optimized, and the method's tolerance and suitability was verified. Results :Multiplex PCR identification

*　国家科技重大专项课题, 中药质量安全检测和风险控制技术平台 ( 编号 :2014ZX09304307-002) ;湖南省科技厅重点项目 ( 编号 :2014SK2001) ;湖南省食品药品监督管理局食品药品安全科技重点项目 ( 编号 :湘食药科 R201502)

**　通信作者　Tel :(0731) 82275866 ;E-mail :1838675867@qq.com
第一作者　Tel :18890393007 ;E-mail :416223012@qq.com



(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

system for P. ginseng, P. quinquefolium and P. notoginseng was constructed ;the of 150 bp specific bands were amplified from the P. ginseng ;the sizes of 150 bp and 400 bp specific bands were amplified from P. quinquefolium ;and the sizes of 400 bp specific bands were amplified from P. notoginseng. Conclusion :The established multiplex PCR method can be used to identify P. ginseng C. A. Mey. , P. quinquefolium L. and P. notoginseng F. H. Chen.

Keywords :Chinese herbal medicine molecular identification ;psbA-trnH gene sequences analysis ;DNA molecular marker technology ;multiple polymerase chain reaction ;multiplex PCR method ;Panax ginseng C. A. Mey. ;

五加科人参属 Panax 主要药用植物为人参 Panax ginseng C. A. Mey.、西洋参 Panax quinquefolium L. 和三七 Panax notoginseng F. H. Chen。人参主要产于我国东北三省和朝鲜 ;西洋参原产加拿大蒙特利尔、加拿大安大略省和美国康斯威星州, 我国市场上的西洋参主要有 2 种, 一种是进口, 一种是引进种植。我国从 20 世纪 70 年代开始引进种植, 随着长期引进栽培种植及生产实践的筛选, 形成中国西洋参的三大主产种植区 :东北、北京和山东 ;三七主产于云南、广西 [1-2]。三者由于来源于同科同属不同种植物的相同部位, 因而其内部组织构造、所含化学成分均有很大相似之处, 给实际工作中的鉴定增加了难度, 对于鉴别单味及成方制剂, 难度就更大。三者都是我国常用的贵重药材, 但其价格差异很大 ;所以, 市场上经常出现用其他形态相似的根类药材以假混真或存在相互混用的情况, 如人参充作西洋参 ;但人参和西洋参药性和功效差异较大, 人参具补气、固脱、生津、益智、安神的功效 ;西洋参具有补气养阴、益胃生津、清热除烦之功效 ;但二者的形态、性状十分相似, 特别是国内栽培西洋参和栽培人参很难根据传统的形态学特征进行准确鉴别, 两者的饮片更是难以区别 [3-6]。而传统的分析鉴别方法, 是根据形态和组织结构特征和化学成分来鉴别, 而这些传统的鉴别方法干扰因素较多, 易受环境和植物本身的影响和限制 [7-8] ;詹鑫婕等 [9] 采用聚合酶链式反应 - 单链构象多态 (polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism, PCR-SSCP) 方法鉴别人参和西洋参, 但其电泳检测过程耗时长, 需电泳 12 h 以上谱带差异才显著, 不利于推广 ;曹晖等 [10] 采用 DNA 测序技术以鉴别三七及其伪品 ;田程等 [11] 采用电子鼻检测方法识别人参与西洋参饮片。本研究通过多重 PCR 鉴别人参、西洋参和三七, 只通过 1 次 PCR 扩增、电泳跑胶即可准确地对三者进行鉴别, 通过优化反应体系, 建立最佳多重 PCR 扩增反应条件, 并对此方法进行耐受性和适用性实验的考察和验证。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

本实验所用样本为野外采集或购自药材市场, 收集后放置硅胶中常温干燥保存备用。样品共计 89 批 :人参 33 批 (编号 R1~R33) ;西洋参 15 批 (编号 X1~X15) ;三七 13 批 (编号 S1~S13) ;其他中药材 28 批 (编号 Z1~Z28)。均经湖南省食品药品检验研究院中药室主任丁野鉴定, 保存于湖南省食品药品检验研究院, 样品信息详见表 1~4。

### 1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取 用 70% 乙醇水溶液对样本表面擦试消毒, 洁净通风处挥干, 使用高通量组织研磨仪研成粉末, 称取样本粉末 30 mg 置于离心管中, 采用新型广谱植物基因组 DNA 快速提取试剂盒 (YuanPingHao Bio) 提取各药材总 DNA, -20 ℃保存。采用琼脂糖凝胶电泳和微量紫外 - 分光光度仪 (Thermo Nanodrop 2000) 检测 DNA 质量。

1.2.2 引物设计 通过 Genbank 下载分析人参、西洋参、三七的 psbA-trnH 基因序列 (登录号 :HQ112864 ;HQ112888 ;HQ112884) 的差异采用引物设计软件 Oligo 6 设计特异性引物对 1 ;通过随机扩增多态性 DNA (random amplified polymorphic DNA, RAPD) 标记筛选人参属特异性片段, 对特异片段进行切胶回收、TA 克隆和测序, 获得特异性片段的基因序列, 根据基因序列的差异设计特异性引物对 2 (专利受理号 :201510546491.4)。引物序列见表 5。

1.2.3 PCR 质量控制 PCR 鉴别极易出现假阳性和假阴性结果, 为了防止污染和误差的产生, 本实验建立了严格的阳性对照和空白对照, 实验阳性对照为购自中国食品药品检定研究院的人参 (编号为 R1)、西洋参 (编号为 X1)、三七 (编号为 S1) 对照药材, 空白对照为灭菌双蒸水。同时, 为了确保特异性 PCR 的扩增率, 采用通用引物 ITS2 对所有用于 PCR 鉴别的样本 DNA 进行扩增, 以验证模板 DNA 的可靠性, 确保本实验的模板 DNA 质量均符合要求。



(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表 1　人参样本信息

Tab. 1　Sample information of Panax ginseng

| 编号 (No.) | 品种名 (species name) | 产地及来源 (location) |
|---|---|---|
| R1 | 人参 (P.ginseng) [对照药材] (reference medicinal materials) | 中国食品药品检定研究院 (National Institutes for Food and Drug Control) |
| R2 | 人参 (ginseng) | 辽宁本溪 (Benxi, Liaoning) |
| R3 | 林下参 (under-forest ginseng) | 辽宁本溪 (Benxi, Liaoning) |
| R4 | 林下参 (under-forest ginseng) | 辽宁本溪 (Benxi, Liaoning) |
| R5 | 园参 (planted ginseng) | 吉林白山 (Baishan, Jilin) |
| R6 | 人参 (ginseng) | 辽宁本溪 (Benxi, Liaoning) |
| R7 | 人参 (ginseng) | 辽宁本溪 (Benxi, Liaoning) |
| R8 | 人参 (ginseng) | 辽宁本溪 (Benxi, Liaoning) |
| R9 | 林下参 (under-forest ginseng) | 辽宁抚顺 (Fushun, Liaoning) |
| R10 | 林下参 (under-forest ginseng) | 吉林集安 (Ji 'an, Jilin) |
| R11 | 园参 (planted ginseng) | 吉林集安 (Ji 'an, Jilin) |
| R12 | 园参 (planted ginseng) | 吉林集安 (Ji 'an, Jilin) |
| R13 | 林下参 (under-forest ginseng) | 吉林集安 (Ji 'an, Jilin) |
| R14 | 人参 (ginseng) | 辽宁本溪 (Benxi, Liaoning) |
| R15 | 园参 (planted ginseng) | 吉林集安 (Ji 'an, Jilin) |
| R16 | 园参 (planted ginseng) | 吉林集安 (Ji 'an, Jilin) |
| R17 | 园参 (planted ginseng) | 吉林白山 (Baishan, Jilin) |
| R18 | 林下参 (under-forest ginseng) | 吉林白山 (Baishan, Jilin) |
| R19 | 林下参 (under-forest ginseng) | 吉林白山 (Baishan, Jilin) |
| R20 | 园参 (planted ginseng) | 吉林抚松 (Fusong, Jilin) |
| R21 | 园参 (planted ginseng) | 吉林抚松 (Fusong, Jilin) |
| R22 | 园参 (planted ginseng) | 黑龙江小兴安岭 (Xiaoxing 'anling, Helongjiang) |
| R23 | 园参 (planted ginseng) | 吉林延吉 (Yanji, Jilin) |
| R24 | 园参 (planted ginseng) | 吉林汪清 (Wangqing, Jilin) |
| R25 | 园参 (planted ginseng) | 吉林通化 (Tonghua, Jilin) |
| R26 | 人参 (ginseng) | 吉林抚松 (Fusong, Jilin) |
| R27 | 参须 (ginseng) | 吉林 (Jilin) |
| R28 | 参须 (ginseng) | 辽宁 (Liaoning) |
| R29 | 参须 (ginseng) | 吉林 (Jilin) |
| R30 | 园参 (planted ginseng) | 辽宁 (Liaoning) |
| R31 | 园参 (planted ginseng) | 辽宁 (Liaoning) |
| R32 | 白参 (white ginseng) | 吉林 (Jilin) |
| R33 | 白参 (white ginseng) | 辽宁 (Liaoning) |



(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

表 2 西洋参样本信息

Tab. 2 Sample information of Panax quinquefolium

| 编号 (No.) | 品种名 (species name) | 产地及来源 (location) |
|---|---|---|
| X1 | 西洋参 (P.quinquefolium)[对照药材 (reference medicinal materials)] | 中国食品药品检定研究院 (National Institutes for Food and Drug Control) |
| X2 | 西洋参 (Panax quinquefolium) | 北京怀柔 (Huairou, Beijing) |
| X3 | 西洋参 (Panax quinquefolium) | 山东文登 (Wendeng, Shandong) |
| X4 | 西洋参 (Panax quinquefolium) | 山东文登 (Wendeng, Shandong) |
| X5 | 西洋参 (Panax quinquefolium) | 山东文登 (Wendeng, Shandong) |
| X6 | 西洋参 (Panax quinquefolium) | 山东文登 (Wendeng, Shandong) |
| X7 | 西洋参 (Panax quinquefolium) | 吉林长白山 (Changbaishan, Jilin) |
| X8 | 西洋参 (Panax quinquefolium) | 加拿大 (Canada) |
| X9 | 西洋参 (Panax quinquefolium) | 加拿大 (Canada) |
| X10 | 西洋参 (Panax quinquefolium) | 加拿大 (Canada) |
| X11 | 西洋参 (Panax quinquefolium) | 吉林 (Jilin) |
| X12 | 西洋参 (Panax quinquefolium) | 吉林 (Jilin) |
| X13 | 西洋参 (Panax quinquefolium | 吉林 (Jilin) |
| X14 | 西洋参 (Panax quinquefolium)) | 山东 (Shandong) |
| X15 | 西洋参 (Panax quinquefolium) | 吉林 (Jilin) |

表 3 三七样本信息

Tab. 3 Sample information of Panax notoginseng

| 编号 (No.) | 品种名 (species name) | 产地及来源 (location) |
|---|---|---|
| S1 | 三七 (P.notoginseng)[对照药材 (reference medicinal materials)] | 中国食品药品检定研究院 (National Institutes for Food and Drug Control) |
| S2 | 三七 (Panax notoginseng) | 云南 (Yunnan) |
| S3 | 三七 (Panax notoginseng) | 云南 (Yunnan) |
| S4 | 三七 (Panax notoginseng) | 云南 (Yunnan) |
| S5 | 三七 (Panax notoginseng) | 云南 (Yunnan) |
| S6 | 三七 (Panax notoginseng) | 云南 (Yunnan) |
| S7 | 三七 (Panax notoginseng) | 云南 (Yunnan) |
| S8 | 三七 (Panax notoginseng) | 云南 (Yunnan) |
| S9 | 三七 (Panax notoginseng) | 云南 (Yunnan) |
| S10 | 三七 (Panax notoginseng) | 云南 (Yunnan) |
| S11 | 三七 (Panax notoginseng) | 云南砚山 (Yanshan, Yunnan) |
| S12 | 三七 (Panax notoginseng) | 云南马龙 (Malong, Yunnan) |
| S13 | 三七 (Panax notoginseng) | 云南建水 (Jianshui, Yunnan) |



(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表 4　其他中药材样本信息

Tab. 4　Sample information of the other Chinese herbal medicine

| 编号 (No.) | 品种名 (species name) | 产地及来源 (location) |
|---|---|---|
| Z1 | 景天三七 (Sedum aizoon L.) | 湖南怀化 (Huaihua, Hunan) |
| Z2 | 栌兰 (Talinum paniculatum) | 湖南 (Hunan) |
| Z3 | 水田七 (Schizocapsa plantaginea Hance) | 湖南 (Hunan) |
| Z4 | 姜黄 (Curcuma longa L.) | 四川 (Sichuan) |
| Z5 | 竹节参 (Panax japonicus C. A. Mey.) | 湖南 (Hunan) |
| Z6 | 商陆 (Phytolacca acinosa Roxb.) | 湖南 (Hunan) |
| Z7 | 紫茉莉 (Mirabilis jalapa L.) | 湖南 (Hunan) |
| Z8 | 莪术 (Curcuma zedoaria Rosc.) | 湖南 (Hunan) |
| Z9 | 板蓝根 (Wrightia laevis) | 湖南 (Hunan) |
| Z10 | 厚朴 (Magnolia officinalis) | 湖南中医药大学植物园 (Hunan University of Chinese Medicine Botanical Garden) |
| Z11 | 杜仲 (Eucommia ulmoides Oliv.) | 湖南中医药大学植物园 (Hunan University of Chinese Medicine Botanical Garden) |
| Z12 | 玄参 (Scrophularia ningpoensis Hemsl.) | 湖南中医药大学植物园 (Hunan University of Chinese Medicine Botanical Garden) |
| Z13 | 何首乌 (Polygonum multiflorum Thunb.) | 湖南中医药大学植物园 (Hunan University of Chinese Medicine Botanical Garden) |
| Z14 | 甘草 (Glycyrrhiza uralensis Fisch.) | 湖南中医药大学植物园 (Hunan University of Chinese Medicine Botanical Garden) |
| Z15 | 积雪草 (Centella asiatica) | 湖南 (Hunan) |
| Z16 | 满山红 (Rhododendron mariesii) | 湖南 (Hunan) |
| Z17 | 布渣叶 (Strophanthus divaricatus) | 湖南 (Hunan) |
| Z18 | 络石藤 (Trachelospermum jasminoide) | 湖南 (Hunan) |
| Z19 | 救必应 (Ilex rotunda) | 湖南 (Hunan province) |
| Z20 | 西河柳 (Cynanchum stauntonii) | 湖南 (Hunan province) |
| Z21 | 青椒 (Zanthoxylum schinifolium) | 湖南 (Hunan province) |
| Z22 | 急性子 (Impatiens balsamina) | 湖南 (Hunan province) |
| Z23 | 火麻仁 (Cannabis sativa L.) | 湖南 (Hunan province) |
| Z24 | 胡芦巴 (Trigonella foenum-graecum L.) | 湖南 (Hunan province) |
| Z25 | 胡芦巴 (Trigonella foenum-graecum L.) | 湖南 (Hunan province) |
| Z26 | 韭菜子 (Allium tuberosum) | 湖南 (Hunan province) |
| Z27 | 莲子 (Nelumbo nucifera Gaertn.) | 湖南 (Hunan province) |
| Z28 | 桔梗 (Platycodon grandiflorum) | 湖南 (Hunan province) |

表 5　引物序列表

Tab. 5　Primers used in this study

| 基因 (gene) | 引物 (primer) | 序列 5 ’-3 ’(sequence from 5 to 3) |
|---|---|---|
| 内部转录间隔区 2 (ITS2) | ITS2F | ATGCGATACTTGGTGTGAAT |
| | ITS3R | GACGCTTCTCCAGACTACAAT |
| 特异性引物对 1 (specific primer 1) | F1 | GTTTTTTAAAAAGAAAAGATAAAAATG |
| | F2 | CCCTACTATTCTTTTCCTTACGTT |
| 特异性引物对 2 (specific primer 2) | F3 | CGCCCTTCTCATAAGATGTTG |
| | F4 | CCCTTCATCGAAAGAGTAGGC |



(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

ITS2 通用引物扩增条件:25 μL PCR 反应体系:10×PCR buffer (含 $Mg^{2+}$) 2.5 μL, dNTPs (2.5 mmol·$L^{-1}$) 2.0 μL, Taq (2.5 U·$μL^{-1}$) 0.4 μL, 上、下游引物 (10 μmol·$L^{-1}$) 各 0.5 μL, 2.0 μL 基因组模板 DNA, 灭菌 $ddH_2O$ 补足至 25 μL;PCR 反应程序:94 ℃预变性 5 min 后, 94 ℃变性 30 s, 56 ℃退火 30 s, 72 ℃延伸 45 s, 4 035 个循环后, 72 ℃延伸 10 min。

1.2.4 西洋参多重 PCR 扩增体系 反应体系总体积 25 μL, 其中包括 5×Primer STAR Buffer ($Mg^{2+}$ plus) 5.0 μL, dNTPs mixture (2.5 mmol·$L^{-1}$) 3 μL, 鉴别引物对 1 (2 μmol·$L^{-1}$) 2 μL, 引物对 2 (2.5 μmol·$L^{-1}$) 1 μL, PrimeSTAR HS DNA Polymerase (Takara, 2.5 U·$μL^{-1}$) 0.25 μL, DNA 模板 1.0 μL, 无菌双蒸水补充体系至 25 μL。PCR 反应参数:95 ℃预变性 3 min, 98 ℃变性 10 s, 50 ℃退火 15 s, 72 ℃延伸 1 min, 30 个循环后, 72 ℃延伸 7 min, 4 ℃保存。PCR 扩增反应结束后, 取 PCR 反应产物 5 L, 加 6×Loading buffer 1 L 混匀后, 于 GelGreen 染色的 2% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 90 V 电压下电泳 40 min, 凝胶成像系统下观察并拍照保存。

利用上述特异性引物建立了用于鉴别人参属人参、西洋参、三七的多重 PCR 方法, 本研究各主要参数均经过系统的优化考察, 建立最佳多重 PCR 扩增体系, 并对本法的耐受性和特异性进行考察和验证。

## 2 结果

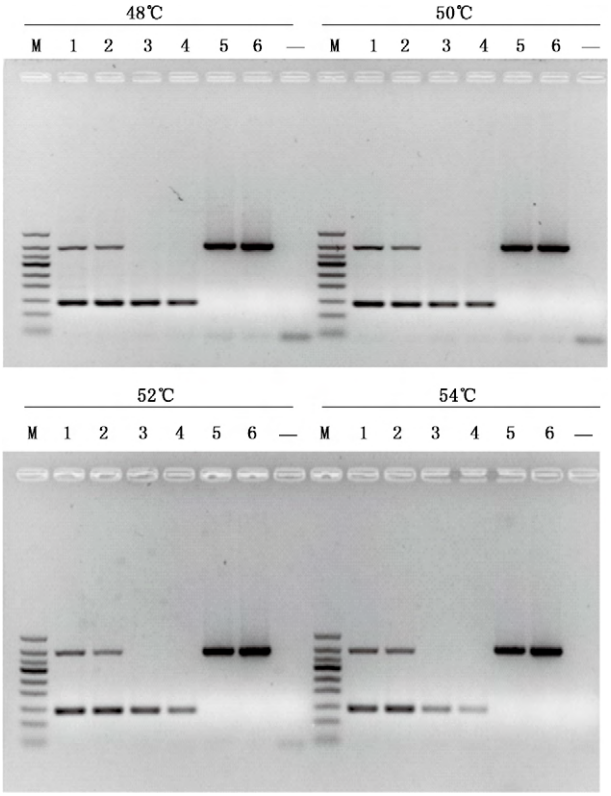
### 2.1 模板质量

采用通用引物 ITS2 对本实验的所有 DNA 模板进行扩增, 均得到约 500 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。

### 2.2 多重 PCR 反应体系的建立

2.2.1 退火温度考察 分别设置退火温度为 48、50、52、54 ℃, 考察不同退火温度对扩增的影响, 筛选最佳退火温度。结果表明退火温度在 48~54 ℃时西洋参样本均可扩增片段大小出约为 150 bp 和 400 bp 2 条特异性片段, 人参样本可扩增出片段大小约为 150 bp 的特异性条带, 三七样本可扩增出片段大小约为 400 bp 的特特异性条带 (见图 1)。综合考虑退火温度对两组引物扩增效率的影响, 本研究选择退火温度为 50 ℃。

2.2.2 循环次数考察 分别选用 30、35、38 和 40 个循环进行考察, 筛选最适扩增循环次数, 结果表明 30 个循环时就能扩增出三者的特异性鉴别带型 (见图 2)。为保证结果的准确性, 避免扩增循环数过多导致可能的非特异性条带的扩增, 故循环次数选择为 30 个循环进行 PCR。




M. 凝胶电泳 DNA 分子标记 (DNA ladder 50 bp), 从上至下依次为 (from top to bottom):500 bp、400 bp、350 bp、300 bp、250 bp、200 bp、150 bp、100 bp、50 bp

1、2. 西洋参 (P. quinquefolium) 3、4. 人参 (P. ginseng) 5、6. 三七 (P. notoginseng)"-"为空白 (blank)

图 1 退火温度对鉴别结果的影响

Fig. 1 The PCR program with a series of annealing temperature

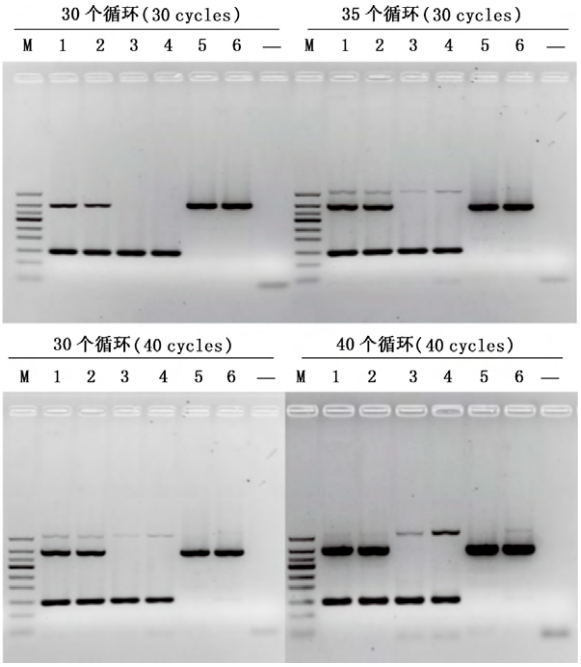
2.2.3 DNA 模板量考察 对 25 μL PCR 反应体系中的模板 DNA 用量进行了考察, 调整 DNA 浓度约 40 ng·$μL^{-1}$, 分别设置 0.25 μL (相当于 10 ng)、1 μL (相当于 40 ng)、2 μL (相当于 80 ng) 以及 3 μL (相当于 120 ng) 量的 DNA 模板, 结果表明 0.25~3 μL (相当于 10~120 ng 总 DNA) 均能扩增, 并且, 在循环数足够 (30 个循环) 的情况下, 随着 DNA 浓度的增加, 扩增条带呈明亮增加的趋势, 但浓度变化不影响鉴别结果的判读 (见图 3)。

### 2.3 方法的耐受性实验

2.3.1 不同 PCR 仪考察 分别用 ABI Veriti、ABI Simpli Amp、BIO RAD T100 以及 SensQuest GmbH 型基因扩



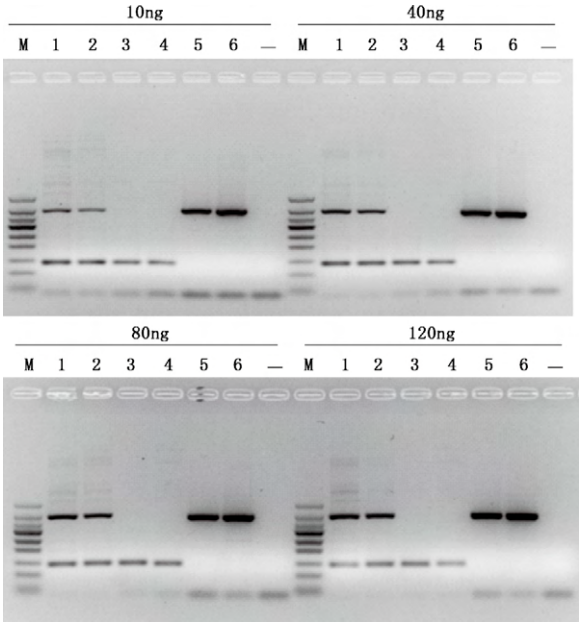
(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net




M. 凝胶电泳 DNA 分子标记 (DNA ladder 50 bp), 从上至下依次为 (from top to bottom) :500 bp、400 bp、350 bp、300 bp、250 bp、200 bp、150 bp、100 bp、50 bp
1、2. 西洋参 (P. quinquefolium)　3、4. 人参 (P. ginseng)　5、6. 三七 (P. notoginseng)“ - ”为空白 (blank)

图 2　不同循环数 PCR 扩增的结果

Fig. 2　The PCR program amplified by different cycle numbers

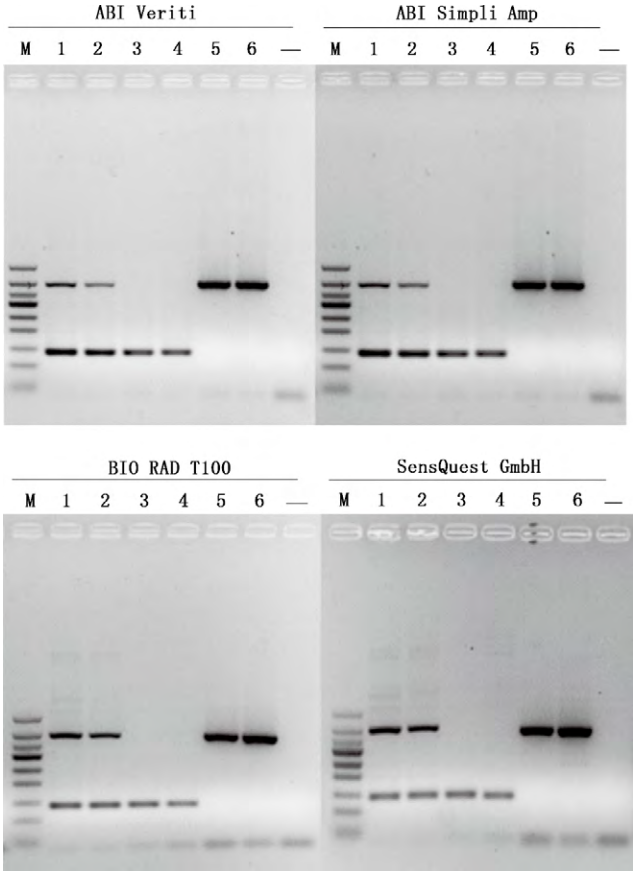



M. 凝胶电泳 DNA 分子标记 (DNA ladder 50 bp), 从上至下依次为 (from top to bottom) :500 bp、400 bp、350 bp、300 bp、250 bp、200 bp、150 bp、100 bp、50 bp
1、2. 西洋参 (P. quinquefolium)　3、4. 人参 (P. ginseng)　5、6. 三七 (P. notoginseng)“ - ”为空白 (blank)

图 3　不同模板量的 PCR 扩增结果

Fig. 3　The PCR program amplified by different DNA templates

增仪进行 PCR 扩增, 结果表明在不同品牌 PCR 仪上的扩增条带亮度基本一致, 均不影响 PCR 鉴别结果的判定 (见图 4)。




M. 凝胶电泳 DNA 分子标记 (DNA ladder 50 bp), 从上至下依次为 (from top to bottom) :500 bp、400 bp、350 bp、300 bp、250 bp、200 bp、150 bp、100 bp、50bp
1、2. 西洋参 (P. quinquefolium)　3、4. 人参 (P. ginseng)　5、6. 三七 (P. notoginseng)“ - ”为空白 (blank)

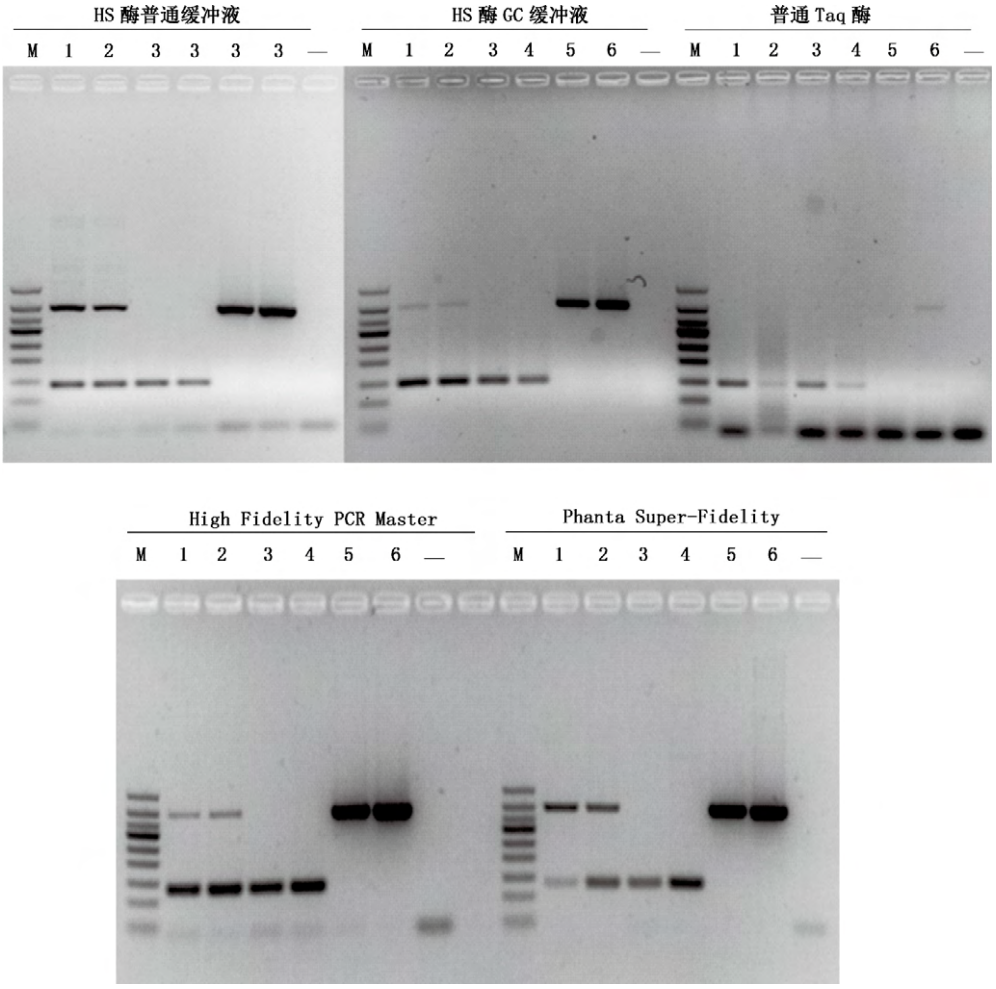
图 4　不同 PCR 仪的 PCR 扩增

Fig. 4　The PCR program amplified by different PCR instrument

2.3.2　不同 Taq 酶考察　为考察不同保真度的酶对鉴别结果的影响, 分别使用高度保真的 HS 酶普通缓冲液 (Takara 公司)、高度保真的 HS 酶 GC 缓冲液 (Takara 公司)、普通 Taq 酶 (TIANGEN 公司)、High Fidelity PCR Master (Roche 公司) 和 Phanta Super-Fidelity DNA Polymerase (Vazyme 公司) 进行试验, 结果表明同一种酶由于缓冲液的不同而扩增条带的亮度有明显的差异, 除使用普通国产 Taq 酶时不能有效的扩增外, 其它酶都能获得有效扩增 (见图 5)。为了确保结果的准确性, 故选择高度保真的 PrimeSTAR HS 酶普通缓冲液 (Takara 公司) 进行实验。



(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net




M. 凝胶电泳 DNA 分子标记（DNA ladder 50 bp），从上至下依次为（from top to bottom）:500 bp、400 bp、350 bp、300 bp、250 bp、200 bp、150 bp、100 bp、50 bp

1、2. 西洋参（P. quinquefolium） 3、4. 人参（P. ginseng） 5、6. 三七（P. notoginseng）“ - ”为空白（blank）

图 5 不同酶的 PCR 扩增结果

Fig. 5 The PCR program amplified by different enzyme separately

### 2.4 特异性鉴别结果

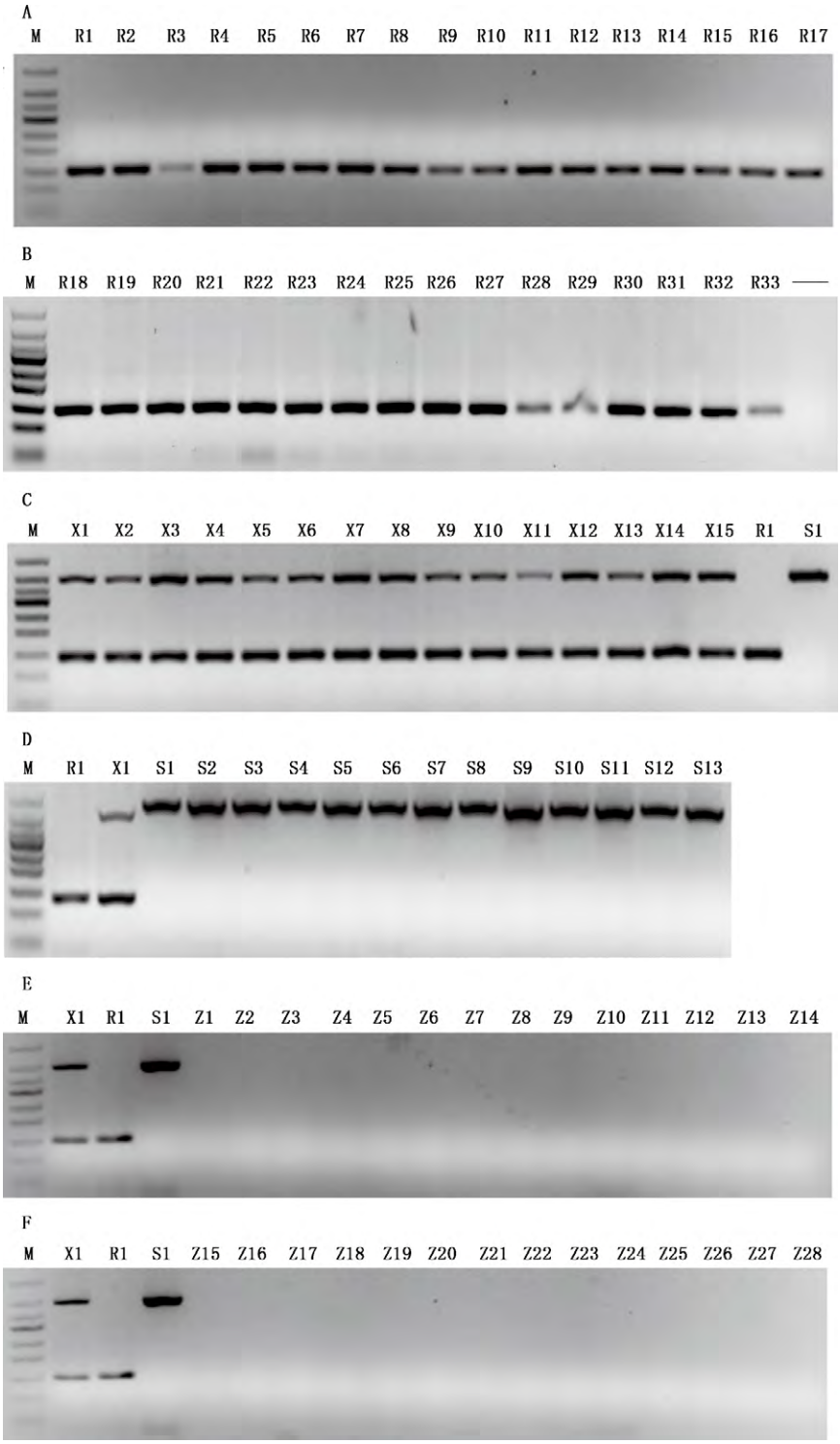
采用上述所确定的最佳反应体系和反应参数，总体积 25 μL，其中包括 5×Primer STAR Buffer（$Mg^{2+}$ plus）5.0 μL，dNTPs mixture（2.5mmol · $L^{-1}$）3 μL，鉴别引物对 1（2 μmol · $L^{-1}$）2 μL，引物对 2（2.5 μmol · $L^{-1}$）1 μL，PrimeSTAR HS DNA Polymerase（Takara，2.5 U · $μL^{-1}$）0.25 μL，DNA 模板 1.0 μL，无菌双蒸水补充体系至 25 μL。PCR 参数 :95 ℃预变性 3 min，98 ℃变性 10 s，50 ℃退火 15 s，72 ℃延伸 1 min，30 个循环后，72 ℃延伸 7 min，4 ℃保存。使用收集的 89 批样品对所建立的多重 PCR 鉴别体系进行特异性考察和验证，结果表明所有人参样本可扩增出片段大小约为 150 bp 的特异性条带（见图 6-A、B），西洋参样本可扩增片段大小出约为 150 bp 和 400 bp 2 条特异性片段（见图 6-C），三七样本可扩增出片段大小约为 400 bp 的特异性片段（见图 6-D），在所研究的其他 28 种药材均为阴性扩增（见图 6-E、F）。因此，表明本多重 PCR 方法能够成功地鉴别人参、西洋参、三七。PCR 鉴别结果与形态学生药鉴定结果完全吻合。

## 3 讨论

本研究的引物设计来源于两部分，基于人参、西洋参和三七 psbA-trnH 基因序列差异与通过 RAPD 标记筛选获得人参、西洋参和三七特异性片段的 DNA 序列，根据两部分基因序列的差异设计了 2 对特异性引物，多重 PCR 引物的设计最关键，引物的



(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net




A、B. R1~R33 为表 1 中的编号（R1~R33, the same as sample number in table 1）　C. X1~X15 为表 2 中的编号（X1~X15, the same as sample number in table 2）　D. S1~S13 为表 3 中的编号（S1~S13, the same as sample number in table 3）　E、F. Z1~Z28 为表 4 中的编号（Z1~Z28, the same as sample number in table 4）

M. 凝胶电泳 DNA 分子标记（DNA ladder 50 bp），从上至下依次为（from top to bottom）:500 bp、400 bp、350 bp、300 bp、250 bp、200 bp、150 bp、100 bp、50 bp“ - ”为空白（blank）

图 6　特异性引物对所有样本的 PCR 鉴别结果

Fig. 6　Agarose gel electrophoresis of PCR amplification for the identification of all samples



(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

GC 含量,退火温度等应相近,要严格避免出现 2 对引物之间互相错配而导致非特异性扩增;其次,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[12],所以确定多重引物的浓度是实验成功的重要步骤。本研究多重 PCR 方法建立的难点是该体系中各因素的确定,特别是各对引物的浓度比例和稳定性的摸索,本方法是经过多次摸索和条件优化而确定最佳反应体系。

采用本研究建立的西洋参多重 PCR 鉴别体系对收集的 89 批样品进行适用性实验考察和验证,所有人参 33 批样本(编号 R1~R33)可扩增出片段大小约为 150 bp 的特异性条带,西洋参 15 批样本(编号 X1~X15)可扩增片段大小出约为 150 bp 和 400 bp 2 条特异性片段,三七 13 批样本(编号 S1~S13)可扩增出片段大小约为 400 bp 的特异性片段,而其他 28 种药材(编号 Z1~Z28)均为阴性扩增。本实验所有的药材均经严格的形态鉴定,PCR 鉴别结果与形态学生药鉴定结果完全吻合,进一步验证了该多重 PCR 鉴别方法用于人参属 3 种药材真伪鉴定的可靠性和稳定性;同时,为了确保实验样本 DNA 质量可靠性,采用 ITS2 的通用引物对所有样本进行扩增作为阳性对照,以完善质量控制。综上,本研究表明该多重 PCR 鉴别体系特异性好,适用性强,只通过 1 次 PCR 扩增即可准确、可靠地鉴别人参、西洋参、三七原植物及其药材和饮片,值得推广和应用。

参考文献


[1] 中国药典 2010 年版. 一部 [S]. 2010:8, 131
ChP 2010. Vol I [S]. 2010:8, 131

[2] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志. 第五十四卷 [M]. 北京:科学出版社, 1999:17
Editorial Committee of flora of China Chinese Academy of Sciences. The Flora of China. Vol 54 [M]. Beijing:Science Press, 1999:17

[3] 佟鹤芳, 薛健, 童燕玲, 等. 人参和西洋参特有挥发性成分鉴别 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 21 (19):120
TONG HF, XUE J, TONG YL, et al. Analysis of unique volatile components from ginseng and quinquefolius using for determining [J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2013, 21 (19):120

[4] 崔秀明, 黄璐琦, 郭兰萍, 等. 中国三七产业现状及发展对策 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39 (4):553
CUI XM, HUANG LQ, GOU LP, et al. Chinese Sanqi industry status and development countermeasures [J]. China J Chin Mater Med, 2014, 39 (4):553

[5] 曹智, 张燕娣, 许永华, 等. 人参有效成分及其药理作用研究新进展 [J]. 人参研究, 2012, 24 (2):39
CAO Z, ZHANG YD, XUE YH, et al. Active ingredients and pharmacological activities of ginseng new progress [J]. Ginseng Res, 2012, 24 (2):39

[6] 佟鹤芳, 薛健, 童燕玲, 等. 人参和西洋参特有挥发性成分鉴别 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 21 (19):120
TONG HF, XUE J, TONG YL, et al. Analysis of unique volatile components from ginseng and quinquefolius using for determining [J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2013, 21 (19):120

[7] 宋沁馨, 冯芳, 张心悦, 等. SNP 测定结合芯片电泳法快速鉴别人参和西洋参 [J]. 药物分析杂志, 2009, 29 (1):1
SONG QX, FENG F, ZHANG XY, et al. Rapid detection the SNP of Panax ginseng and P. quinquefolius by microchip electrophoresis [J]. Chin J Pharm Anal, 2009, 29 (1):1

[8] 孙涛, 滕少娜, 孔德英, 等. DNA 条形码技术应用于人参鉴定 [J]. 中国生物工程杂志, 2013, 33 (4):143
SUN T, TENG SN, KONG DY, et al. DNA barcoding used in the identification of ginseng [J]. China Biotechnol, 2013, 33 (4):143

[9] 詹鑫婕, 田程, 张媛, 等. 基于 ITS2 条形码 SNPs 的人参和西洋参 PCR-SSCP 分子鉴别研究 [J]. 中国中药杂志, 2012, 37 (24):3748
ZHAN XJ, TIAN C, ZHANG Y, et al. PCR-SSCP molecular identification of Panax ginseng and P. quinquefolius based on ITS2 barcoding SNPs [J]. China J Chin Mater Med, 2012, 37 (24):3748

[10] 曹晖, 刘玉萍, 伏见裕利, 等. 三七及其伪品的 DNA 测序鉴别 [J]. 中药材, 2001, 24 (6):398
CAO H, LIU YP, FUSHIMI H, et al. Panax notoginseng and DNA sequencing of its pseudo products [J]. J Chin Med Mater, 2001, 24 (6):398

[11] 田程, 刘春生, 吴浩忠, 等. 中药人参与西洋参饮片的电子鼻检测方法及识别模式 [J]. 中国中药杂志, 2012, 37 (8):1165
TIEN C, LIU CS, WU HZ, et al. Detection method and pattern recognition of ginseng and American ginseng pieces by electronic nose [J]. China J Chin Mater Med, 2012, 37 (8):1165

[12] 尤超, 赵大球, 梁乘榜, 等. PCR 引物设计方法综述 [J]. 现代农业科技, 2011, 17 (3):48
YOU C, ZHAO DQ, LIANG CB, et al. Review of the PCR primer design method [J]. Mod Agric Sci Technol, 2011, 17 (3):48


(本文于 2015 年 10 月 9 日收到)



(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net