

基于 ITS2 条形码 SNPs 的人参和西洋参 PCR-SSCP 分子鉴别研究

詹鑫婕, 田程, 张媛, 刘春生*

(北京中医药大学 中药学院, 北京 100102)

[摘要] 目的: 依据人参和西洋参 ITS2 条形码的专属性 SNP 鉴别位点, 建立利用 PCR-SSCP 技术鉴别人参和西洋参的方法。方法: 查找 GenBank 上已收录的人参和西洋参 ITS2 序列, 进行比对分析, 筛选人参和西洋参 ITS2 序列的专属性 SNP 鉴别位点, 据此设计引物, 采用聚合酶链反应-单链构象多态性(PCR-SSCP)方法对 11 个人参样品和 10 个西洋参样品进行分析, 对 PCR 产物进行测序验证。结果: 人参和西洋参样品的 PCR-SSCP 谱带与各自的对照药材谱带一致, 人参和西洋参的 PCR-SSCP 谱带有显著差异; PCR-SSCP 鉴别结果和经测序鉴别结果一致。结论: 和测序法相比, PCR-SSCP 方法快速、准确, 可用于人参和西洋参药材的鉴定。

[关键词] 人参; 西洋参; ITS 序列; PCR-SSCP

人参和西洋参分别为五加科植物人参 *Panax ginseng* C. A. Mey. 和西洋参 *P. quinquefolium* 的干燥根, 二者药材形态相似, 但功效差异较大, 人参和西洋参均有补气生津的功效, 但人参性温, 味甘偏苦, 补气偏于助阳; 西洋参性凉味甘, 补气偏于养阴^[1-2]。由于西洋参与人参价格差异较大, 性状和显微特征相似, 故市场上用人参冒充西洋参的情况比较多见。因此, 为了保证西洋参的临床疗效, 寻找快速、准确鉴别人参和西洋参的方法具有重要意义。

DNA 分子鉴定技术因其准确性、客观性, 在中药材鉴定中的应用越来越受到人们的重视。已有人采用 RAPD 技术、AP-PCR 技术、PCR-RFLP 技术对人参和西洋参进行了鉴别研究^[3-7]。还有学者^[8-9]用 DNA 测序法对不同品种的人参 ITS 序列进行比较。近年来, 有人提出 ITS2 条形码作为药用植物鉴定的首选条形码, 以 PCR 扩增和测序联用方法对中药材进行分子鉴定^[10], 但由于 ITS2 片段依然较长, 中药材中含有较多的次级代谢产物, 中药材 DNA 降解严重, 使 ITS2 条形码鉴定中药材时存在重复性较差, 易出现假阴性结果; 商业公司测序时间长导致中药材分子鉴定效率低等问题, 以上问题困扰着中药

材分子鉴定的推广使用, 因此, 更快速、准确的分子鉴别方法是急需解决的关键问题。

聚合酶链式反应及单链构象多态性(polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism, PCR-SSCP)技术能检测到短片段中单碱基的差异, 而随着大量药用植物 DNA 条形码序列的报道, 寻找易混淆药材间专属性的 SNP 鉴别位点成为可能。本文通过比对已经发表的人参和西洋参的 ITS2 序列, 设计可扩增包含专属性鉴别位点的 248 bp 短片段的引物, 优化 PCR 退火温度、电泳时间等因素, 建立准确、快速的人参和西洋参的 PCR-SSCP 鉴定方法。

1 材料和方法

1.1 人参、西洋参样品和对照药材 实验材料购自全国多个药材市场, 来源、采集日期和产地见表 1, 2。均由北京中医药大学中药学院张媛副教授进行性状鉴定, 并经薄层色谱鉴定证实。人参和西洋参对照药材购自中国食品药品检定研究院, 人参(批号 120917-200609, 编号 RB), 西洋参(批号 120997-200608, 编号 XB)。

1.2 DNA 的提取 以人参和西洋参干燥药材为材料, 取约 100 mg, 70% 乙醇漂洗, 擦拭, 放入用液氮冷冻过的研钵内, 加入液氮磨成细粉。采用新型植物基因组 DNA 快速提取试剂盒(Aidlab 公司), 严格按照说明书操作提取 DNA。并用 1% 琼脂糖凝胶电泳验证 DNA 的质量。

1.3 PCR 扩增引物的设计 从 GenBank 上下载 12 条

[稿件编号] 20121108015

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81072988)

[通信作者] * 刘春生, Tel: (010) 84738624, E-mail: max_liucs@263.net

[作者简介] 詹鑫婕, 硕士研究生, E-mail: zhanxjh@163.com

表 1 供试人参样品来源

Table Resources of *Panax ginseng*

样品编号	状态	采集地	采集日期	产地
R1	粉末	吉林	2010-6-5	吉林桦甸
R2	粉末	抚顺	2010-6-14	东北
R3	粉末	厦门	2010-6-7	吉林
R4	药材	辽阳	2010-6-16	东北
R5	药材	抚顺	2010-6-14	吉林
R6	粉末	安国	2010-7-4	吉林
R7	药材	上海	2010-10-24	吉林
R8	药材	吉林	2010-11-27	吉林延边
R9	药材	岳池	2010-12-2	吉林
R10	粉末	广安	2010-12-6	吉林
R11	药材	新疆	2010-12-26	东北

表 2 供试西洋参样品来源

Table 2 Resources of *Panax quinquefolium*

样品编号	状态	采集地	采集日期	产地
X1	药材	安国	2010-6-5	东北
X2	药材	胶州	2010-6-26	加拿大
X3	粉末	抚顺	2010-6-14	加拿大
X4	药材	杭州	2010-7-15	美国
X5	粉末	亳州	2010-7-10	东北
X6	粉末	安国	2010-7-4	加拿大
X7	粉末	安国	2010-7-4	加拿大
X8	药材	安国	2010-7-4	吉林
X9	粉末	成都	2010-7-22	吉林
X10	粉末	大庆	2010-7-12	北京

人参 ITS2 序列(登录号 EU592017.1, EU592020.1, EU592021.1, EU592029.1, HM446498.1, HM446500.1, HM446502, HM446503.1, HM446504.1, HQ112415.1, HQ112416.1, JF421520.1) 7 条西洋参 ITS2 序列(登录号 DQ249991.1, FJ606755.1, HM446506.1, HQ112439.1, HQ112440.1, JF778873.1, JF778874.1), 采用 DNAMAN 软件进行序列比对, 找出人参和西洋参的专属性 SNP 鉴别位点, 利用 Primer Premier 5.0 软件设计引物, 扩增产物包含专属性鉴别位点, 引物由上海生工生物技术

公司合成。

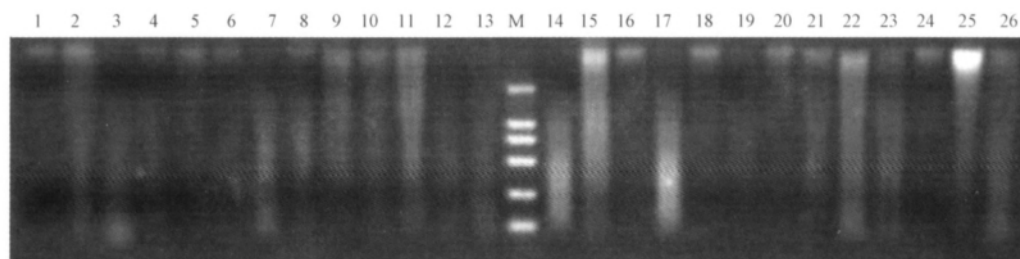
1.4 PCR 扩增 以人参样品 R1-R11 和对照品 RB、西洋参样品 X1-X10 和对照品 XB 为模板, 用特异性引物 SF 和 SR 进行 ITS2 片段整段扩增, 20 μ L 反应液含 10 $\times$ PCR buffer 2.0 μ L, dNTP(2.5 mmol $\cdot$ L⁻¹) 1.6 μ L, MgCl₂(25 mmol $\cdot$ L⁻¹) 1.2 μ L, 引物 SF(5 μ mol $\cdot$ L⁻¹) 1.0 μ L, 引物 SR(5 μ mol $\cdot$ L⁻¹) 1.0 μ L, 模板 DNA 4.0 μ L(10 ~ 20 ng), *rTaq* 0.2 μ L, ddH₂O 9.0 μ L。反应程序为 94 $^{\circ}$ C 5 min, 接 94 $^{\circ}$ C 45 s; 56 $^{\circ}$ C 45 s; 72 $^{\circ}$ C 45 s; 接 72 $^{\circ}$ C 10 min。采用 1% 琼脂糖凝胶电泳验证 PCR 产物的质量。

1.5 PCR-SSCP 分析 取 PCR 扩增产物 8 μ L, 加入 12 μ L 变性缓冲液(95% 甲酰胺, 10 mmol $\cdot$ L⁻¹ EDTA, 0.025% 二甲苯青 FF, 0.025% 溴酚蓝), 混匀后 95 $^{\circ}$ C 水浴变性 10 min, 立即冰浴 5 min。迅速上样于 14% 非变性聚丙烯酰胺凝胶(30% PAGE 9.8 mL, 10 $\times$ TBE 2.1 mL, ddH₂O 7.0 mL, APS 150 μ L, TEMED 10 μ L, 胶的尺寸为 0.1 cm $\times$ 10 cm $\times$ 18 cm), 不加或加 1% 甘油, 电泳缓冲液为 1 $\times$ TBE, 电泳槽为北京君意东方电泳设备有限公司(JY-JX5 型)产品, 在 20 $^{\circ}$ C 下 120 V 恒压电泳 14 h。银染检验: 固定液(10% 乙醇, 0.5% 冰醋酸溶液)固定 7 min, 去离子水漂洗 10 s, 0.2% 硝酸银染色 30 min, 去离子水漂洗 10 s, 显色液(1.5% 氢氧化钠溶液, 0.4% 甲醛)显色 7 min。

1.6 DNA 序列测定 PCR 扩增产物由上海生工生物技术公司测序, 在 NCBI 网站进行 BLAST 比对, 并将所有样品测序结果采用 DNAMAN 软件进行序列比对, 验证特异位点。

2 结果

2.1 DNA 提取 将提取纯化的人参和西洋参总 DNA 经琼脂糖凝胶分析, DNA 降解较为严重, 见图 1。



1. RB; 2 ~ 11. R1 ~ R10; 12. R11; 14 ~ 19. X1 ~ X6; 20 ~ 21. X7; 22. X8; 23 ~ 24. X9; 25. X10; 26. XB; M. DNA marker 2 000, 1 000, 750, 500, 250, 100 bp。

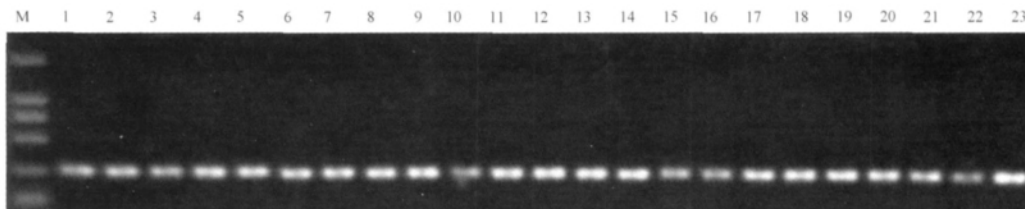
图 1 人参和西洋参样品和对照药材总 DNA

Fig. 1 DNA of *Panax ginseng* and *P. quinquefolium* samples and standards

2.2 引物 从 GenBank 上下载的人参和西洋参的 ITS2 序列,经 DNAMAN 调整后序列比对,人参和西洋参在第 28 碱基处和第 39 碱基出现 C→T 转换,将这 2 个位置定义为人参和西洋参的特异位点。由于 PCR-SSCP 分析的适宜长度为 200 bp 左右,因此采用 Primer Premier 5.0 软件设计出扩增产物包含特

异位点的引物,上游引物 SF 5'-CAGAATCCCGT-GAACCA-3',下游引物 SR 5'-CCGCACGACAT-GAGAAG-3',产物长度 248 bp。

2.3 PCR 扩增 人参和西洋参的样品 R1 ~ R11, X1 ~ X10 和对照品 RB 和 XB,经 PCR 扩增后,均获得 1 条大小约为 250 bp 的条带,见图 2。



1 ~ 11. R1~R11; 12 ~ 21. X1 ~ X10; 22. RB; 23. XB; M. DNA marker 2 000, 1 000, 750, 500, 250, 100 bp。

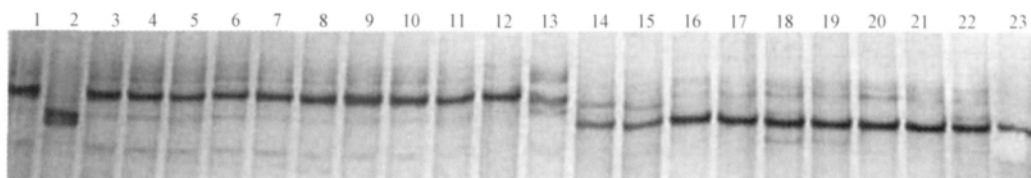
图 2 人参和西洋参样品和对照药材 ITS2 PCR 扩增产物

Fig. 2 PCR amplification result of ITS2 of DNA extracted from *Panax ginseng* and *P. quinquefolium* samples and standards

2.4 PCR-SSCP 条件 经条件优化,获得人参和西洋参 PCR-SSCP 的最佳条件,详见 1.4。11 个人参样品的电泳谱带均与人参对照药材相同,10 个西洋

参样品的电泳谱带均与西洋参对照药材相同,见图 3,PCR-SSCP 检验的特异性为 100%。

研究发现,退火温度对谱带数目影响较大,



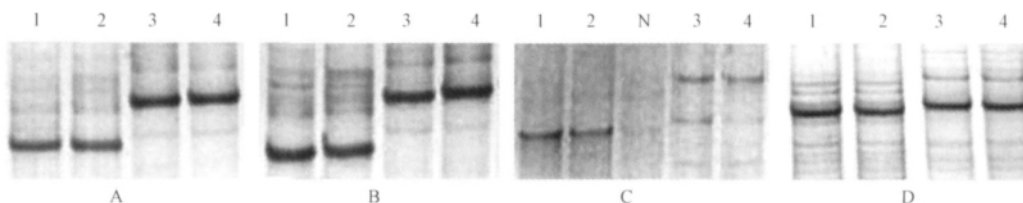
1. RB; 2. XB; 3 ~ 13. R1 ~ R11; 14 ~ 23. X1 ~ X10。

图 3 PCR-SSCP 结果

Fig. 3 SSCP analysis of PCR products of ITS2

250 bp 片段的退火温度在 52 ~ 56 °C 时,温度越低,SSCP 出现的杂带越多,但退火温度对主带位置没有影响,因此在 52 ~ 56 °C 对鉴定结果没有影响;PCR 产物上样量为 3 μL 时,谱带较弱,将 PCR 产物上样量增至 8 μL,谱带清晰明显;电泳

时间对结果影响较大,120 V 电泳 6 h,鉴定效果不佳,电泳 12 h,可获得较好分离效果,如果时间较短,人参和西洋参的谱带位置比较接近,有可能出现误判,电泳时间 12 h 以上二者谱带位置差异明显,见图 4。



A. 退火温度 56 °C,上样量 20 μL,电泳 14 h; B. 退火温度 54 °C,上样量 20 μL,电泳 14 h; C. 退火温度 56 °C,上样量 8 μL,电泳 14 h; D. 退火温度 52 °C,上样量 15 μL,电泳 6 h; 1. RB; 2. R2; 3. XB; 4. X1; N. 空白对照。

图 4 不同条件下人参和西洋参样品和对照药材 PCR-SSCP 结果

Fig. 4 SSCP analysis of PCR products of ITS2 by different methods

3 讨论

本研究以含有西洋参和人参专属性鉴别位点的 248 bp 长度的 DNA 片段进行 PCR-SSCP 鉴定,并对上样量、电泳时间等因素进行考察,经多次重复实验,结果稳定、特异,说明在优化条件下进行 PCR-SSCP 方法鉴定西洋参和人参结果稳定、可靠。

人参和西洋参功效差异较大,由于价格等原因,市场上人参混充西洋参现象普遍,对人参和西洋参进行准确鉴别,是保证西洋参临床疗效的关键。本研究选用不同产地、不同价格、不同加工方式的人参和西洋参作为实验材料,实验结果能反映市场销售的人参和西洋参商品情况。本研究还比较了 11 个人参样品、10 个西洋参样品及它们的对照药材的 PCR-SSCP 鉴定结果和 TLC 鉴定结果,序列比对鉴定结果,发现三者结果相同,都能用于区别人参和西洋参药材,但 PCR-SSCP 鉴定和其他 2 种方法相比,具有无污染、高效、准确,能鉴别出西洋参药材中混有人参的样品等优势,因此,PCR-SSCP 有可能作为中药材分子鉴定的常规方法进行推广应用。

[参考文献]

- [1] 郑虎占,董泽宏,余靖. 中药现代研究与应用. 第 1 卷[M]. 北京:学苑出版社,1997:19.
[2] 郑虎占,董泽宏,余靖. 中药现代研究与应用. 第 2 卷[M].

北京:学苑出版社,1997:1702.

- [3] Shaw P C, But P P H. Authentication of *Panax* species and their adulterants by random-primed polymerase chain reaction [J]. *Planta Med*, 1995, 61: 466.
[4] Ozek i Y, Wake H, Yoshimatsu K, et al. A rapid method for genomic DNA preparation from dried materials of genus *Panax* to PCR analysis [J]. *Natural Med*, 1996, 50: 24.
[5] Ha W Y, Yau F C F, But P P H, et al. Direct amplification of length polymorphism analysis differentials *Panax ginseng* from *P. quinquefolius* [J]. *Planta Med*, 2001, 67(8): 587.
[6] Cheung K S, Kwan H S, But P P H, et al. Pharmacognostical identification of American and oriental ginseng roots by genomic fingerprinting using arbitrary Primed Polymerase Chain Reaction (AP-PCR) [J]. *J Ethnopharmacol*, 1994, 42(1): 67.
[7] Fushimi H, Komatsu J, Isono M, et al. Application of PCR-RFLP and MSA analyses on 18S ribosomal RNA gene sequence for the identification of three ginseng drugs [J]. *Biod Pharm Bull*, 1997, 20(7): 765.
[8] 马小军,汪小全,肖培根,等. 野山参与人参 rDNA 内转录间隔区(ITS)序列比较[J]. 中国中药杂志, 2000, 25(4): 206.
[9] Ok Tae Kim, Kyong Hwan Bang, Dong Su In, et al. Molecular authentication of ginseng cultivars by comparison of internal transcribed spacer and 5.8S rDNA sequences [J]. *Plant Biotechnol Rep*, 2007, 1: 163.
[10] 刘义梅,罗焜,陈科力,等. ITS2 序列鉴定小茴香及其常见混伪品[J]. 环球中医药, 2011, 7(4): 260.

PCR-SSCP molecular identification of *Panax ginseng* and *P. quinquefolius* based on ITS2 bar coding SNPs

ZHAN Xin-jie, TIAN Cheng, ZHANG Yuan, LIU Chun-sheng*

(School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a method for identifying *Panax ginseng* and *P. quinquefolius* with PCR-SSCP, on the basis of specific SNP identification sites of their ITS2 bar codes. **Method:** ITS2 sequences of *P. ginseng* and *P. quinquefolius* recorded in GenBank were searched to conduct a comparative analysis and screen out specific SNP identification sites of their ITS2 bar codes. Based on that, the Polymerase Chain Reaction-Single Strand Conformation Polymorphism (PCR-SSCP) method was adopted for analyzing 11 *P. ginseng* samples and 10 *P. quinquefolius* samples and verifying sequencing of their PCR products. **Result:** The *P. ginseng* and *P. quinquefolius* samples had the same agarose images of PCR-SSCP with the standard medicines. There were significant differences between the PCR-SSCP agarose images of *P. ginseng* and *P. quinquefolius*, with identical identification results between PCR-SSCP and sequencing. **Conclusion:** Compared with the sequencing method, PCR-SSCP is so rapid and accurate that it can be used for identifying *P. ginseng* and *P. quinquefolius* medicines.

[Key words] *Panax ginseng*; *Panax quinquefolius*; ITS sequence; PCR-SSCP

doi: 10.4268/cjcm20122414

[责任编辑 孔晶晶]

• 3751 •