# 多重位点特异性 PCR 鉴别人参、三七、西洋参掺杂

蒋超，罗宇琴，袁媛*，黄璐琦，金艳，赵玉洋
(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] 为建立一种能同时鉴别人参、三七、西洋参及其掺杂品的方法。通过分析人参属 ITS，18S 和 *mat*K 序列，寻找特异性 SNP 位点设计引物，建立多重位点特异性 PCR 法，并对不同来源的人参、三七、西洋参样品进行扩增，根据特异性条带大小进行鉴别。在退火温度为 60 ℃，循环数为 35 时，人参、三七和西洋参分别出现约 250，500，1000 bp 的特异性条带。该方法对于人参、三七、西洋参相互掺杂的混合样品，人参中掺杂三七或西洋参以及三七中掺杂西洋参或人参的检出限均为 0.5%，对西洋参中掺杂人参的检出限为 0.5%，掺杂三七的检出限为 1%。表明建立的多重位点特异性 PCR 可用于人参、西洋参、三七的掺杂鉴定。

[关键词] 人参；西洋参；三七；多重位点特异性 PCR；掺伪；分子鉴定
DOI:10.19540/j.cnki.cjcmm.20170222.001

# Identification of *Panax ginseng*, *P. notoginseng* and *P. quinquefolius* admixture by multiplex allele-specific polymerase chain reaction

JIANG Chao, LUO Yu-qing, YUAN Yuan*, HUANG Lu-qi, JIN Yan, ZHAO Yu-yang
(*State Key Laboratory of Dao-di Herbs Breeding Base, National Resource Center for Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing* 100700, *China*)

[Abstract] To achieve a molecular method to identify *Panax ginseng*, *P. notoginseng*, *P. quinquefolius* and their admixture. The ITS, 18S and *mat*K sequences of *Panax* genus were analyzed to develop species-specific SNP marker. Three pairs of species-specific primers were designed to establish a multiplex allele-specific polymerase chain reaction (MAS-PCR) and the samples from different regionwere tested. The results showed that when the annealing temperature was 60 ℃ and the cycle number was 35, approximately 250, 500, 1 000 bp specific band were obtained from *P. ginseng*, *P. notoginseng* and *P. quinquefolius* obtain, respectively. This method could also be used to authentificate admixture samples and could detect 0.5% percent of *P. notoginseng* or *P. quinquefolius* adulterated in *P. ginseng*, or 0.5% percent of *P. ginseng* or *P. quinquefolius* adulterated in *P. notoginseng*. The detect limit of *P. ginseng* in *P. quinquefolius* was 0.5% and *P. notoginseng* in *P. quinquefolius* was 1%. This results showed that the present method could be used as a promise method to identify *Panax ginseng*, *P. notoginseng*, *P. quinquefolius*and their admixture.

[Key words] *Panax ginseng*; *Panax notoginseng*; *Panax quinquefolius*; multiplex allele-specific polymerase chain reaction; admixture; molecular identification

人参、西洋参、三七是我国常用名贵中药，其根、根茎、叶、花、果实等均做药用，价值很高。在中医临床用药上，人参性温，功效大补元气、固脱生津、安神；三七性温，功效散瘀止血、消肿定痛；西洋参性凉，功效补气养阴、清热生津，三者药效具有很大区别，不能混用。然而，由于人参、三七、西洋参为人参属近缘物种，形态和化学成分相似，市场时有掺杂混用现象发生，人参、西洋参饮片或人参花、西洋参花、三七花相互掺杂尤为常见，对用药安全造成损害，需要建立准确、可靠、特别是能同时检测是否存在相互

[收稿日期] 2016-11-08
[基金项目] 中医药行业专项(2014007003)
[通信作者] * 袁媛，主要从事中药功能基因组研究及中药分子鉴定研究，E-mail: y_yuan0732@163.com



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

掺杂的鉴定方法。

分子鉴定尤其是基于 SNP 的方法，因其具有准确性高、特异性好、不受环境影响等优点，在人参属物种鉴定中已有应用，如聚合酶链式反应-单链构象多态性（PCR-SSCP）[1]、聚合酶链式反应-限制性内切酶酶切图谱多态性（PCR-RFLP）[2]、位点特异性 PCR 或多重 PCR[3-4] 以及序列测定技术[5] 等。但这些技术只关注人参属真伪品的鉴定，无法鉴定是否存在掺杂品，对市场实际存在的花、叶、饮片类掺杂样品需要进行多次 PCR 反应才能判定。本研究通过建立多重位点特异性 PCR 方法鉴别人参、三七和西洋参，只通过 1 次 PCR 反应即可准确地对三者及其相互掺伪进行鉴别，并对反应条件进行优化，力求建立准确稳定的人参属掺杂样品检测方法。

## 1　材料与方法

### 1.1　植物

人参原植物（包括根和叶）采自东北不同产区以及北京市怀柔区，由中国农业科学院特产所许世权研究员鉴定，三七原植物采自云南文山州不同产区，由昆明理工大学崔秀明教授鉴定，西洋参原植物采自河北、吉林和北京，竹节参、珠子参和羽叶三七原植物采自安徽、湖北和云南，由湖北轻工大学陈平教授鉴定。人参、西洋参、三七、竹节参、珠子参花、种子及药材样品采自亳州药材市场，由安徽中医药大学周建理教授和中国中医科学院中药资源中心金艳助理研究员鉴定。所有样品经减压干燥后保存于中国中医科学院中药资源中心，样品详细信息见表 1。

表 1　植物材料

Table 1　samples used in this study

| No. | 材料名称 | 拉丁名 | 来源 | 数量 |
|---|---|---|---|---|
| 1 | 人参 | *Panax ginseng* | 辽宁通化市集安市 | 28 |
| 2 | 人参 | *P. ginseng* | 吉林白山市抚松县兴参镇 | 25 |
| 3 | 人参 | *P. ginseng* | 辽宁宽甸石柱村 | 20 |
| 4 | 人参 | *P. ginseng* | 北京市怀柔区 | 17 |
| 5 | 人参 | *P. ginseng* | 吉林白山市抚松县抚南林场 | 16 |
| 6 | 人参 | *P. ginseng* | 黑龙江尚志市 | 15 |
| 7 | 人参药材 | *P. ginseng* | 安徽省亳州市中药城 | 4 |
| 8 | 人参花 | *P. ginseng* | 安徽省亳州市中药城 | 10 |
| 9 | 人参种子 | *P. ginseng* | 辽宁通化市集安市 | 5 |
| 10 | 三七 | *P. notoginseng* | 云南文山州平坝 | 12 |
| 11 | 三七 | *P. notoginseng* | 云南文山州马塘 | 12 |
| 12 | 三七 | *P. notoginseng* | 云南文山州砚山 | 15 |
| 13 | 三七 | *P. notoginseng* | 云南文山州文山县 | 20 |
| 14 | 三七药材 | *P. notoginseng* | 安徽省亳州市中药城 | 10 |
| 15 | 三七花 | *P. notoginseng* | 安徽省亳州市中药城 | 10 |
| 16 | 西洋参 | *P. quinquefolius* | 河北石家庄 | 10 |
| 17 | 西洋参 | *P. quinquefolius* | 吉林白山市靖宇 | 6 |
| 18 | 西洋参 | *P. quinquefolius* | 北京市怀柔区 | 10 |
| 19 | 西洋参药材 | *P. quinquefolius* | 安徽省亳州市中药城 | 13 |
| 20 | 西洋参种子 | *P. quinquefolius* | 安徽省亳州市中药城 | 5 |
| 21 | 竹节参 | *P. japonicus* | 安徽省亳州市中药城 | 5 |
| 22 | 竹节参 | *P. japonicus* | 安徽岳西县鹞落坪 | 8 |
| 23 | 竹节参 | *P. japonicus* | 湖北恩施七姊妹山 | 7 |
| 24 | 珠子参药材 | *P. japonicus* var. *major* | 安徽省亳州市中药城 | 5 |
| 25 | 珠子参 | *P. japonicus* var. *major* | 湖北恩施 | 5 |
| 26 | 珠子参 | *P. japonicus* var. *major* | 云南昭通市鲁甸 | 5 |
| 27 | 羽叶三七 | *P. japonicus* var. *bipinnatifidus* | 云南昭通市鲁甸 | 5 |

### 1.2　鉴别标记获得与引物设计

此前的研究已发现人参和西洋参的特异性 SNP 位点[4]，本研究参考此位点使用 Primer Premier 5.0 设计出人参、西洋参的特异性鉴别引物。为寻找三



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

七鉴别位点，从 NCBI 数据库中下载人参属物种 ITS，*rbc*L，*mat*K，18S rRNA 序列，利用 BioEdit 软件进行同源对齐，校对后分析其特异性 SNP 位点，发现三七花 ITS 序列(以 JQ764993.1 为参照)第 57，68，70，522 位均存在特异性 SNP 位点，分别为 T，T，G，T，而其他人参属所有物种包括人参均为 C，C，A，A，以此为基础利用 Primer Premier 5.0 软件设计三七花特异性鉴别引物，使正反向引物 3′端位均于 SNP 位点上，调整退火温度在 50～55 ℃，并分析所设计的人参、西洋参、三七引物间发夹结构、引物二聚体或错误引发情况。设计的特异性鉴别引物序列见表 2，由生工生物工程(上海)有限公司合成。

表 2　人参、三七、西洋参特异性鉴别引物

Table 2　Specific primer to authentication of *Panax ginseng*, *P. notoginseng* and *P. quinquefolius*

| 物种 | 引物 | 序列(5′-3′) | 引物来源 | 产物大小/bp |
|---|---|---|---|---|
| 人参 | RS-F | ATAACAATACCGGGCTGATAC | 18S | 249 |
| | RS-R | GCCAGTTAAGGACAGGAG | | |
| 三七 | SQ-F | AGGGATGAGGGGTGCGTAG | ITS | 490 |
| | SQ-R | CGACATGAGAAGAGGGCTTTTA | | |
| 西洋参 | XYS-F | AAATGCGGGTTATGACAAA | *mat*K | 1 042 |
| | XYS-R | TTCTGCATATACGCCCAAATT | | |

### 1.3　DNA 提取

取 1 g 植物材料，使用球磨粉碎机粉碎至能过 5 号筛。取粉末 20 mg，使用碱裂解法[7]提取总 DNA，使用 Nanodrop 2000 测定 DNA 浓度，调整浓度至 30 mg·L$^{-1}$，用于 PCR 扩增或于 -20 ℃下保存。

### 1.4　PCR 扩增及电泳

多重位点特异性 PCR 鉴别反应在 200 μL 的 PCR 管中进行，25 μL PCR 反应体系包括 10× PCR Buffer 2.5 μL，dNTPs 混合液(10 mmol·L$^{-1}$) 1.5 μL，人参上下游引物(10 μmol·L$^{-1}$)各 0.3 μL，三七上下游引物(10 μmol·L$^{-1}$)各 0.2 μL，西洋参上下游引物(10 μmol·L$^{-1}$)各 0.25 μL，r*Taq* DNA 聚合酶(5 U·μL$^{-1}$) 0.4 μL，DNA 模板(10～50 ng) 1 μL，双蒸灭菌水 19.1 μL，反应液振荡混匀，瞬时离心后置 PCR 仪上进行扩增。程序为：95 ℃预变性 5 min；95 ℃变性 10 s，60 ℃退火 10 s，72 ℃延伸 20 s，共 35 个循环；最后 72 ℃再延伸 3 min。PCR 产物加入 Loading buffer 后经 EB 预染的 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳，于凝胶成像仪观察结果。

## 2　结果与分析

### 2.1　多重位点特异性 PCR 条件的确定

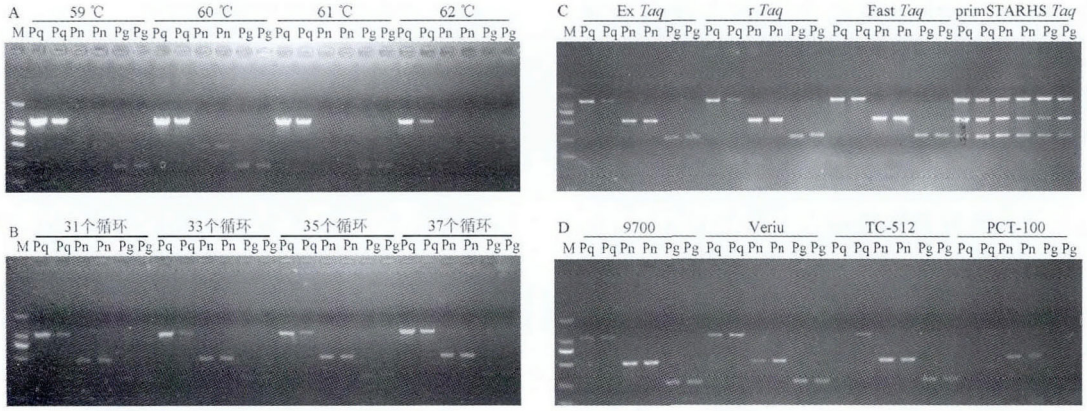
**2.1.1　退火温度与循环数**　前期预实验结果发现使用对应的特异性鉴别引物进行扩增，人参、三七、西洋参在 58～62 ℃时分别能扩出约 250，500，1 000 bp 大小的条带，以此为基础进行多重位点特异性 PCR 鉴别，并对影响多重 PCR 特异性、准确性的关键因素退火温度和循环数进行考察。结果表明退火温度为 60～62 ℃时人参、三七、西洋西洋参分别出现约 250，500，1 000 bp 大小的特异性条带，无非特异性扩增及假阳性条带出现，但 61 ℃以上时人参、三七特异性条带亮度明显降低，确定多重 PCR 退火温度为 60 ℃，见图 1A。对循环数进行考察，31～37 个循环时时人参、西洋参、三七均能获得正确的鉴别结果，35 个循环及 37 个循环 PCR 条带亮度大于 31，33 个循环，见图 1B。考虑到根、叶、花、种子 DNA 提取质量与浓度可能存在区别，药材经加工后 DNA 存在降解出现假阴性结果的风险，选择 PCR 循环数为 35 个循环，对新鲜植物材料的鉴别，可减少循环数至 31 个。

**2.1.2　最适引物量的确定**　PCR 引物用量及引物间的相互比例对多重特异性 PCR 结果有重要影响。根据预实验结果，以西洋参、三七引物量均为 0.2 μL 为基础，分别考察人参上下游引物用量为 0.1，0.2，0.3，0.4 μL 时对多重特异性鉴别结果的影响，结果 0.1 μL 时人参无条带，0.3，0.4 μL 时人参条带明显，且无假阳性条带出现，确定人参上下游引物量为 0.3 μL；在此基础上考察三七用量分别为 0.1，0.2，0.3，0.4 μL 的影响，结果 0.1 μL 时三七条带暗淡，0.2 μL 引物时三七电泳条带亮度大且无假阳性条带出现。在此基础上同法西洋参用量为 0.15，0.2，0.25，0.3 μL，结果 0.25 μL 引物时条带亮度大，最终确定引物配比为人参引物量-三七引物量-西洋参引物量 0.3 μL∶0.2 μL∶0.25 μL。

**2.1.3　*Taq* 酶与 PCR 仪**　使用建好的方法在不同的 *Taq* 酶和不同 PCR 仪上进行多重位点特异性 PCR 以考察方法的适用性。结果表明，使用低保真的 r*Taq*(Takara 公司)、Fast *Taq* 聚合酶(TransGen 公司)、中度保真的 Ex *Taq*(Takara 公司)酶均获得正确的鉴别结果，而高保真性的的 PrimeSTAR HS *Taq* 进行鉴定时人参、三七、西洋参样品均出现假阳性条



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




A. 退火温度; B. 循环数; C. 不同种类 *Taq* 酶; D. 不同型号 PCR 仪; M. DL 2 000 DNA Marker( Takara 公司,条带大小从下到上分别为 100,250,500,1 000,2 000 bp) ; Pq. 西洋参; Pn. 三七; Pg. 人参。

**图 1　不同条件对人参、西洋参、三七多重位点特异性 PCR 鉴别结果的影响**

Fig. 1　Amplified results of different influence factors in multiplex AS-PCR authentication of *Panax ginseng*, *P. notoginseng* and *P. quinquefolius*

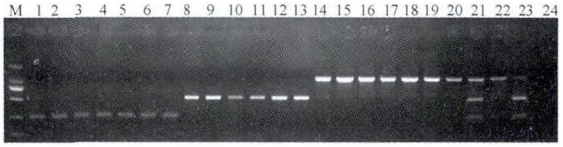
带,见图 1C。这可能是由于高保真 *Taq* DNA 聚合酶具有 3′-5′外切酶活性,导致位于 3′端的鉴别位点被酶切,剩下序列完全匹配获得扩增导致的,表现出与常规位点特异性 PCR 一致的特性[8]。使用不同的 PCR 仪,除老式的 PCT-100 型 PCR 仪外,其他 PCR 仪均获得正确的鉴别结果,见图 1D,由于多重 PCR 对退火温度敏感,不同 PCR 仪温控水平有差异,在进行鉴定时应进行温度调校。

### 2.2　准确性考察

使用建好的方法对来自全国主产区的 140 批人参、79 批三七、44 批西洋参及 40 批人参属其他物种样品进行多重位点特异性 PCR 扩增,结果人参原植物、药材、花、种子等均扩增获得 250 bp 的特异性条带,三七原植物、药材、三七花均获得约 500 bp 的特异性条带,西洋参获得约 1 000 bp 的特异性条带,人参属其他物种包括竹节参、珠子参、羽叶三七均无条带,无假阳性和假阴性结果出现。部分结果见图 2。

### 2.3　掺伪检出限

为检测多重位点特异性 PCR 对掺伪样品鉴别能力。取西洋参和三七粉末各 0.5g 等量混匀,取不同量混合物与人参粉末充分混匀,获得人参粉末中掺有 50%,20%,10%,5%,2%,1% 西洋参三七混合物的系列混合粉末,使用上述方法提取 DNA 并进行多重特异性 PCR 鉴定,以检测方法对人参中掺杂西洋参、三七的检出限; 以同样的方法制作人参、西洋参混合物和三七、西洋参混合物,并制作相应系列




M. DL 2 000 DNA Marker; 1 ~ 7. 人参; 8 ~ 13. 三七; 14 ~ 20. 西洋参; 21 ~ 23. 混合样品,21 ~ 23 中人参-西洋参-三七分别为 33.3% : 33.3% : 33.3%,49.75% : 0.5% : 49.75%,0.5% : 49.75% : 49.75%; 24. 空白对照( $ddH_2O$) 。

**图 2　人参属多重位点特异性鉴别**

Fig. 2　Multiplex AS-PCR authentication of *Panax ginseng*, *P. notoginseng* and *P. quinquefolius*

混合粉末,以检测三七中掺杂西洋参、人参的检出限和西洋参中掺杂人参、三七的检出限。

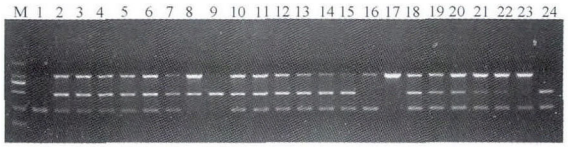
结果表明人参中掺杂 0.5% 以上的三七或西洋参可检出见图 3( 泳道 7) ,同理其对西洋参三七中掺杂西洋参或人参的检出限均为 0.5% ( 泳道 15) ,对西洋参中掺杂人参的检出限为 0.5% ( 泳道 23) ,掺杂三七的检出限为 1% ( 泳道 22) 。

## 4　讨论

真伪掺杂品的鉴别一直是中药鉴别的难点问题,依赖于具有同时检测真伪品特异性标记的方法的开发。多重 PCR 是一种在同一体系内进行多个 PCR 扩增的技术,其突出优势是在一次检测中同时表征多个位点或基因片段,从而具有掺杂检测的潜力。此前的人参属多重 PCR 鉴别方法往往只关注于能否同时检测人参、西洋参、三七物种,对每种药



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




M. DL 2 000 Marker; 1. 人参; 9. 三七; 17. 西洋参; 2 ~ 8,10 ~ 16,18 ~ 24 为不同比例人参、三七、西洋参混合样品,人参-三七-西洋参比例如下: 2 为 50% : 12.5% : 12.5%; 3 为 80% : 10% : 10%,4 为 90% : 5% : 5%; 5 为 95% : 2.5% : 2.5%; 6 为 98% : 1% : 1%; 7 为 99% : 0.5% : 0.5%,8. 0% : 50% : 50%; 10 为 12.5% : 50% : 12.5%; 11 为 10% : 80% : 10%; 12 为 5% : 90% : 5%; 13 为 2.5% : 95% : 2.5%; 14 为 1% : 98% : 1%; 15 为 0.5% : 99% : 0.5%; 16 为 50% : 0% : 50%,18 为 12.5% : 12.5% : 50%; 19 为 10% : 10% : 80%; 20 为 5% : 5% : 90%; 21 为 2.5% : 2.5% : 95%; 22 为 1% : 1% : 98%; 23 为 0.5% : 0.5% : 99%; 24 为 50% : 50% : 0%。

**图 3　人参、三七、西洋参掺伪检出限**

Fig. 3　Limit of detection adulterated rate of *Panax ginseng*, *P. notoginseng* and *P. quinquefolius* admixture

材均需要 2 对引物的扩增结果才能判定,无法用于鉴定是否存在掺杂样品。如刘丽等[3]的多重 PCR 鉴别体系结果的判定,只存在 150 bp 条带的为人参、只存在 400 bp 条带为三七,同时存在 150,400 bp 条带为西洋参,其结果无法区分西洋参与人参三七混合样品,也无法区分西洋参与人参西洋参混合样品。鉴于此,本文针对人参、西洋参、三七分别设计了位点特异性鉴别引物,对每种药材使用单一引物对进行鉴别,从而能检测掺杂样品,做到对中药真伪的准确控制。

人参、西洋参、三七为近缘物种,遗传物质相似,DNA 序列一般只存在少数的 SNP 位点,专属性标记开发困难。本研究通过对人参属所有物种的 18S, ITS, *mat*K 序列进行分析,分别发现 3 组 SNP 位点,可特异性鉴别人参、西洋参、三七。由于只存在单核苷酸的变异,引物间相互作用、PCR 反应体系、循环参数等均直接影响特异性 PCR 鉴别的准确性和特异性[9-10]。本研究对影响 PCR 特异性的关键因素退火温度、循环数、*Taq* 酶种类和引物用量进行了考察,发现本研究建立的方法对条件要求较为宽松,但 *Taq* 酶种类对其特异性具有较显著的影响,仅不具有 3′-5′外切酶活性的 *Taq* 酶能准确鉴别人参、西洋参、三七。为考察多重位点特异性 PCR 方法的准确性,本研究对共计超过 300 批人参、西洋参、三七及其他近缘物种进行了实验验证,包含根、叶、花、种子和不同类型的药材,结果所有人参、三七、西洋参均获得正确的阳性鉴别结果,其他人参属近缘物种均为阴性,与形态学鉴定结果完全吻合,进一步验证了该方法的可靠性和稳定性。为检测该方法对混伪品的鉴别能力,本研究制作了一系列不同掺伪程度的人参、西洋参、三七混合样品并进行多重位点特异性 PCR 扩增,结果对人参、西洋参、三七中任意两者相互掺伪的检出限均达到 1%,可满足中药产业链尤其是不同形态产品的生产检验的需求。传统对人参和三七通过性状进行鉴别,对人参粉和三七粉基于草酸钙簇晶的显著差异进行显微鉴别,对种子种苗、果实、茎叶、花等其他药用部位则需要另外建立专用的鉴别方法,基于 DNA 的多重 PCR 鉴别方法可同时对人参、三七、西洋参的不同生长部位、发育阶段与加工形式的产品进行掺杂鉴别,是对传统鉴别方法的补充和创新。

**[参考文献]**


[1] 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.

[2] Diao Y, Lin X, Liao C, et al. Authentication of *Panax ginseng* from its adulterants by PCR-RFLP and ARMS[J]. Planta Med, 2009, 75(5): 557.

[3] 刘丽,肖炳燚,罗晖明,等. 多重 PCR 方法同时鉴别人参、西洋参、三七[J]. 药物分析杂志,2016,36(4): 668.

[4] 崔光红,唐晓晶,黄璐琦. 利用多重等位基因特异 PCR 鉴别人参、西洋参[J]. 中国中药杂志,2006,31(23): 1940.

[5] Zhu S, Fushimi H, Cai S, et al. Species identification from Ginseng drugs by multiplex amplification refractory mutation system (MARMS)[J]. Planta Med, 2004, 70(2): 189.

[6] Chen X, Liao B, Song J, et al. A fast SNP identification and analysis of intraspecific variation in the medicinal *Panax* species based on DNA barcoding[J]. Gene, 2013, 530(1): 39.

[7] 蒋超,黄璐琦,袁媛,等. 使用碱裂解法快速提取药材 DNA 方法的研究[J]. 药物分析杂志,2013,31(7): 1081.

[8] 蒋超,张雅华,陈敏,等. 基于双向位点特异性 PCR 的金银花真伪鉴别方法研究[J]. 中国中药杂志,2012,37(24): 3752.

[9] 蒋超,黄璐琦,袁媛,等. 金银花中几种分子的真伪鉴别方法比较及其研究进展[J]. 世界科学技术——中医药现代化,2014(8): 1831.

[10] 崔占虎,黄显章,龙平,等. 蒙成药中"地格达"类原料药材的位点特异性 PCR 鉴别研究[J]. 中国中药杂志,2015,40(5): 793.


责任编辑　吕冬梅



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