

基于巢式 PCR 的紫草鉴别引物筛选*

刘杰¹, 谷海媛^{1,2}, 戴胜云¹, 乔菲¹, 连超杰¹, 郑健^{1**}, 加沙尔·斯哈克³

(1. 中国食品药品检定研究院, 北京 102629; 2. 沈阳药科大学, 沈阳 110016; 3. 伊犁哈萨克自治州检验检测认证研究院, 伊犁 835000)

摘要 **目的:** 基于巢式聚合酶链式反应(PCR)理念设计并筛选出可用于高效扩增与鉴别紫草市场样品真伪的特异性引物。**方法:** 针对新疆紫草的 ITS 序列和紫草非《中华人民共和国药典》品 ITS2 序列, 利用 Primer Premier 5 软件进行巢式引物设计; 比较 ITS2 通用引物 PCR 和巢式 PCR 对紫草药材基因组 DNA 的扩增效率; 基于巢式引物直接扩增紫草基因组 DNA, 并进行琼脂糖凝胶电泳检测; 基于扩增产物片段长度、变异位点覆盖情况对设计的紫草药材特异性引物进行评价。**结果:** 经过 Primer Premier 5 软件进行引物设计共选出 11 对引物进行合成; 巢式 PCR 对紫草药材基因组 DNA 的扩增效率明显优于 ITS2 通用引物 PCR; 基于巢式引物直接扩增紫草基因组 DNA 琼脂糖凝胶电泳检测的结果明显优于 ITS2 引物直接扩增紫草基因组 DNA, 且呈单一一条带; 确定 AE-9S/AE-2A、AE-4S/AE-10A、AE-12S/10A、AE-29S/AE-29A 共 4 对引物适用于紫草正伪品鉴定。**结论:** 在 DNA 条形码鉴定和巢式 PCR 技术的基础上, 确定了 4 对可以用于有效区分药材市场中主流的新疆紫草和紫草非《中华人民共和国药典》品的特异性引物, 为后续紫草药材及其他中药民族药品种的鉴定方法研究与开发提供了可参考的依据。

关键词: 紫草; 聚合酶链式反应(PCR); 内部转录间隔区 2(ITS2); DNA 条形码; 巢式 PCR(nPCR)

中图分类号: R 917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2024)05-0756-10

doi: 10.16155/j.0254-1793.2024.05.03

The screening of identification primers for *Arnebiae Radix* based on nested PCR*

LIU Jie¹, GU Hai-yuan^{1,2}, DAI Sheng-yun¹, QIAO Fei¹,
LIAN Chao-jie¹, ZHENG Jian^{1**}, JIA Sha-er · SI Ha-ke³

(1. National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 102629, China; 2. Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China; 3. Yili Institute of Inspection, Testing and Certification, Yili 835000, China)

Abstract Objective: To design and screen specific primers for efficient amplification and identification of *Arnebiae Radix* from market based on the concept of nested PCR. **Methods:** Nested primers was designed using the software of Primer Premier 5 based on the ITS sequence of *Arnebia euchroma* and the ITS2 sequence of non-pharmacopoeial *Arnebiae Radix*. The amplification efficiency of genomic DNA by ITS2 universal primers PCR and nested PCR was compared. The genomic DNA of *Arnebiae Radix* was amplified directly by nested primers and was detected by agarose gel electrophoresis. The specific primers designed for *Arnebiae Radix* based on the fragment

* 国家药品监督管理局药品监管科学体系建设重点项目“新技术新方法在中药质量控制中的应用”(RS2024Z006-105); 中国食品药品检定研究院学科带头人培养基金(2021X4); 新疆维吾尔自治区药品监督管理局智力援疆创新拓展人才计划——“新疆特色民族药研究(以新疆紫草为例)团队”项目

** 通信作者 Tel: (010)53852080; E-mail: zhengjian@nifdc.org.cn

第一作者 Tel: (010)53851401; E-mail: liujie19890215@163.com

length and variation sites' coverage of the amplified product was evaluated. **Results:** A total of 11 primers were selected for synthesis after the primers were designed by Primer Premier 5 software. The amplification efficiency of nested PCR was superior to ITS2 universal primers PCR in genomic DNA of *Arnebiae Radix*. The results of nested primers directly amplified genomic DNA of *Arnebiae Radix* by agarose gel electrophoresis were better than those of ITS2 primers, and showed a single band. Four pairs of primers, AE - 9S/AE - 2A, AE - 4S/AE - 10A, AE - 12S/10A, AE - 29S/AE - 29A, were determined to be suitable for the identification of *Arnebiae Radix*.

Conclusion: On the basis of DNA barcode identification and nested PCR technology, 4 pairs of specific primers are identified which can be used to effectively distinguish *Arnebia euchroma* from the mainstreamed non-pharmacopoeial *Arnebiae Radix* in the medicinal materials market, providing reference for the subsequent research and development of identification methods for *Arnebiae Radix* and other traditional Chinese medicines.

Keywords: *Arnebiae Radix*; polymerase chain reaction (PCR); internal transcribed spacer II of nuclear ribosomal DNA (ITS2); DNA barcoding; nested polymerase chain reaction (nPCR)

中药鉴定是研究中药品种与质量,制定中药标准,寻找和扩大药源的前提和基础。近年来,中药鉴定技术的迅速发展,为中药材基原物种的鉴定奠定了良好的基础。DNA 条形码技术作为新的分子生物学物种鉴定手段,具有鉴定结果准确,重复性良好,方法通用性强等优点^[1,2],在传统形态分类学对物种准确鉴定的基础上,通过对样品标准序列进行测序,建立 DNA 条形码数据库,可以实现物种鉴定的标准化。国家药典委员会自 2015 年版《中华人民共和国药典》(简称《中国药典》)开始收录了中药材 DNA 条形码分子鉴定指导原则,促进了 DNA 条形码技术在中药材鉴定、药品流通与监督等诸多方面的应用^[2-5]。

聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 借助 PCR 仪按照相应的时间和循环次数对靶基因序列进行扩增,由变性、退火和延伸构成 1 个完整的反应周期。常规 PCR 具有程序简单、省时等优点,但常规 PCR 在退火温度不适当时会出现假阳性,而巢式 PCR (nested polymerase chain reaction, nPCR) 通过使用内、外 2 对 PCR 引物分别进行扩增而显著提升了 PCR 的敏感性和准确性。

ITS2 区域作为中药材鉴定的潜在标准 DNA 条形码序列,具有可用于设计通用引物的保守区域,易于扩增,具有足够的变异用以区分亲缘物种。ITS 区域包含 ITS2 区域,具有更长的序列长度和更多的变异位点数。为针对紫草建立较为专属的巢式 PCR 鉴别方法,考虑针对紫草的 ITS 和 ITS2 区域设计巢式特异性引物。通过琼脂糖凝胶电泳的方法对特异性引物的巢式 PCR 扩增效果进行评价,筛选出扩增效

果好,专属性强的特异性引物。

2020 年版的《中国药典》中记载紫草的来源为紫草科软紫草属的新疆紫草(软紫草, *Arnebia euchroma* (Royle) Johnst.)、内蒙紫草(黄花软紫草, *Arnebia guttata* Bunge) 的干燥根。紫草作为民族地区常用药材,同时也是常用大宗中药材,其需求量不断升高,由于国内新疆紫草的产量难以满足市场需求,很多非药典规定的植物作为紫草药材混入市场,其中包括一些进口药材,经过对全国市场的紫草药材抽检发现,市场上主要流通的紫草药材为新疆紫草和非药典收录的进口紫草品种(非药典品),没有发现内蒙紫草作为紫草药材在市场上流通。紫草药材的市场样品因受保存时间长、保存条件差、次生代谢产物含量高等原因的限制,导致其基因组 DNA 降解严重。药材的基因组 DNA 提取和 PCR 扩增的有效性是保证药材能够进行分子生物学鉴定的基础与前提,针对紫草药材的特殊性,对其 PCR 扩增条件进行优化,可提高紫草市场药材 DNA 条形码短片段的 PCR 扩增成功率,解决紫草药材市场来源样品进行 DNA 条形码鉴定的前端问题,为中药、民族药市场药材的成功鉴定奠定基础。

本试验拟针对紫草的 ITS 和 ITS2 区域设计并筛选巢式特异性扩增引物,为紫草市场药材的成功鉴定提供支撑。

1 材料和方法

1.1 材料 AB135 - S 万分之一分析天平 (Mettler 公司), MM400 球磨仪 (Retsch 公司), NanoDrop one 超微量分光光度计 (Thermo Fisher 公司), ABI Veriti

PCR 仪(ThermoFisher 公司),Mupid-one 水平电泳仪(Takara 公司),GelDoc XR+全自动凝胶成像系统(BIORAD 公司)。

植物基因组 DNA 提取试剂盒(货号 DP305,天根生化科技有限公司),2×Taq Master Mix 缓冲液(货号 GK8006,GENEray 公司),GelRed(货号 41003,Biotium 公司),Fast Dissolved Agarose Tablets(货号 A610709-0100,BBI Life Sciences),Trans DNA Marker I(货号 BM401,TransGen Biotech 公司),50×TAE Buffer(货号 RT204,天根生化科技有限公司)。引物 ITS2(ITS2F;5'-ATGCGATACTTGGTGTGAAT-3',ITS3R;5'-GACGCTTCTCCA GACTACAAT-3'),引物 ITS(ITS4;5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3',ITS5;5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3')(上海捷瑞生物工程有限公司)。

实验共选取 25 批紫草样品,通过全国药材抽验收集自药材生产或经营单位,经 DNA 条形码鉴定其来源并由中国食品药品检定研究院郑健研究员审核。

1.2 植物总 DNA 的提取 利用植物基因组提取试剂盒对紫草样品进行基因组 DNA 提取,首先将紫草样品用 100% 乙醇常温浸泡 24 h,取出晾干后经 MM400 进行粉碎,取样量约为 100 mg,加入植物基因组提取试剂盒中的 GP1 后裂解过夜(12~15 h),后续操作按照植物基因组 DNA 提取试剂盒的操作步骤进行基因组 DNA 提取。

1.3 基于 ITS、ITS2 引物的 PCR PCR 反应体系 20 μL:2×Taq Master Mix 缓冲液 10 μL,上下游引物各 0.4 μL(2.5 μmol·L⁻¹),DNA 模板 1 μL,灭菌的双蒸水 8.6 μL。PCR 反应条件:95℃预变性 4 min;95℃变性 30 s,52℃退火 30 s,72℃延伸 1 min,循环 35 次;72℃延伸 7 min。PCR 优化扩增程序:95℃预变性 4 min;95℃变性 30 s,40℃退火 30 s,72℃延伸 1 min,循环 5 次;95℃变性 30 s,52℃退火 30 s,72℃延伸 1 min,循环 35 次;72℃延伸 7 min。

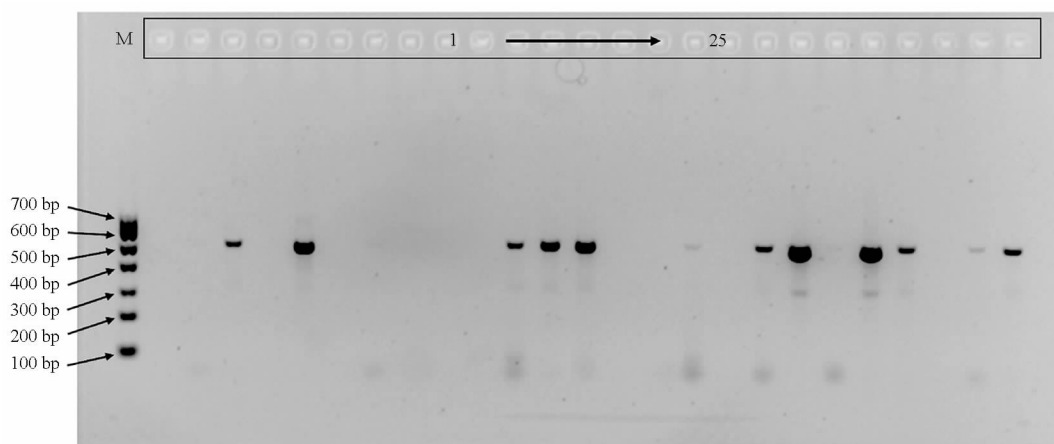
1.4 基于巢式 PCR 理念的引物设计 ITS 引物扩增新疆紫草的基因组 DNA,得到的 ITS 序列去除引物端,ITS2 引物扩增紫草市场非药典品的基因组 DNA,得到的 ITS2 序列去除 5.8S 和 28S 区段。利用 Primer Premier 5 软件针对以上新疆紫草的 ITS 序列和紫草市场非药典品的 ITS2 序列设计引物。

1.5 基于巢式引物的聚合酶链式反应 反应体系 20 μL:2×Taq Master Mix 缓冲液 10 μL,上下游引物各 0.4 μL(2.5 μmol·L⁻¹),模板(PCR 扩增产物或基因组 DNA)1 μL,灭菌的双蒸水 8.6 μL。PCR 反应条件:95℃预变性 4 min;95℃变性 30 s,52℃退火 30 s,72℃延伸 1 min,循环 35 次;72℃延伸 7 min。PCR 优化扩增程序:95℃预变性 4 min;95℃变性 30 s,40℃退火 30 s,72℃延伸 1 min,循环 5 次;95℃变性 30 s,52℃退火 30 s,72℃延伸 1 min,循环 35 次;72℃延伸 7 min。

1.6 琼脂糖凝胶电泳检测 1×TAE 电泳缓冲液的配制:将 50×TAE Buffer 稀释 50 倍作为工作液,用于琼脂糖凝胶配制及进行凝胶电泳。2.0% 琼脂糖凝胶的制备:取琼脂糖凝胶片 2 片(1 g),加入 50 mL 1×TAE 电泳缓冲液,微波炉中火加热煮沸 3 次至琼脂糖全部融化,摇匀,冷却至 65℃左右加入显色剂 GelRed(1:10 000),充分混匀,小心地倒入内槽板上,使胶液缓慢展开,直到整个玻璃板表面形成均匀胶层,室温下静置直至凝胶完全凝固,垂直轻拔梳子,将凝胶及内槽放入电泳槽中,添加 1×TAE 电泳缓冲液至刚没过胶板为止。加样:在在配制好的琼脂糖凝胶板上将 3 μL 扩增产物、DNA Marker 用移液器分别将样品加入胶板的样品槽内。电泳:加样后的凝胶板立即进行电泳,电压 5 V·cm⁻¹。凝胶成像:用凝胶成像系统拍照并保存结果。

2 结果

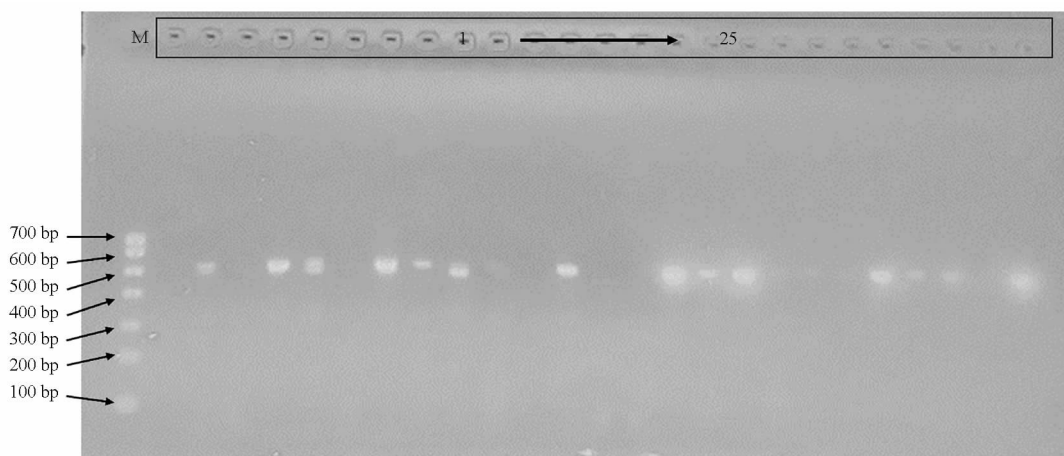
2.1 基于 ITS2 引物的聚合酶链式反应电泳检测结果 以 ITS2 引物对紫草样品的基因组 DNA 进行 PCR 扩增,扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测,结果如图 1 所示,可能受基因组 DNA 降解程度或 DNA 中的杂质干扰扩增酶活性的影响,扩增结果中存在较多未扩出或扩增产物条带不明显的样品。为改善 ITS2 引物对紫草基因组 DNA 的 PCR 扩增效果,对其 PCR 扩增程序进行调整,在进行 95℃预变性 4 min 的反应后,增加 95℃变性 30 s,40℃退火 30 s,72℃延伸 1 min 的反应循环 5 次,然后再进行 95℃变性 30 s,52℃退火 30 s,72℃延伸 1 min,循环 35 次,其扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测,结果如图 2 所示,扩增效果并没有达到预期中惊艳的效果,扩增结果中存在较多为扩出或扩增产物条带不明显的样品。因此,考虑通过巢式 PCR 的方法,改善紫草样品基因组 DNA 的扩增效果,为后续鉴定奠定基础。



M. marker 1 ~ 25. 实验样品 (experimental samples)

图 1 基于 ITS2 引物的聚合酶链式反应琼脂糖凝胶电泳检测结果

Fig. 1 The agarose gel electrophoresis result of polymerase chain reaction based on ITS2 primers



M. marker 1 ~ 25. 实验样品 (experimental samples)

图 2 优化反应程序后的 PCR 琼脂糖凝胶电泳检测结果

Fig. 2 The agarose gel electrophoresis result of polymerase chain reaction after optimized reaction procedures

2.2 基于巢式 PCR 理念的引物设计结果 经 DNA 条形码鉴定, 市场抽样的紫草样品主要有新疆紫草和紫草市场非药典品, 新疆紫草的 ITS 序列和紫草市场非药典品的 ITS2 序列如下所示:

新疆紫草 (*Arnebia euchroma*) - ACCGGGTT-TATCTTGTGCGATCTGCACAGCAGAACCACTCGCGAA CAAGTTCTCAAAACCAAGGCACCGGTCCGGTGCAAGG AACACCTTGCTCTCGATCGGAGCCCAACGGTGCCAC GACATCTTGTCTGCGGCTGAACAAACCCCGGCGC GAGAAGCGCCAAGGAATACTTTAACGAGAGCTTGAAC CATCCTCTCCCGTTCGCGGGGCTTAGGGGCTTGGAG ACGGCTTCTTTATAAACCAACGACTCTCGGCAACG

GATATCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGA AATGCCATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCCGTGAA CCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCTGAGGCCA TTAGGCTAAAGGCACGTCTGCCTGGGCGTCACACATC GCGTCACCCCATCCAAAATAATGTTGGATGTGGTGA TTGTGACCTCCTGTGTCTTGGATGCAGTTGGTTCGAAA TTCGAGTCCGGAGCTTAGGACTTCACGACAAGTGGTG GTTGATAACAACCTCGCGTCATGTCTGTGCCAAGCC TCCGTGTCTCCGTAGACCCTAAGGCGCGTCTTTCCA ACTCGTTCGTTGGAAACCGTGCTACGACCGCGACCC CAGGTCAGGCGGGATTACCCGCTGAATTTAAGCATAT CAATAAGTCGGAGGAT

紫草市场非药典品 - CGAATCGCGTCACCCCATC
CATGATACTCTTGGATGTGGTGGAT TGTGACCTCCTG
TGTCTTGAGATGCAGTTGGTTCGAAATTTGAGTCCGGA
TCTTAGGACTTCACGACAAGTGGTGGTTGGATAACAA
CTTGCGTCATGTGCGTGTGCCGAACCTCCGTGTCTCCCT
AGACCCTAAGGCGCGTCTTTCCAACCTCGTTTGTCCG

GAAACCGCGCTACGACCGCCG

将以上新疆紫草和紫草市场非药典品的序列输入到 Primer Premier 5 软件中,综合考虑所得引物序列的评分和适用性,共筛选出 11 对引物,由捷瑞公司合成引物。引物详细信息如表 1 所示。

表 1 基于巢式 PCR 理念的引物设计结果

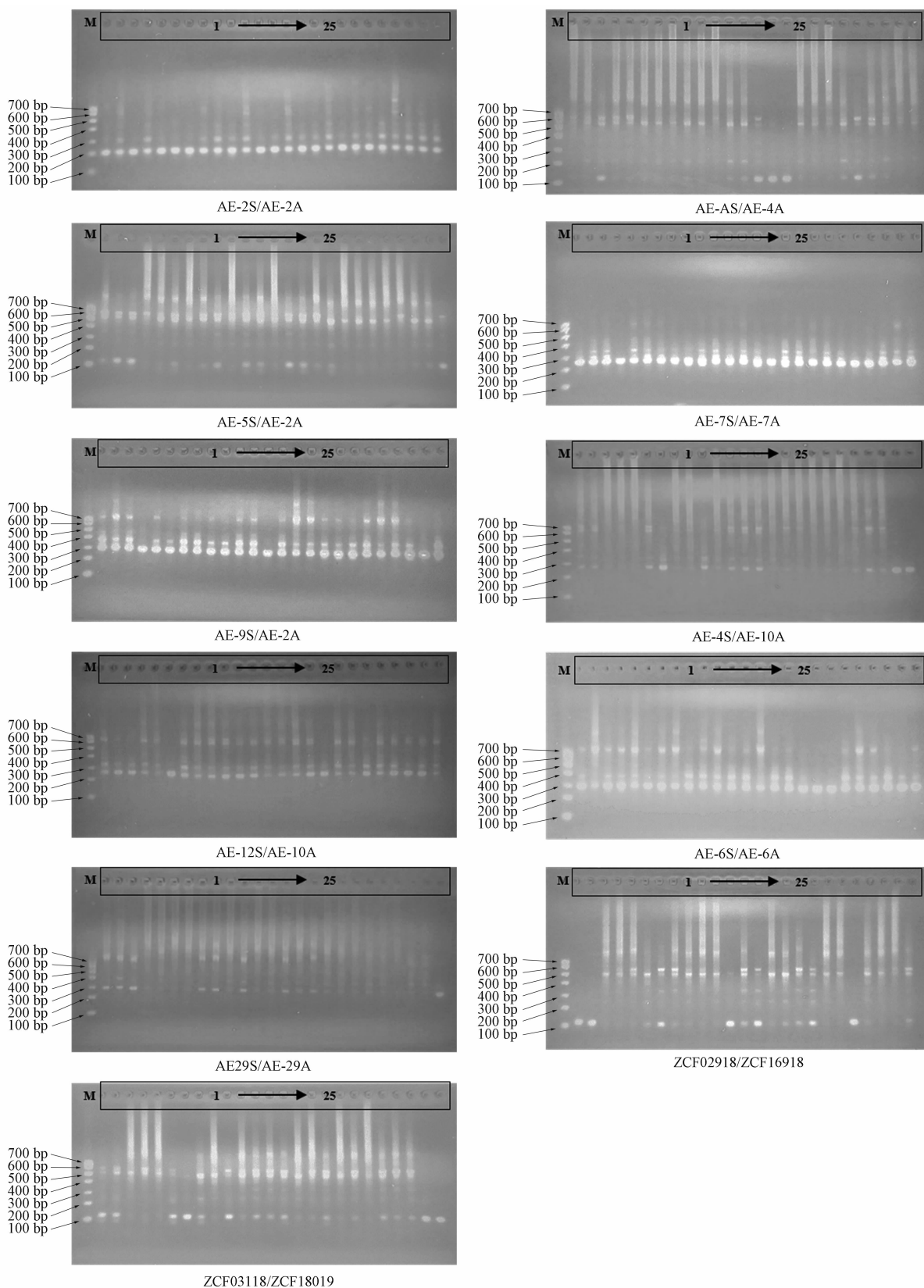
Tab. 1 The primers' results designed based on the nPCR concept

序号(No.)	引物名称(primer name)	引物序列 5' - 3' (primer sequences 5' - 3')	退火温度(annealing temperature)/°C
1	AE - 2S	AATAATGTTGGATGTGGTGGAT	50
	AE - 2A	GGTCGTAGCACGGTTTCC	
2	AE - 4S	GTTGGATGTGGTGGATTG	48
	AE - 4A	GACATGACGCGAGTTGTT	
3	AE - 5S	GACAAGTGGTGGTTGGATA	49
	AE - 2A	GGTCGTAGCACGGTTTCC	
4	AE - 7S	CCATTAGGCTAAAGGCACG	50
	AE - 7A	CACGGTTTCCCAACGAAC	
5	AE - 9S	CAAGTTGCGCCTGAGGCCATTA	55
	AE - 2A	GGTCGTAGCACGGTTTCC	
6	AE - 4S	GTTGGATGTGGTGGATTG	48
	AE - 10A	CCTCCGACTTATTGATATGCT	
7	AE - 12S	TGGATGTGGTGGATTGTG	48
	AE - 10A	CCTCCGACTTATTGATATGCT	
8	AE - 6S	CGAAATGCGATACTTGGTG	50
	AE - 6A	GTAATCCCGCCTGACCTG	
9	AE - 29S	TGAAGAACGTAGCGAAATG	52
	AE - 29A	ACACGGAGGCTTGGCACA	
10	ZCF02918	CTTGGATGTGGTGGATTG	52
	ZCF16918	TAGGGAGACACGGAGGTT	
11	ZCF03118	TGGATGTGGTGGATTGTG	52
	ZCF18019	GCCTTAGGGTCTAGGGAGA	

2.3 巢式 PCR 的琼脂糖凝胶电泳结果 将通用引物扩增紫草基因组 DNA 的 PCR 产物作为模板,分别以表 1 中的 11 对引物作为反应引物进行巢式 PCR 扩增,结果如图 3 所示,紫草基因组 DNA 经巢式 PCR 两步扩增后,其扩增成功率基本接近 100%,具有很好的扩增效果,扩增条带主要集中在 100 ~ 300 bp,部分样品经巢式 PCR 扩增与琼脂糖凝胶电泳检测,结果呈单一明亮条带,也有部分样品呈多条带或弥散条带。

2.4 基于巢式引物直接扩增紫草基因组 DNA 的琼脂糖凝胶电泳结果 为了验证以巢式引物直接

扩增紫草基因组 DNA 是否具有与巢式 PCR 相同的扩增效率,进一步做出实验验证,结果如图 4 所示,其中 4 对引物的扩增产物片段大小位于 100 ~ 200 bp,分别为 AE - 4S/AE - 4A、AE - 5S/AE - 2A、ZCF03118/ZCF18019、ZCF02918/ZCF16918;有 5 对引物的扩增产物片段大小位于 200 ~ 300 bp,分别为 AE - 7S/AE - 7A、AE - 2S/AE - 2A、AE - 12S/AE - 10A、AE - 4S/AE - 10A、AE - 9S/AE - 2A;有 2 对引物的扩增产物片段大小位于 300 ~ 400 bp,分别为 AE - 6S/AE - 6A 和 AE - 29S/AE - 29A。与前面“2.3”中 2 次 PCR 扩增得到的结果相比,



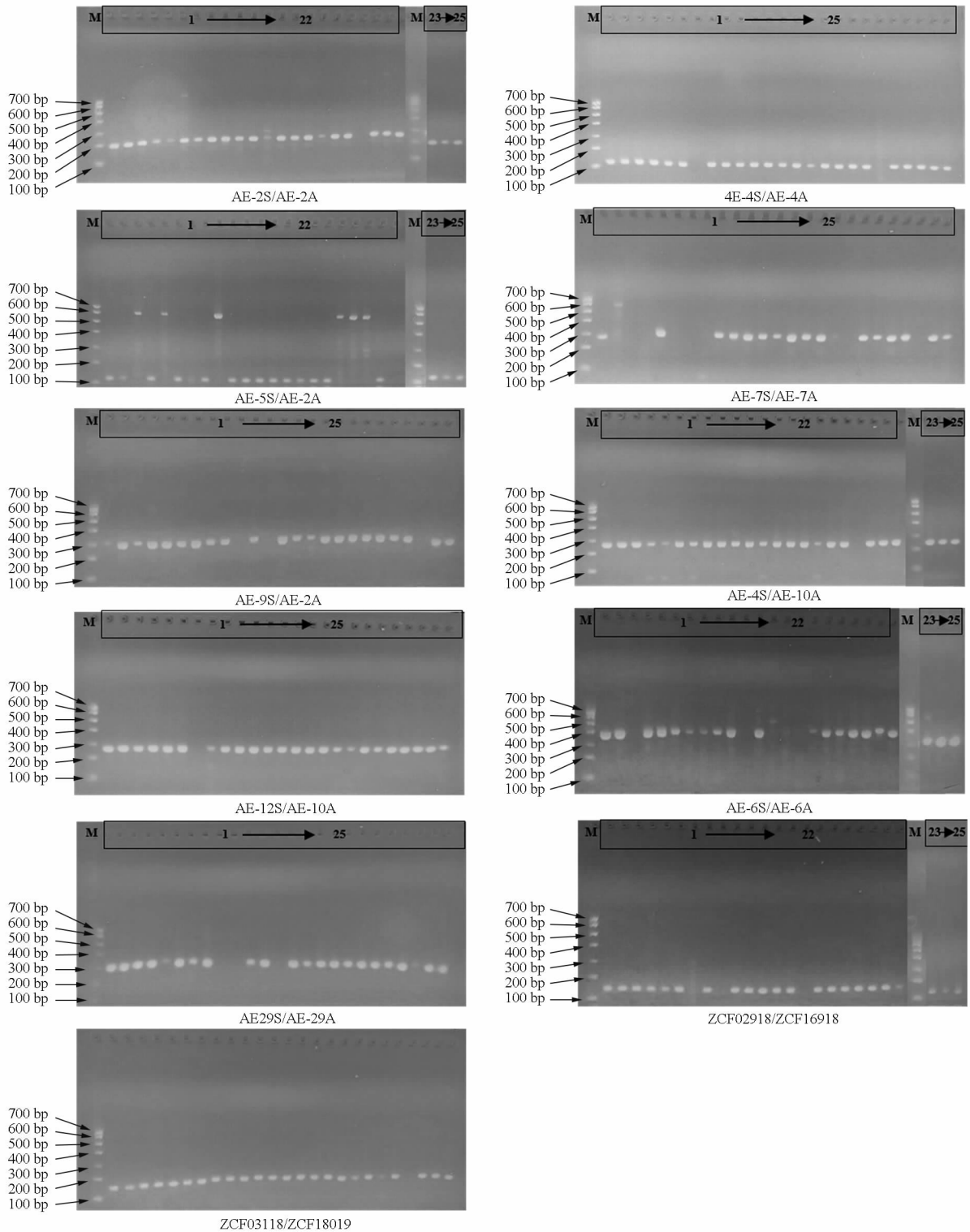
M. marker 1~25. 实验样品 (experimental samples)

图3 巢式PCR的琼脂糖凝胶电泳结果

Fig. 3 The agarose gel electrophoresis results of nPCR

扩增效率虽不能达到 100% ,但明显优于 ITS2 引物直接扩增紫草基因组 DNA ,且呈单一条带 ,这对

后续紫草药材鉴别中的测序与序列比对具有重要意义。



M. marker 1 ~ 25. 实验样品 (experimental samples)

图 4 巢式引物直接扩增紫草基因组 DNA 的琼脂糖凝胶电泳结果

Fig. 4 The agarose gel electrophoresis results of *Arnebieae Radix* genomic DNA directly amplified by nPCR primers

2.5 巢式引物的评价 经 DNA 条形码鉴定,市场抽样的紫草样品主要有新疆紫草和紫草市场非药典品^[6-7],新疆紫草的 ITS 序列和紫草市场非药典品的 ITS2 序列如下所示:

新疆紫草 (*Arnebia euchroma*) - ACCGGGTTTATC
TTGTCGATCCTGCACAGCAGAACCACTCGCGAACAAG
TTCTCAAAACCAAGGCACCGGTCCGGTGCAAGGAACAC
CTTGCTCTCGATCGGAGCCCAACGGTGCCACGACATC
TTGTCGTGGCGCTGAACAAACCCCGGCGGAGAAGC
GCCAAGGAATACTTTAACGAGAGCTGAACCATCCTC
TCCCCTTCGCGGGGCTTAGGGGCTTGGAGACGGCTTC
TTTATAAACCAACGACTCTCGGCAACGGATATCTT
GGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCGAT
ACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAG
TCTTTGAACGCAAGTTGCGCCTGAGGCCATTAGGCTA
AAGGCACGTCTGCCTGGGCGTCACACATCGCGTCACC
CCATCCAAAATAATGTTGGATGTGGTGGATTGTGACC
TCCTGTGTCTTGAGATGCAGTTGGTCGAAATTCGAGT
CCGGAGCTTAGGACTTCACGACAAGTGGTGGTTGGAT
AACAACTCGCGTCATGTCGTGTGCCAAGCCTCCGTGT
CTCCGTAGACCCTAAGGCGCGTCTTTCCAACCTCGTT
CGTTGGGAAACCGTGCTACGACCGCGACCCCAGGTCA
GGCGGGATTACCCGCTGAATTTAAGCATATCAATAAG
TCGGAGGAT

紫草市场非药典品 - CGAATCGCGTCACCCCAT
CCATGATACTCTTGGATGTGGTGGATTGTGACCTCCT
GTGTCTTGAGATGCAGTTGGTCGAAATTTGAGTCCGG
ATCTTAGGACTTCACGACAAGTGGTGGTTGGATAACA
ACTTGCCTCATGTCGTGTGCCAACCCTCCGTGTCTCC
CTAGACCCTAAGGCGCGTCTTTCCAACCTCGTTTGTG
GGGAAAACCGCGCTACGACCGCGG

以上 2 条序列经 MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) 软件进行自动序列对齐 (automatic sequence alignment) 后,非药典品的 ITS2 序列与新疆紫草 ITS 序列的 406 ~ 631 bp 对齐,且以上 2 条序列对齐部分共存在 17 个变异位点,变异位点位置与对应变异信息:407 A - G;408 C - A;427 A - T;428 A - G;432 A - C;434 G - C;489 C - T;499 G - T;538 C - T;556 A - G;558 G - A;572 G - C;605 C - T;608 T - C;618 T - C;630 G - C;631 A - G。

综合考虑 11 对引物的扩增产物片段长度、变异位点覆盖情况 (表 2),以及扩增产物经琼脂糖凝胶电

泳检测的条带亮度,确定 AE - 9S/AE - 2A、AE - 4S/AE - 10A、AE - 12S/AE - 10A、AE - 29S/AE - 29A 共 4 对引物适用于紫草正伪品鉴定。

3 讨论与分析

DNA 条形码技术为药用植物鉴别开辟了 1 条新途径,使不能从性状上进行准确鉴定的中药、民族药样品依靠新的分子生物学手段完成快速鉴定成为可能。巢式 PCR 技术具有操作简单,灵敏度高,特异性强,重复性好,快速等优点,该技术是由内外 2 对引物先后对靶序列进行扩增,使其 DNA 拷贝数以双重指数级增加,常规 PCR 扩增对模板浓度有一定要求,微量样品的鉴定则存在一定的难度,而巢式 PCR 扩增的出现解决了这一困境。同时,巢式 PCR 扩增的第 2 次扩增是以第 1 次 PCR 扩增产物为模板,其引物结合到第 1 次 PCR 产物序列的内部,再加入 *Taq* 酶进行再次 PCR 反应,该方法既增加了模板量又保证了 *Taq* 酶的活性,如果第 1 次扩增发生了错误片段,则第 2 次能在错误片段上形成引物配对并扩增的概率很低,基本上不会出现非特异性片段。因此,与常规 PCR 相比,巢式 PCR 的灵敏度更高、特异性更强^[8-15]。

本研究在 DNA 条形码鉴定的基础上,针对紫草药材的 ITS2 序列进行巢式引物设计,提高了紫草药材的扩增效率,为市场样品进行真伪鉴别奠定了重要基础,但巢式 PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳检测后,其结果中有部分样品呈多条带或弥散条带,且巢式 PCR 经两步扩增后,其扩增效率虽然大大提高,但第二步扩增是以第一步扩增的产物作为模板,容易导致实验环境及样品的污染,影响结果鉴定的准确性。因此,虽然巢式 PCR 扩增的结果明显优于 ITS2 引物的常规 PCR 扩增结果,本课题组仍继续考察了舍去第一步 ITS2 引物扩增,选用巢式引物直接扩增紫草药材基因组 DNA 的琼脂糖凝胶电泳结果。结果显示,巢式引物的扩增效果优于 ITS2 引物,且条带单一,适用于后续的测序及鉴定。

根据扩增效率、扩增产物长度及扩增片段所包含的新疆紫草与紫草非药典品变异位点数对表 1 及 2 中 11 对引物进行优选,结果显示,AE - 9S/AE - 2A、AE - 4S/AE - 10A、AE - 12S/AE - 10A、AE - 29S/AE - 29A 此 4 对引物直接扩增紫草基因组 DNA 的扩增效率明显优于 ITS2 引物,扩增产物片段长度约 200 ~ 300 bp,这个片段长度低于 ITS2 引物的

表 2 巢式引物评价信息表

Tab. 2 The evaluation information table of nested primers

序号 (No.)	引物名称 (primer name)	引物位于新疆紫草 ITS 序列中的位置 (primer location in ITS sequence of <i>Arnebia euchroma</i>)	扩增产物片段大小(扩增产物变异位点数) [fragment size of amplified product (variants number of amplified product)]
1	AE-2S	428-449	~200 bp(8)
	AE-2A	610-627	
2	AE-4S	434-451	100~200 bp(/)
	AE-4A	531-548	
3	AE-5S	513-531	100~200 bp(/)
	AE-2A	610-627	
4	AE-7S	372-390	200~300 bp(12)
	AE-7A	602-619	
5	AE-9S	356-377	200~300 bp(14)
	AE-2A	610-627	
6	AE-4S	434-451	200~300 bp(11)
	AE-10A	665-685	
7	AE-12S	436-453	200~300 bp(11)
	AE-10A	665-685	
8	AE-6S	298-316	300~400 bp(/)
	AE-6A	635-652	
9	AE-29S	286-304	~300 bp(9)
	AE-29A	550-567	
10	ZCF02918	434-451	100~200 bp(/)
	ZCF16918	557-574	
11	ZCF03118	436-453	100~200 bp(/)
	ZCF18019	567-585	

扩增片断长度,对于紫草药材降解后的基因组 DNA 也能保证很好的扩增效率,同时还能在琼脂糖凝胶电泳检测时与扩增过程中可能产生的引物二聚体明显区分开。新疆紫草与紫草非药典品经此 4 对引物扩增后,扩增产物存在 9~14 个变异位点,能够明显区分紫草药材正伪品,达到对市场紫草药材进行真伪鉴别的目的。

本研究在 DNA 条形码鉴定和巢式 PCR 技术的基础上,确定了 4 对可以用于有效区分药材市场中主流的新疆紫草和紫草非药典品的特异性引物,为后续紫草药材的鉴定方法与开发奠定了基础,同时为紫草药材的标准提升与补充分子生物学鉴别标准提供了可参考的依据。

参考文献

[1] 郭慧,王谦博,贾力维,等. 中药材 DNA 条形码技术研究进展[J]. 中国药师, 2016, 19(3):566

GUO H, WANG QB, JIA LW, *et al.* Study progress in DNA barcode of traditional Chinese medicine[J]. *China Pharm*, 2016, 19(3):566

[2] 陈士林, 庞晓慧, 姚辉, 等. 中药 DNA 条形码鉴定体系及研究方向[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2011, 13(5):747

CHEN SL, PANG XH, YAO H, *et al.* Identification system and perspective for DNA barcoding traditional Chinese materia medica[J]. *World Sci Technol Mod Tradit Chin Med*, 2011, 13(5):747

[3] 陈士林, 姚辉, 宋经元, 等. 基于 DNA barcoding(条形码)技术的中药材鉴定[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2007, 9(3):7

CHEN SL, YAO H, SONG JY, *et al.* Use of DNA barcoding to identify Chinese medicinal materials[J]. *World Sci Technol Mod Tradit Chin Med Mater Med*, 2007, 9(3):7

[4] LI DZ, LIU JQ, CHEN ZD, *et al.* Plant DNA barcoding in China[J]. *J Syste Evol*, 2011, 49(3):165

[5] LI M, CAO H, BUT PPH, *et al.* Identification of herbal medicinal materials using DNA barcodes[J]. *J Syst Evol*, 2011, 49

- (3):271
- [6] 刘杰, 房文亮, 唐哲, 等. 基于 DNA 条形码和 HRM 技术建立紫草药材的 RFLP - HRM 鉴别方法 [J]. 药物分析杂志, 2022, 42(8):1354
- LIU J, FANG WL, TANG Z, *et al.* RFLP - HRM identification method of *Arnebiae Radix* based on DNA barcoding and high resolution melting [J]. *Chin J Pharm Univ*, 2022, 42(8):1354
- [7] 李谦, 刘杰, 过立农, 等. 基于 ITS2 序列的紫草 PCR - RFLP 鉴别研究 [J]. 药物分析杂志, 2016, 36(9):1611
- LI Q, LIU J, GUO LN, *et al.* Molecular identification of *Arnebiae Radix* by PCR - RFLP Based on ITS2 Sequence [J]. *Chin J Pharm Univ*, 2016, 36(9):1611
- [8] 夏菲, 周江鸿, 车少臣, 等. 黄庐枯萎病菌巢式 PCR 检测方法的建立 [J]. 上海农业学报, 2021, 37(3):47
- XIA F, ZHOU JH, CHE SC, *et al.* Development of a nested PCR detection method for *Verticillium dahlia* causing verticillium wilt of *Cotinus coggygria* [J]. *Acta Agric Shanghai*, 2021, 37(3):47
- [9] 李瑞环, 王伟, 张政鑫, 等. 南洋楹枝枯病皱壳菌的巢式 PCR 快速检测 [J]. 植物病理学报, 2023, 53(6):1192
- LI RH, WANG W, ZHANG ZX, *et al.* Rapid detection of *Rugonectria rugulosa* causing *Falcataria moluccana* dieback disease with a Nested - PCR approach [J]. *Acta Phytopathol Sin*, 2023, 53(6):1192
- [10] 郭銮英, 王妮娜, 李杭远, 等. 蝉携带牛丙型肝炎病毒新亚型巢式 PCR 检测方法的建立 [J]. 畜牧兽医学报, 2022, 53(3):972
- GUO LY, WANG NN, LI HY, *et al.* The development of nested PCR assay for new subtype of Bovine Hepacivirus in ticks [J]. *Chin J Anim Vet Sci*, 2022, 53(3):972
- [11] 敖莉丝, 王伟, 任董董, 等. 南洋楹溃疡病菌巢式 PCR 快速检测 [J]. 热带作物学报, 2020, 41(2):365
- AO LS, WANG W, REN DD, *et al.* Establishment of a nested - PCR detection system of *Lasiodiplodia theobromae* causing *Falcataria moluccana* stem canker disease [J]. *Chin J Trop Crops*, 2020, 41(2):365
- [12] 王素华, 袁淑辉, 吴绍强, 等. 蝉传反刍动物艾立希体巢式 PCR 检测方法的建立及应用 [J]. 中国兽医学报, 2019, 39(2):271
- WANG SH, YUAN SH, WU SQ, *et al.* Establishment and application of a nested PCR method for tick - borne *Ehrlichia ruminantium* detection [J]. *Chin J Vet Sci*, 2019, 39(2):271
- [13] 孙明, 王锦明, 刘爱红, 等. 牛巴贝斯虫巢式 PCR 检测方法的建立 [J]. 中国兽医科学, 2019, 49(2):183
- SUN M, WANG JM, LIU AH, *et al.* Development of a nested PCR assay for detection of *Babesia bovis* [J]. *Vet Sci China*, 2019, 49(2):183
- [14] 孙俊丽, 廖海洪, 张冰, 等. 牙釉质基因巢式 PCR 鉴定猪 ICSI 胚胎性别 [J]. 西南农业学报, 2018, 31(10):2202
- SUN JL, LIAO HH, ZHANG B, *et al.* Sex identification of porcine ICSI embryo by nested amplification of amelogenin gene [J]. *Southwest China J Agric Sci*, 2018, 31(10):2202
- [15] 张琳, 苗广青, 侯学霞, 等. 巢式 PCR 和实时荧光定量 PCR 在莱姆病宿主动物监测中的应用评价 [J]. 中国媒介生物学及控制杂志, 2018, 29(5):425
- ZHANG L, MIAO GQ, HOU XX, *et al.* Evaluation of nested PCR and real - time PCR in host surveillance of Lyme disease [J]. *Chin J Vector Biol Control*, 2018, 29(5):425

(本文于 2023 年 10 月 2 日收到)