

多重位点特异性 PCR 鉴别霍山石斛、铁皮石斛与齿瓣石斛药材

罗宇琴^{1,3}, 蒋超², 袁媛^{2*}, 肖苏萍³, 赵润怀^{3*}, 李戈⁴, 赵玉洋²

(1. 江西中医药大学, 江西 南昌 330004; 2. 道地药材国家重点实验室培育基地, 中国中医科学院中药资源中心, 北京 100700; 3. 中国中药公司, 北京 100195; 4. 中国医学科学院药用植物研究所云南分院, 云南 景洪 666100)

摘要: 为建立同时鉴别霍山石斛、铁皮石斛及齿瓣石斛的多重位点特异性 PCR 法, 解决上述石斛属药材真伪掺杂的难题。通过比对石斛药材 ITS 及 *trnL-trnF* 序列, 设计引物, 建立多重 PCR 鉴别法, 并对不同来源的霍山石斛、铁皮石斛及齿瓣石斛样品进行特异性扩增, 根据特异性条带大小进行鉴别。结果在退火温度为 61 °C、循环数为 35 时, 齿瓣石斛、铁皮石斛和霍山石斛分别可扩出 584、397 和 211 bp 的特异性条带。本文所建立的方法对齿瓣石斛和霍山石斛的最低检测限为 1.2 ng, 铁皮石斛低于 0.24 ng, 其对铁皮石斛、齿瓣石斛和霍山石斛的混伪检出限分别为 1%、1% 和 5%。表明多重位点特异性 PCR 法能特异性鉴别霍山石斛、铁皮石斛及齿瓣石斛。

关键词: 霍山石斛; 铁皮石斛; 齿瓣石斛; 多重位点特异性 PCR; 掺伪鉴别

中图分类号: R931

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2017) 06-0998-09

Identification of *Dendrobium huoshanense*, *Dendrobium officinale* and *Dendrobium devonianum* by multiplex allele-specific polymerase chain reaction

LUO Yu-qin^{1,3}, JIANG Chao², YUAN Yuan^{2*}, XIAO Su-ping³, ZHAO Run-huai^{3*}, LI Ge⁴, ZHAO Yu-yang²

(1. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China; 2. 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; 3. Chinese Traditional Medicine Company of China, Beijing 100195, China; 4. Yunnan Branch of Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences, Jinghong 666100, China)

Abstract: This study was designed to establish a multiplex allele-specific polymerase chain reaction method for simultaneous identification of *Dendrobium huoshanense*, *D. officinale* and *D. devonianum*, which may resolve identification problems of caulis dendrobii. Internal transcribed spacer sequences and *trnL-trnF* sequences of the *Dendrobium* species were aligned by BioEdit software, then specific SNPs of the three species were analyzed for designing allele-specific primers and the multiplex allele-specific PCR reaction system was established. The different origin of *Dendrobium huoshanense*, *D. officinale* and *D. devonianum* was amplified and identified by the sizes of respective band. The results showed that 584 bp, 397 bp and 211 bp bands could be amplified by *D. devonianum*, *Dendrobium officinale* and *Dendrobium huoshanense* respectively, when the annealing temperature was 61 °C and the number of cycles was 35. The limit of detection (LOD) of *D. devonianum* and *D. huoshanense* were both 1.2 ng, while *D. officinale* was low than 0.24 ng. The detection limit of adulterates in *D. devonianum*, *D. devonianum* and *D. huoshanense* mixture sample was 1%, 1% and 5% respectively. This result suggests that the method of multiplex allele-specific PCR is useful to identify *D. huoshanense*, *D. officinale* and *D. devonianum* is accurate and specific.

收稿日期: 2016-12-22; 修回日期: 2017-01-15.

基金项目: 中医药行业科研专项“常用大宗中药材质量现场快速检测技术研究”(201407003); 国家杰出青年科学基金项目(81325023); 北京市科委-中药品质评价关键技术体系与平台建设.

*通讯作者 Tel: 86-10-88468257, E-mail: zhaorunhuai@sina.com; y_yuan0732@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2016-1207

Key words: *Dendrobium huoshanense*; *Dendrobium officinale*; *Dendrobium devonianum*; multiplex allele-specific polymerase chain reaction; admixture identification

石斛类药材作为名贵中药, 药用历史悠久、来源广泛, 掺伪现象极为突出。其中霍山石斛、铁皮石斛和齿瓣石斛因形态结构的相似性, 常相互混伪, 特别是经过炮制加工成枫斗或干条后, 形态特征已破坏, 霍山石斛的“龙头凤尾”、铁皮石斛叶鞘紫斑等特征不显著, 难以从性状上进行区分。市场易见用茎细的铁皮石斛或齿瓣石斛加工品掺杂于霍山石斛枫斗, 或用齿瓣石斛加工品掺杂于铁皮石斛枫斗或干条。虽然目前已有多种石斛的定性鉴别方法, 如基于化学特征的薄层鉴别法等^[1]以及基于分子特征的位点特异性 PCR 法^[2-4]等、PCR-RFLP^[5]、序列测定^[6]或 DNA 条形码技术^[7-9]等, 但只能检测是否存在特定物种的石斛, 未能解决掺伪问题。为进一步完善质量控制体系, 需建立一种能同时鉴别多种石斛的方法, 以解决掺伪检测困难的问题。

多重 PCR 是一种能同时扩增和检测多个目的片段的方法, 能够通过一次 PCR 鉴别多个物种以及是

否存在相应物种的相互掺伪。该法多应用于医学^[10]、遗传学^[11, 12]与食品检测领域, 如对肉类^[13]、鱼类^[14]的掺伪检测。近年来, 多重 PCR 也用于鉴别近缘中药材, 如对三七、人参、西洋参^[15-17]、鱼腥草与百部还魂^[18], 以及多基源药材海龙^[19]的分子鉴别等, 在中药鉴别尤其是掺伪检测中具有广阔的前景。本文旨在建立一种能同时鉴别三种石斛真伪及掺杂的多重位点特异性 PCR 方法, 强化霍山石斛、铁皮石斛、齿瓣石斛等名贵石斛的质量控制体系。

材料与方法

材料 本实验所用材料为野外采集或购自药材基地, 经硅胶干燥保存于中国中医科学院资源中心。实验材料包括 12 个不同种源的霍山石斛原植物 52 批, 霍山石斛干条 19 批, 及霍山枫斗 13 批; 铁皮石斛原植物 95 批、枫斗 3 批、干条 5 批; 齿瓣石斛原植物 22 批 (表 1), 及石斛属其他物种 68 种 (表 2),

Table 1 Sample information of the materials for multiplex allele-specific PCR

No.	Species	Sample size	Collected	Classification	Voucher specimens
1	<i>Dendrobium huoshanense</i>	9	Anhui Huoshan Taipingfan, germplasm 1	Plant	20160729001-20160729009
2	<i>D. huoshanense</i>	3	Anhui Huoshan Taipingfan, germplasm 2	Plant	20160729010-20160729012
3	<i>D. huoshanense</i>	2	Anhui Huoshan Taipingfan, germplasm 3	Plant	20160729013-20160729014
4	<i>D. huoshanense</i>	2	Anhui Huoshan Taipingfan, germplasm 4	plant	20160729015-20160729016
5	<i>D. huoshanense</i>	2	Anhui Huoshan Taipingfan, germplasm 5	Plant	20160729017-20160729018
6	<i>D. huoshanense</i>	3	Anhui Huoshan Taipingfan, germplasm 6	Plant	20160729019-20160729021
7	<i>D. huoshanense</i>	4	Anhui Huoshan Taipingfan, germplasm 7	Plant	20160729022-20160729025
8	<i>D. huoshanense</i>	4	Anhui Huoshan Taipingfan, germplasm 8	Plant	20160729026-20160729029
9	<i>D. huoshanense</i>	6	Anhui Huoshan Heishidu, germplasm 1	Plant	20160729030-20160729035
10	<i>D. huoshanense</i>	6	Anhui Huoshan Hejiafang, germplasm 2	Plant	20160729036-20160729041
11	<i>D. huoshanense</i>	5	Anhui Huoshan Chongkou	Plant	20160729042-20160729046
12	<i>D. huoshanense</i>	6	Anhui Huoshan Heishidu	Plant	20160729047-20160729053
13	<i>D. huoshanense</i>	10	Anhui Huoshan	Dried plant	20141220001-20141220010
14	<i>D. huoshanense</i>	5	Anhui Jinzhai	Dried plant	20150507001-20150507005
15	<i>D. huoshanense</i>	4	Anhui Lu'an	Dried plant	20150817001-20150817004
16	<i>D. huoshanense</i>	4	Anhui Lu'an	Fengdou	20141222001-20141222004
17	<i>D. huoshanense</i>	9	Anhui Huoshan	Fengdou	20141226001-20141226009
18	<i>D. officinale</i>	26	Yunnan	Plant (red stem)	20160629001-20160629026
19	<i>D. officinale</i>	22	Yunnan	Plant (green stem)	20160629027-20160629048
20	<i>D. officinale</i>	22	Zhejiang	Plant	20160625001-20160625022
21	<i>D. officinale</i>	21	Yunnan	Plant (thin stem)	20160305001-20160305021
22	<i>D. officinale</i>	3	Anhui Bozhou	Fengdou	20141220001-20141220003
23	<i>D. officinale</i>	5	Anhui Bozhou	Dried plant	20150720001-20150720005
24	<i>D. officinale</i>	4	Anhui Lu'an	Plant	20160116001-20160116004
25	<i>D. devonianum</i>	19	Yunnan	Plant	20161018001-20161018019
26	<i>D. devonianum</i>	2	Anhui Hefei	Plant	20161003001-20161003002
27	<i>D. devonianum</i>	1	Tibet	Plant	10302

Table 2 Closely related *Dendrobium* species and the GenBank sequence of ITS and *trnL-trnF* used in this paper. Accession numbers were collected from GenBank, based on literatures of Jin XH et al^[9, 20]

No.	Species	Sample size	Collected	Voucher specimens	ITS	<i>trnL-trnF</i>
1	<i>D. chrysotoxum</i>	6	Yunnan	1073101-1073106	KF143443.1	KF143550.1
2	<i>D. nobile</i>	8	Yunnan, Tibet	1143-1146, 1075901-1075904	JN388579.1, KF143493.1, KF143494.1	KP749339.1, KF143600.1, EF397936.1
3	<i>D. fimbriatum</i>	3	Yunnan, Zhejiang	20120127001-20120127003	AF362041.1, JN388588.1	KF143567.1
4	<i>D. aphyllum</i>	7	Yunnan	1076501-1076507	KF143430.1	KF143536.1
5	<i>D. thyrsiflorum</i>	9	Yunnan, Tibet, Laos	1075501-1075507, 13047, 1272	KJ210503.1, HM054758.1	KF143625.1, EF397933.1
6	<i>D. chrysanthum</i>	7	Yunnan, Tibet	118601-1118606, 11430	KF143442.1	KF143549.1
7	<i>D. williamsonii</i>	11	Yunnan, Hainan	908701-908706, 1075401-1075405	HQ114225.1, KJ210508.1, KJ210511.1	EF397930.1
8	<i>D. trigonopus</i>	3	Yunnan	20160614001-20160614003	DQ058793.1, FJ384741.1	KF143626.1, KF143627.1, KF143628.1
9	<i>D. crystallinum</i>	6	Yunnan	20160610001-20160610006	KJ944633.1	KF143553.1
10	<i>D. brymerianum</i>	7	Yunnan	20160618001-20160618007	KF143431.1	KP749355.1, KF143538.1, EF397911.1
11	<i>D. heterocarpum</i>	3	Yunnan	20160608001-20160608003	KF143473.1	KF143579.1
12	<i>D. capillipes</i>	3	Yunnan	20160606001-20160606003	AF362035.1	KF143539.1
13	<i>D. falconeri</i>	4	Yunnan	20160608001-20160608004	KF143458.1	KP749351.1, KF143564.1
14	<i>D. gratiosissimum</i>	3	Yunnan	20160612001-20160612003	KF143464.1, KF143465.1	KP749367.1, KF143570.1, KF143571.1
15	<i>D. wattii</i>	5	Yunnan, Chiang Mai	1181701-1181705	KF143525.1	KF143631.1
16	<i>D. chrystyanum</i>	2	Yunnan	20160620001-20160620002		KP749350.1
17	<i>D. sinominutiflorum</i>	5	Yunnan	20160622001-20160622005		KF143593.1, KF143594.1
18	<i>D. primulium</i>	3	Yunnan	1179301-1179303	KF143499.1	KP749352.1, KF143605.1, EF397929.1
19	<i>D. pendulum</i>	3	Yunnan	806401-806403	KF143496.1, KF143498.1	KP749359.1, KF143602.1, KF143603.1
20	<i>D. aurantiacum</i> var. <i>denneanum</i>	5	Yunnan	1101101-1101105	AF362043.1	KF143554.1, KF143555.1, KF143556.1, EF397918.1, KP749353.1
21	<i>D. moniliforme</i>	18	Yunnan, Anhui	20160118001-20160118018	KF143489.1, KF143490.1, KF143491.1, KJ210474.1, KJ210475.1	KF143595.1, KF143597.1, KF143596.1, EF397935.1
22	<i>D. henanense</i>	2	Guizhou	923501-923502	KJ672624.1	KF143575.1
23	<i>D. wilsonii</i>	1	Chongqing	9978	KF143526.1	KF143632.1
24	<i>D. clavatum</i>	3	Yunnan	1036301-1036303	HM590387.1	KC522832.1
25	<i>D. hookerianum</i>	3	Yunnan, Tibet	1137, 9102, 10367	KF143474.1, KF143475.1	KF143580.1, KF143581.1
26	<i>D. lohoense</i>	1	Guangxi	9769		KF143588.1
27	<i>D. henryi</i>	3	Yunnan	990, 11048, 11822	KF143470.1	KF143576.1
28	<i>D. crepidatum</i>	6	Yunnan	1084301-1084306	KF143445.1	KP749356.1, KF143552.1
29	<i>D. harveyanum</i>	3	Yunnan	1070301-1070302, 10760	KF143468.1	KP749363.1, KC568316.1, KF143574.1
30	<i>D. hancockii</i>	2		1349201-1349202	KF143467.1	KF143573.1
31	<i>D. hercoglossum</i>	1	Hainan	10109	KF143471.1	KP749344.1, KP749343.1, KP749342.1, KF143577.1, KF143578.1, EF397938.1
32	<i>D. densiflorum</i>	7	Hainan, Tibet	1010801-1010807	KJ210435.1-KJ210439.1	KP749360.1, KF143557.1
33	<i>D. longicornu</i>	12	Yunnan, Tibet	76, 134701-134705, 9517, 8312, 11555, 11663, 12038	KJ210462.1-KJ210472.1, AB847661.1	KJ686625.1, KF143589.1, KF143590.1, KF143591.1
34	<i>D. salaccense</i>	2	Hainan	928401-928402	AF362026.1	KF143612.1, KF143613.1
35	<i>D. strongylanthum</i>	8	Yunnan, Tibet	9499, 8510, 8532, 1165901-1165905	KJ210499.1-KJ210502.1, KF143514.1, KF143515.1	KP749362.1, KC568309.1
36	<i>D. aduncum</i>	5	Hainan, Zhejiang	952201-952205	KJ210409.1-KJ210410.1	KC568307.1, KF143534.1
37	<i>D. monticola</i>	1	Tibet	7033	KF143500.1	KF143606.1
38	<i>D. jenkinsii</i>	2	Yunnan	1070901-1070902	KF143478.1, KF143479.1	KC568314.1, KF143584.1, KF143585.1
39	<i>D. menglaensis</i>	1	Yunnan	10464	KF143486.1	KF143592.1

Continued

No.	Species	Sample size	Collected	Voucher specimens	ITS	<i>trnL-trnF</i>
40	<i>D. exile</i>	6	Yunnan	1070801-1070806	KF143457.1	KF143562.1, KF143563.1
41	<i>D. porphyrochilum</i>	4	Yunnan	1188001-1188004	KF143501.1	KF143606.1, KF143607.1
42	<i>D. sinense</i>	6	Hainan	9329, 1031301-1031305	KF143510.1, KF143511.1	KF143616.1, KF143617.1
43	<i>D. bellatulum</i>	4	Yunnan	5699, 1083701-1081703	KF143430.1	KF143593.1, KF143537.1
44	<i>D. spatella</i>	2	Yunnan	10742	KF143512.1	KF143618.1, KF143619.1
45	<i>D. stuposum</i>	1		7023	KF143516.1	KF143622.1
46	<i>D. wangliangii</i>	2	Yunnan	20100710001-20100710002	KJ210506.1	KF143630.1
47	<i>D. xichouense</i>	1		2.0111E+10	KF143527.1	KC568323.1
48	<i>D. lindleyi</i>	1			JN388568.1	KC56319
49	<i>D. fangjingshensis</i>	4	Yunnan	1010201-1010204	KF143459.1	KF143565.1, KF143566.1
50	<i>D. sulcatum</i>	1	Chiang Mai	11879	KF143517.1	KF143623.1
51	<i>D. moschatum</i>	1	Chiang Mai	11886	KF143492.1	KF143598.1
52	<i>D. ellipsophyllum</i>	1	Laos	20120123001	AF362033.1	KC568310.1, KF143561.1
53	<i>D. senile</i>	1	Vientiane	20120125001	KF143509.1	KF143615.1
54	<i>D. catenatum</i>	2	Zhelin	20120223001-20120223002	KF143438.1, KF143439.1	KF143543.1, KF143544.1, KF143545.1, KF143546.1, KF143540.1, KF143541.1, KF143542.1
55	<i>D. cariniferum</i>	1	Laos	13012	KF143433.1	KF143543.1, KF143544.1, KF143545.1, KF143546.1, KF143540.1, KF143541.1, KF143542.1
56	<i>D. wardianum</i>	1	Yunnan	13011	JN388600.1	EF397931.1
57	<i>D. guangxiense</i>	1		13569	KF143508.1	KF143614.1
58	<i>D. loddigesii</i>	1			KF143481.1	KP749349.1, KP749348.1, KF143587.1
59	<i>D. okinaense</i>	1	Taipei			KF1433601.1
60	<i>D. hainanensis</i>	1	Hainan	10113	KF143466.1	KF143572.1
61	<i>D. transparentis</i>	2	Nepal	11046	KF143520.1	KF143626.1
62	<i>D. compactum</i>	1	Yunnan	11849	KF143444.1	KF143551.1
63	<i>D. findleyanum</i>	1	Thailand	11875	KF143462.1	KP749361.1, KC568312.1, KF143568.1
64	<i>D. pseudotenellum</i>	1		13500	KF143502.1	KF143608.1
65	<i>D. zhaojuense</i>	1		20121015001		
66	<i>D. unicum</i>	1		13541	KF143523.1	KF143629.1
67	<i>D. dixanthum</i>	3	Udumthai, Laos	13017, 1305401-1305402	GU339103.1	KF143560.1
68	<i>D. christyanum</i>	2		20101009001-20101009002	GU339106.1	KF143547.1, KF143548.1

分别由中国科学院植物研究所金效华副研究员、安徽中医药大学俞年军教授、中国医学科学院药用植物研究所云南分院李戈研究员鉴定。

试剂 rTaq DNA 聚合酶、Ex Taq DNA 聚合酶、DL2000 DNA Marker 购自 Takara 公司; FastTaq DNA 聚合酶、2× EasyTaq PCR SuperMix 购自 TransGen 公司。

仪器 微量分光光度计 (Nanodrop 2000, Thermo Scientific 公司); PCR 仪: Veriti PCR 仪 (Applied Biosystems), GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems), TC-512 (TECHNE Co. Limited)。

鉴别标记获得与引物设计 以 Jin 等^[19, 20]对亚洲大陆石斛属 184 个物种 ITS、*matK*、*rbcL*、*trnH-psbA* 序列分析为基础, 利用 BioEdit 软件对 GenBank 数据库中石斛属所有物种的 ITS、*matK*、*rbcL*、*trnH-psbA*、

trnL-trnF、*trnK* 序列进行同源对齐, 校对后分析铁皮石斛、霍山石斛、齿瓣石斛的特异性 SNP 位点, 利用 Primer Premier 5.0 软件分别设计其特异性鉴别引物, 使用 Oligo 6 软件分析引物间聚合情况, 以避免可能产生的发夹结构、引物二聚体或错误引发, 并着重考虑多重 PCR 反应对退火温度一致性的要求。设计的霍山石斛、铁皮石斛及齿瓣石斛的特异性鉴别引物序列见表 3, 由生工生物工程 (上海) 有限公司合成。

DNA 提取 取干燥的石斛样品 0.5 g, 使用球磨粉碎机粉碎至能过五号筛。取枫斗粉末 50 mg 或干燥的原植物粉末 20 mg, 使用不同 DNA 提取方法 (CTAB 法^[21]、两步 CTAB 法^[22]、不同预处理 (10% PEG 6000、10% 甘油及 5% 甘油^[23, 24]) 后再经改良 CTAB 法提取总 DNA, 使用微量分光光度计测定 DNA 浓度, 并记录其 A_{260}/A_{280} 及 A_{260}/A_{230} 值, 寻找适

Table 3 Primer pairs sequence, T_m and the length of amplified products for multiplex allele-specific PCR used in this study

Species	Primer	Sequence (5'–3')	$T_m/^\circ\text{C}$	Length/bp
<i>D. huoshanense</i>	HSAS-F	TGATTGGATTGAGCCTTG	52.5	211
	HSAS-R	GTTTTAGCTACTAACGTAACAC	49.0	
<i>D. officinale</i>	TPAS-F	CTGCTGAGATAAAATCCACCG	57.6	397
	TPAS-R	ATGCACATCCGAGCCTTAAT	57.3	
<i>D. devonianum</i>	CBAS-F	TGCTGCCGAAATAAAATCTATC	55.2	584
	CBAS-R	ATTCAAAACGTCATCTAAGGACG	55.2	

合的 DNA 提取方法提取总 DNA, 调整浓度至 $30 \text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, 用于 PCR 扩增或于 -20°C 下保存。

多重 PCR 扩增及电泳 霍山石斛、铁皮石斛、齿瓣石斛的多重特异性 PCR 鉴别反应在 $200 \mu\text{L}$ 的 PCR 管中进行, 总反应体系 $25 \mu\text{L}$: $10\times$ PCR Buffer $2.5 \mu\text{L}$, dNTPs 混合液 ($10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) $1 \mu\text{L}$, 霍山石斛上下游引物各 ($10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) $0.4 \mu\text{L}$, 铁皮石斛上下游引物各 ($10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) $0.1 \mu\text{L}$, 齿瓣石斛上下游引物各 ($10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) $0.2 \mu\text{L}$, r Taq 酶 ($5 \text{ U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) $0.3 \mu\text{L}$, DNA 模板 ($10\sim 50 \text{ ng}$) $1 \mu\text{L}$, 其余加灭菌水 $19.8 \mu\text{L}$, 将反应液振荡混匀, 瞬时离心。将反应混合体系置 PCR 仪上。其扩增程序为: 95°C 预变性 5 min ; 95°C 变性 10 s , 61°C 退火 20 s , 72°C 延伸 20 s , 共 35 个循环; 最后 72°C 延伸 3 min 。待 PCR 扩增反应结束后, 向反应体系加 $6 \mu\text{L}$ $6\times$ loading buffer, 混匀, 取混合产物 $8 \mu\text{L}$ 点样于 1.5% 的琼脂糖凝胶上, 于 200 V 电压的条件下电泳 $8\sim 10 \text{ min}$, 经 EB 显色, 最后于凝胶成像仪观察记录结果。

条件优化 在确定单对引物对相应石斛药材的特异性 PCR 条件后, 对可能影响多重 PCR 鉴别准确性和稳定性的主要条件进行考察, 包括退火温度 (58°C 、 59°C 、 60°C 、 61°C)、循环数 (31、33、35、37)、DNA 聚合酶种类 (rTaq、Ex Taq、Fast Taq、Easy Taq Mix)、PCR 仪种类 (Veriti、9700、TC-512) 和三种石斛鉴别引物的比例 (齿瓣石斛上下游引物各 $0.2 \mu\text{L}$ 、铁皮石斛引物各 $0.1 \mu\text{L}$) 等。

检测限及掺伪检出限 随机选取霍山石斛、铁皮石斛、齿瓣石斛 DNA 样品各 2 个, 使用微量分光光

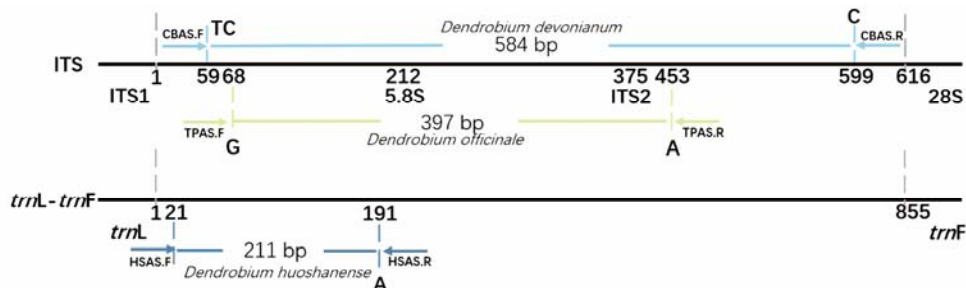
度计测定总 DNA 浓度, 调整浓度获得 DNA 浓度为 30 、 6 、 1.2 和 $0.24 \text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 的系列样品, 使用经优化的反应体系和 PCR 程序进行多重特异性 PCR, 以测定对 3 种石斛的检测限。

另取霍山石斛、铁皮石斛、齿瓣石斛样品粉末各 0.5 g , 取齿瓣石斛粉末, 以 1%、2%、5%、10%、20%、50%、100% 的比例与余下两种石斛粉末充分混匀, 使用上述方法提取 DNA 并进行 PCR 扩增, 以检测所建立的多重特异性 PCR 方法对铁皮石斛、霍山石斛中掺杂齿瓣石斛的检出限; 使用对应的方式, 分别检测铁皮石斛和霍山石斛的检出限。

结果与分析

1 引物设计

对石斛属不同物种 ITS、*matK*、*rbcL*、*trnH-psbA*、*trnL-trnF*、*trnK* 序列的分析结果表明, 石斛属 ITS 序列上存在铁皮石斛和齿瓣石斛的特异性 SNP 位点, 齿瓣石斛 ITS 序列第 58 位和 59 位为 T 和 C, 其他石斛为 C 和 T, 齿瓣石斛 ITS 序列第 599 位为 C, 其他石斛为 A 或 G; 铁皮石斛序列第 68 位和第 453 位分别为 G 和 A, 其他石斛为 C 和 G。*trnL-trnF* 序列上存在霍山石斛特异性 SNP 位点, 序列第 191 位霍山石斛为 A, 其他石斛均为 G, 依据这些位点设计分别设计 3 种石斛的特异性 PCR 引物, 并使其长度具有区别, 预期经 PCR 扩增后, 霍山石斛、铁皮石斛和齿瓣石斛分别获得 211、397 和 584 bp 大小的条带。引物设计见图 1。

**Figure 1** The design of specific primers for the three species

2 DNA 提取的比较

石斛类材料, 尤其是枫斗和干条多糖含量高, 经炮制处理后 DNA 降解严重。使用改良 CTAB 法、两步 CTAB 法或不同预处理 (10% PEG 6000、10% 甘油及 5% 甘油) 后再经由改良 CTAB 法提取石斛 DNA, 结果表明, 两步 CTAB 法提取的 DNA 浓度和 A_{260}/A_{230} 均优于其他方法, DNA 呈水状, 不黏稠 (表 4)。使用特异性引物进行 PCR, 仅两步 CTAB 法提取的 DNA 能在所有测试的样本中扩出相应条带。

3 单重 PCR 反应

我国石斛属有 74 种和 2 变种, 为考察霍山、铁皮、齿瓣石斛鉴别引物的特异性, 随机选取霍山石斛、铁皮石斛、齿瓣石斛各 4 个, 及其他 66 种石斛属物种进行特异性扩增, 结果在退火温度分别为 60~61 °C 时, 齿瓣石斛 (图 2A)、铁皮石斛 (图 2B)、霍山石斛 (图 2C) 均出现特异性条带。

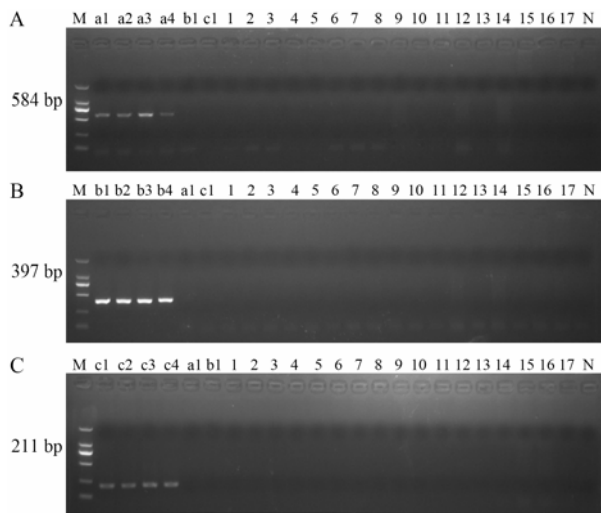


Figure 2 Simplex allele-specific PCR for the identification of the three species. M: DL2000 Marker; a1-a4: *D. devonianum*; b1-b4: *D. officinale*; c1-c4: *D. huoshanense*; 1-3: *D. chrysotoxum*; 4, 5: *D. nobile*; 6, 7: *D. aphyllum*; 8: *D. thyrsiflorum*; 9: *D. chrysanthum*; 10: *D. williamsonii*; 11-13: *D. strongylanthum*; 14, 15: *D. crystallinum*; 16: *D. brymerianum*; 17: *D. heterocarpaceae*; N: No template control (ddH₂O as template)

4 霍山石斛、铁皮石斛、齿瓣石斛多重特异性 PCR 鉴别体系的建立

取霍山石斛、铁皮石斛、齿瓣石斛 DNA, 在 PCR 反应中同时加入 3 种石斛的特异性引物进行多重位点特异性 PCR 反应, 当多重 PCR 的退火温度为 61 °C 时, 霍山石斛、铁皮石斛和齿瓣石斛分别出现 211、397 和 584 bp 大小的条带。在此基础上, 为明确 PCR 体系和 PCR 程序对多重位点特异性 PCR 的影响, 对退火温度、循环数、DNA 聚合酶种类、PCR 仪种类以及石斛鉴别引物的比例进行考察。

4.1 最适退火温度的确定 退火温度直接影响 PCR 鉴别的准确性, 当退火温度分别为 58 °C 和 59 °C 时, 齿瓣石斛出现了 211 bp (霍山石斛鉴别条带) 和 397 bp (铁皮石斛鉴别条带) 的假阳性条带, 霍山石斛出现 397 bp 的假阳性条带, 而退火温度 60 °C 和 61 °C 时, 3 种石斛均无假阳性和非特异性条带出现, 确定退火温度为 61 °C。

4.2 最适循环数的确定 当循环数为 31~37 循环时均无非特异性扩增和假阳性条带出现, 但 35 和 37 循环条带较亮, 由于原植物、干条和枫斗中所含 DNA 的质量不同, 降解程度和提取难度不一, 可以根据材料的来源确定循环次数, 对新鲜样品或原植物, 可用 33 个循环进行检测, 对枫斗或干条, 需适当提高循环数至 35 或 37。

4.3 Taq DNA 聚合酶对鉴别结果的影响 不同 Taq 酶因其聚合酶活性和 3'-5'外切酶活性不同可能导致假阴性或假阳性结果。分别使用 rTaq、Ex Taq、Fast Taq 和 Easy Taq Mix 进行多重特异性 PCR, 结果表明, 使用 Ex Taq DNA 聚合酶和 Fast Taq DNA 聚合酶时齿瓣石斛出现了 211 bp 和 397 bp 的假阳性条带, 霍山石斛出现 397 bp 的假阳性条带, 而使用无 3'-5'外切酶活性的 rTaq 或 Easy Taq Mix 时无假阳性条带出现, 故选择 rTaq DNA 聚合酶进行后续实验。

4.4 PCR 仪对鉴别结果的影响 使用 4 种不同品牌型号的 PCR 仪进行多重特异性 PCR 鉴别, 结果使用

Table 4 DNA extracted result by using different isolation or pre-treated methods ($n=10$). a: Fengdou samples; b: Dried plant samples

Methods	DNA concentration/ng·L ⁻¹	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}	DNA solution
Two-step CTAB ^a	56.95 ± 18.18	1.93 ± 0.06	1.25 ± 0.21	Water-like
Two-step CTAB ^b	136.89 ± 63.44	1.98 ± 0.04	1.86 ± 0.19	Water-like
Modified CTAB ^a	18.66 ± 19.34	1.71 ± 0.34	0.59 ± 0.28	Exist white sediment
Modified CTAB ^b	90.23 ± 31.20	1.82 ± 0.04	1.09 ± 0.14	Sticky
PEG6000 ^a	20.60 ± 16.11	1.83 ± 0.17	0.83 ± 0.47	Water-like
5% Glycerol ^a	35.00 ± 27.43	1.94 ± 0.04	0.98 ± 0.20	Sticky
10% Glycerol ^a	16.13 ± 18.02	1.89 ± 0.16	0.92 ± 0.68	Sticky

不同的 PCR 仪时, 霍山石斛、铁皮石斛和齿瓣石斛分别出现 211、397 和 584 bp 大小的条带, 虽不同仪器的条带亮度有差异, 但并不影响扩增结果。

4.5 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, 以齿瓣石斛上下游引物各 0.2 μL、铁皮石斛引物各 0.1 μL 为基础, 分别考察霍山石斛引物用量为 0.2、0.3、0.4、0.5 μL 时对石斛多重特异性鉴别结果的影响, 结果发现, 0.4 及 0.5 μL 条带亮度最大, 且无假阳性条带出现, 确定霍山石斛上下游引物量为 0.4 μL; 在此基础上考察铁皮石斛用量分别为 0.05、0.1、0.15、0.2 μL 的影响, 结果 0.1 μL 引物时铁皮石斛电泳条带亮度大且无假阳性条带出现。在此基础上同法考察齿瓣石斛用量为 0.15、0.2、0.25、0.3 μL, 结果 0.2 μL 引物时条带亮度大, 最终确定引物量配比为齿瓣: 铁皮: 霍山 = 0.2 μL : 0.1 μL : 0.4 μL。

5 多重位点特异性 PCR 法的检测限及掺杂检出限

使用建立的石斛多重位点特异性鉴别方法, 对不同浓度的霍山石斛、铁皮石斛、齿瓣石斛进行 PCR 反应以测定对 3 种石斛的检测限。结果 PCR 体系中齿瓣石斛和霍山石斛在 1.2 ng 以上时能出现特异性鉴别条带, 而铁皮石斛 DNA 模板浓度低于 0.24 ng 时仍能见到清晰的特异性鉴别条带, 可推定所建立的石斛多重位点特异性 PCR 鉴别方法对齿瓣石斛和霍山石斛的检测下限为 1.2 ng, 对铁皮石斛的检测下限低于 0.24 ng 如图 3。

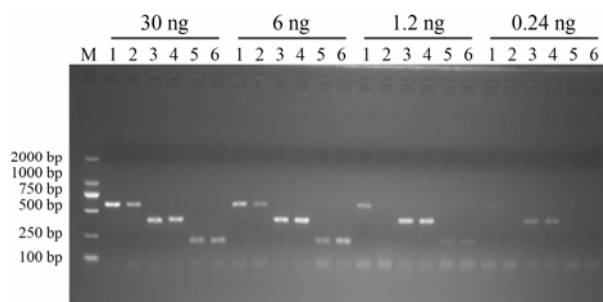


Figure 3 The limit of detection of the three species by multiplex allele-specific PCR. M: DL2000 Marker; 1, 2: *D. devonianum*; 3, 4: *D. officinale*; 5, 6: *D. huoshanense*

以不同比例混合霍山石斛、铁皮石斛和齿瓣石斛, 提取其 DNA 并进行多重位点特异性 PCR 反应以检测建立的方法对掺伪的检出效果。结果表明样品中混入 1% 以上的齿瓣石斛、1% 以上的铁皮石斛或 5% 以上的霍山石斛时即可检出, 其对铁皮石斛、齿瓣石斛和霍山石斛的检出限分别为 1%、1% 和 5%。如图 4。

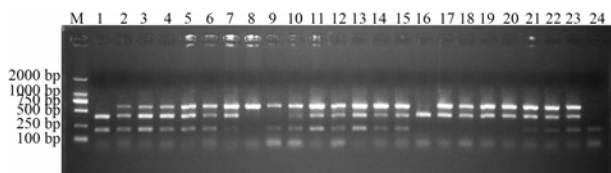


Figure 4 The detection limit of one mixed with other two species by multiplex allele-specific PCR. 1–8 for the different proportion of *D. devonianum* of 0, 1%, 2%, 5%, 10%, 20%, 50%, 100%, respectively; 9–16 for the different proportion of *D. officinale* of 0, 1%, 2%, 5%, 10%, 20%, 50%, 100%, respectively; 17–24 for the different proportion of *D. huoshanense* of 0, 1%, 2%, 5%, 10%, 20%, 50%, 100%, respectively

6 适用性考察

为防止出现假阳性, 随机选取霍山石斛、铁皮石斛、齿瓣石斛及其他 68 种石斛属物种各 1 个, 使用建立的多重位点特异性 PCR 进行扩增, 结果除霍山石斛、铁皮石斛、齿瓣石斛各自出现特异性条带外, 其他石斛均无扩增, 表明建立的方法具有特异性。在此基础上, 对来自于云南、安徽的 22 批齿瓣石斛, 来自于安徽、云南、浙江的 103 批铁皮石斛样品和来源于安徽霍山不同产地的 52 批霍山石斛原植物、19 批霍山干条和 13 批霍山石斛枫斗样品进行多重位点特异性 PCR 扩增, 结果霍山石斛原植物、干条均扩增获得 211 bp 的特异性条带, 枫斗 10 批获得 211 bp 的特异性条带, 铁皮石斛均获得 397 bp 的特异性条带, 齿瓣石斛获得 584 bp 的特异性条带, 无假阳性和假阴性结果出现, 见图 5。

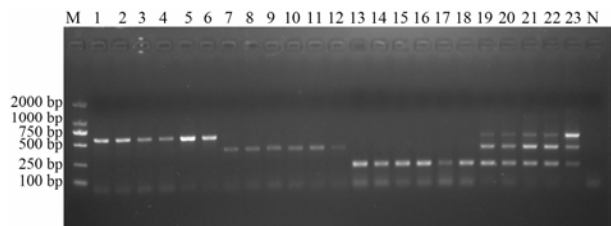


Figure 5 The applicability of multiple allele-specific PCR for identification of the three species. M: DL2000 Marker; 1–6: *D. devonianum*; 7–12: *D. officinale*; 13–18: *D. huoshanense*; 19–23: the mixture of the three species; N: No template control (ddH₂O as template)

讨论

DNA 提取一直是石斛类药材分子鉴定的难点, 特别是干条及枫斗类药材, 受高温影响其 DNA 降解严重^[25]。并且石斛类药材多糖含量较高, 提取的总 DNA 质量低下, 严重影响 PCR 扩增, 需预先除去部分多糖。本研究比较了不同 DNA 提取方法对石斛类提取效果, 结果发现仅两步 CTAB 法能有效提取

石斛枫斗和干条总 DNA。与其他植物相比, CTAB 法提取的石斛类材料总 DNA 的 A_{260}/A_{230} 值显著偏低 (0.59 ± 0.28), 表明可能存在严重的多糖、多酚残留。虽然经甘油或 PEG 6000 前处理后, CTAB 提取效果有所提高, 但对枫斗类样品提高效果不明显, DNA 浓度低 (表 4)。而两步 CTAB 法显著提高了 DNA 得率和 A_{260}/A_{230} 值, 推测是预处理时的沉淀步骤有利于水溶性多糖的溶出与总 DNA 的沉淀^[22]。

本研究建立的多重 PCR 法鉴别铁皮石斛、齿瓣石斛和霍山石斛时, 对霍山石斛中掺杂铁皮石斛或齿瓣石斛检出限较高, 而对其他两种石斛中掺杂霍山石斛检出限较低, 可能与铁皮石斛糖分含量高, DNA 提取更为困难有关。由于常见情况为霍山石斛中掺杂铁皮石斛或齿瓣石斛, 及铁皮石斛中掺杂齿瓣石斛, 对此二种情况, 本研究建立的多重特异性 PCR 方法检出率均可达到 1%, 能有效的控制石斛掺伪现象。近缘中药尤其是多基原中药往往形态相似, 化学成分不明确, 性状质量标准不具有足够的物种特异性, 通过多重 PCR 法能一次检测多个基原, 从而控制药材掺伪问题, 进一步为质量控制提供了新思路。除本文涉及的三种名贵石斛外, 目前市场上常见枫斗类药材还包括细茎石斛、金钗石斛、兜唇石斛、流苏石斛、晶鞘石斛等 10 余种。由于多重 PCR 的共显性特点, 在后期的研究中, 可通过设计相应的物种特异性引物, 建立更高重数的多重位点特异性 PCR, 达到一次 PCR 即可鉴别市场上主流枫斗类药材基源及掺伪的目的。

致谢: 中国科学院植物研究所金效华副研究员对本研究中样品采集和标本鉴定提供了帮助!

References

- [1] Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典) [S]. 2015 ed. Part 1. Beijing: China Medical Science Press, 2015: 92-93.
- [2] Ding G, Zhang D, Feng Z, et al. SNP, ARMS and SSH authentication of medicinal *Dendrobium officinale* Kimura et Migo and application for identification of Fengdou drugs [J]. Biol Pharm Bull, 2008, 31: 553-557.
- [3] Liu SQ, Li XJ, Yu QB, et al. Allele-specific diagnostic PCR authentication of *Dendrobium huoshanense* and its allied species of *Dendrobium* Sw. [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2006, 1: 111-115.
- [4] Ding X, Xu L, Wang Z, et al. Allele-specific diagnostic PCR authentication of *D. devonianum* from other *Dendrobium* species [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 2001, 37: 897-901.
- [5] Zhang T, Xu LS, Wang ZT, et al. Molecular identification of medicinal plants: *Dendrobium chrysanthum*, *Dendrobium fimbriatum* and their morphologically allied species by PCR-RFLP analyses [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 2005, 40: 728-733.
- [6] Liu J, He T, Chun Z. Analysis and authentication of chloroplast matK gene sequences of Herba Dendrobii [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 2009, 44: 1051-1055.
- [7] Shao SG, Han L, Ma YH, et al. Analysis and authentication of cpDNA *psbA-trnH* regions of *Dendrobium* species of fengdous [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 2009, 44: 1173-1178.
- [8] Geng LX, Zheng R, Ren J, et al. Application of new type combined fragments: nrDNA ITS+ *nad 1-intron 2* for identification of *Dendrobium* species of Fengdous [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 2015, 50: 1060-1067.
- [9] Xu S, Li D, Li J, et al. Evaluation of the DNA barcodes in *Dendrobium* (Orchidaceae) from mainland Asia [J]. PLoS One, 2015, 10: e0115168.
- [10] Vallone PM, Just RS. A multiplex allele-specific primer extension assay for forensically informative SNPs distributed throughout the mitochondrial genome [J]. Int J Legal Med, 2004, 118: 147-157.
- [11] Li DY, Xue DJ, Li JF, et al. Simultaneous identification of Ty-3, I-2 and Mi gene by multiplex PCR and its application on tomato [J]. J Northeast Agric Univ (东北农业科学), 2016, 41: 39-43.
- [12] Chen MJ, Liu Y, Tu ZM, et al. Rapid confirmation of the transgenic wheat lines by multiplex polymerase chain reaction (MPCR) [J]. J Huazhong Univ Sci Tech (华中科技大学学报), 2004, 32: 105-107.
- [13] Ali ME, Razzak MA, Hamid SBA, et al. Multiplex PCR assay for the detection of five meat species forbidden in Islamic foods [J]. Food Chem, 2015, 177: 214-224.
- [14] Catanese G, Machado M, Fernández-Trujillo A, et al. A multiplex-PCR assay for the authentication of mackerels of the genus *Scomber* in processed fish products [J]. Food Chem, 2010, 122: 319-326.
- [15] Liu L, Xiao BY, Luo HM, et al. Identification of *Panax ginseng*, *Panax quinquefolium* and *Panax notoginseng* by multiplex PCR assay [J]. Chin J Pharm Anal (药物分析杂志), 2016, 36: 668-677.
- [16] Cui GH, Tang XJ, Huang LQ. Application of multiplex allele-specific PCR for authentication of *Panax ginseng* and

- P. quinquefolius* [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2006, 31: 1940–1943.
- [17] Jiang C, Luo YQ, Yuan Y. Identification of *Panax ginseng*, *Panax notoginseng* and *Panax quinquefolius* admixture by multiplex allele-specific polymerase chain reaction [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2017, 42: 1319–1324.
- [18] Wei YC, Yuan Y, Chen JX, et al. Rapid PCR identification of *Houttuynia cordata* and *Gymnothea chinensis* [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2016, 12: 2163–2166.
- [19] Gao LH, Yin Y, Li J, et al. Identification of traditional Chinese medicinal pipefish and exclusion of common adulterants by multiplex PCR based on 12S sequences of specific alleles [J]. Mitochondrial DNA Part A, 2017. DOI: 10.1080/24701394.2016.1278538.
- [20] Xiang XG, Schuiteman A, Li DZ, et al. Molecular systematics of *Dendrobium* (Orchidaceae, Dendrobieae) from mainland Asia based on plastid and nuclear sequences [J]. Mol Phylogenet Evol, 2013, 69: 950–960.
- [21] Chen KS, Li F, Xu CJ, et al. An efficient macro-method of genomic DNA isolation from *Actindia chinensis* leaves [J]. Hereditas (遗传), 2004, 26: 529–531.
- [22] Dong XM, Jiang C, Zha LP, et al. Study on identification of *Dendrobium officinale* and related species by bidirectional PCR amplification of mismatched and specific alleles [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2017, 42: 896–901.
- [23] Li JL, Wang S, Yu J, et al. A modified CTAB protocol for plant DNA extraction [J]. Chin Bull Bot (植物学报), 2013, 48: 72–78.
- [24] Chen LY, Song MS, Zha HG, et al. A modified protocol for plant genome DNA extraction [J]. Plant Divers Resour (植物分类与资源学报), 2014, 36: 375–380.
- [25] Sze SCW, Zhang KYB, Shaw PC, et al. A DNA microarray for differentiation of the Chinese medicinal herb *Dendrobium officinale* (Fengdou Shihu) by its 5 S ribosomal DNA intergenic spacer region [J]. Biotechnol Appl Biochem, 2008, 49: 149–154.