

# 应用直接 PCR 技术的药用植物批量样本快速处理及分子鉴定

张金家, 徐红, 赵淑娟\*

(上海中医药大学中药研究所, 国家中医药管理局中药新资源与品质评价重点研究室,  
中药标准化教育部重点实验室, 上海市复方中药重点实验室, 上海 201203)

**摘要:** 直接 PCR 技术以微量样品快速裂解产物中 DNA 为模板, 实现对目的基因的有效扩增。基于此, 本文随机采集 80 种药用植物不同部位组织材料, 以 ITS 序列为目的基因, 用直接 PCR 技术进行扩增。通过反应体系优化, 得到 80 个样品的全部 ITS 片段, 扩增成功率为 100%。对扩增片段测序并做 Blast 分析, 与同种属植物 ITS 序列同源性为 96%~100%。该方法避免了繁琐的 DNA 提取过程, 只需取微量植物组织为起始材料, 在保证结果准确、稳定的同时, 提高了工作效率, 为基于 DNA 条形码的药用植物批量样本的快速处理及分子鉴定提供了新的技术思路。

**关键词:** 直接 PCR 技术; ITS; DNA 条形码; 药用植物; 分子鉴定

中图分类号: R931

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2017) 11-1763-07

## Rapid identification of medicinal herbs through plant Direct-PCR

ZHAGN Jin-jia, XU Hong, ZHAO Shu-juan\*

(The SATCM Key Laboratory for New Resources & Quality Evaluation of Chinese Medicine, The MOE Key Laboratory for Standardization of Chinese Medicines and Shanghai Key Laboratory of Compound Chinese Medicines, Institute of Chinese Materia Medica, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China)

**Abstract:** Direct-PCR technology was using a 15 minutes heat-lysis step instead of DNA extraction to get DNA templates with small amount of plant materials followed by sensitive PCR process to amplify target genes. In order to facilitate DNA barcoding in medicinal herb identification with Direct-PCR, we collected different tissues from 80 medicinal plants as material to amplify the ITS fragments. Through optimizing the PCR reaction, ITS of 80 plant samples was all successfully amplified. PCR products were sequenced and to do Blast analysis. These results suggest that Direct-PCR would improve the efficiency of DNA barcoding in the application of medicinal herb molecular authentication.

**Key words:** Direct-PCR technology; ITS; DNA barcoding; medicinal plant; molecular authentication

以 ITS 为核心序列的 DNA 条形码技术为药用植物的分子鉴定提供了便利。DNA 条形码技术流程通常包括样品处理、样品 DNA 提取、PCR 扩增、DNA 测序、序列拼接、鉴定分析六个环节<sup>[1]</sup>。由于药用植

物种类繁多, 不同组织器官中通常含有多糖、脂类、色素、酚类等次生代谢产物, 严重影响 DNA 提取质量和产量, 进而影响 PCR 扩增结果。因此, 获取高质量的样品 DNA 被认为是 DNA 条形码技术的必要前提和关键环节<sup>[2]</sup>。

Luo 等<sup>[2]</sup>以含糖较多的麦冬药材为对象, 对比了 5 种常用植物 DNA 提取方法, 筛选出试剂盒法和改良的 CTAB 法为佳, 其中改良的 CTAB 法相对最为经济有效, 以该方法提取的 10 种不同中药材 DNA,

收稿日期: 2017-05-03; 修回日期: 2017-07-05.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81673540); 上海市自然科学基金资助项目 (16ZR1434100).

\*通讯作者 Tel: 86-21-51322576, E-mail: zhaoshujuan@126.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2017-0426

ITS 序列 PCR 扩增成功率为 90%。无论是试剂盒法还是改良的 CTAB 法, 均需对材料进行破碎或研磨, 然后经过组织裂解、萃取、RNA 去除、沉淀或吸附 DNA 等步骤, 单个样品 DNA 制备需要约 1 h 才能完成。由此可见, DNA 提取是 DNA 条形码技术中工作量最多、人工耗时最长的环节, 特别是样品量较多时, 这一环节工作尤为繁重, 成为限制分子鉴定的主要因素。

直接 PCR 技术通过对微量组织样品的裂解物为 DNA 模板, 借助于灵敏且抗干扰能力强的 TaqDNA 聚合酶进行 PCR 扩增, 避免了传统 DNA 提取方法

的大量繁琐工作<sup>[3]</sup>。本研究以 ITS 序列为目标产物, 探索直接 PCR 技术在药用植物分子鉴定中的应用, 以期提高工作效率, 为基于 ITS 序列的药用植物样本快速处理及分子鉴定提供了新的技术思路。

## 材料与方法

**实验材料** 种植于上海中医药大学百草园中的苘麻 (*Abutilon theophrasti* Medicus)、佩兰 (*Eupatorium fortunei* Turcz)、白花前胡 (*Peucedanum praeruptorum* Dunn)、细叶远志 (*Polygala tenuifolia* willd.) 等 80 种植物。详见表 1。

**Table 1** Plant species and Direct-PCR amplification and Blast results. Note: A total of 80 plant species belong to 27 families and 71 genus

Sample No.	Species/Family	Part of plant	Blast results/(Species), GenBank number, identity
1	<i>Abutilon theophrasti</i> Medicus/Malvaceae	Root	KY063587, 100%
2	<i>Eupatorium fortunei</i> Turcz./Asteraceae	Leaf	GU724295, 100%
3	<i>Peucedanum praeruptorum</i> Dunn/Umbelliferae	Stem	DQ132871, 100%
4	<i>Polygala tenuifolia</i> willd./Peucedanum	Root	KU662307, 99%
5	<i>Ricinus communis</i> L./Euphorbiaceae	Leaf	KF186448, 100%
6	<i>Lycopus europaeus</i> /Labiatae	Leaf	KF454271, 96%
7	<i>Perilla frutescens</i> (Linn.) Britt./Labiatae	Stem	KT220698, 99%
8	<i>Mosla chinensis</i> Maxim./Labiatae	Root	<i>Mosla dianthera</i> , KT210242, 99%
9	<i>Peucedanum terebinthaceum</i> /Umbelliferae	Leaf	KC295086, 96%
10	<i>Taraxacum mongolicum</i> Hand.-Mazz./Asteraceae	Leaf	JN407433, 99%
11	<i>Angelica dahurica</i> (Fish ex Hoffm)/Umbelliferae	Leaf	KR052189, 100%
12	<i>Salvia miltiorrhiza</i> Bge./Labiatae	Root/Leaf	KJ397256, 100%
13	<i>Datura innoxia</i> Mill./Solanaceae	Leaf	JX467607, 99%
14	<i>Foeniculum vulgare</i> Mill./Umbelliferae	Stem	JF421498, 100%
15	<i>Houttuynia cordata</i> Thunb./Saururaceae	Stem	EU329333, 99%
16	<i>Polygonum aviculare</i> L./Polygonaceae	Leaf	FJ493491, 99%
17	<i>Fagopyrum dibotrys</i> (D.Don) Hara/Polygonaceae	Stem	FJ503008, 100%
18	<i>Antenoron filiforme</i> (Thunb.) Rob.et Vaut/Polygonaceae	Leaf	HQ843129, 99%
19	<i>Rumex japonicus</i> Houtt./Polygonaceae	Leaf	AB744073, 100%
20	<i>Datura stramonium</i> L./Solanaceae	Leaf	KF022335, 100%
21	<i>Platycodon grandiflorus</i> (Jacq.) A. DC./Campanulaceae	Stem	KM110829, 100%
22	<i>Carthamus tinctorius</i> L./Asteraceae	Stem	KY397481, 100%
23	<i>Helianthus tuberosus</i> L./Asteraceae	Leaf	KX394610, 99%
24	<i>Verbena officinalis</i> L./Verbenaceae	Flower	FJ867414, 100%
25	<i>Daucus carota</i> L./Umbelliferae	Leaf	FJ150184, 99%
26	<i>Thermopsis chinensis</i> Benth.ex S.Moore/Leguminosae	Leaf	AF123443, 100%
27	<i>Allium chinensis</i> G.Don/ Liliaceae	Leaf	AJ411948, 99%
28	<i>Cirsium japonicum</i> Fisch.ex DC./Asteraceae	Leaf	KM051436, 99%
29	<i>Xanthium sibiricum</i> Patr./Asteraceae	Stem	KR011990, 99%
30	<i>Scrophularia ningpoensis</i> Hemsl/Scrophulariaceae	Leaf	FJ980433, 100%
31	<i>Cryptotaenia japonica</i> Hassk/Umbelliferae	Leaf	AY548233, 99%
32	<i>Phytolacca americana</i> L./Phytolaccaceae	Leaf	KU377334, 100%
33	<i>Coix lacrymosa-jobi</i> L. var. ma-yuen (Roman.) Stapf/Poaceae	Leaf	KC181916, 100%
34	<i>Stachys japonica</i> Miq/Labiatae	Root	<i>Solidago virgaurea</i> , KX166001, 98%
35	<i>Impatiens balsamina</i> L./Balsaminaceae	Leaf	AY348749, 100%

Continued

Sample No.	Species/Family	Part of plant	Blast results/(Species), GenBank number, identity
36	<i>Rorippa montana</i> (Wall.) Small/Brassicaceae	Stem	<i>Rorippa palustris</i> , KX167730, 97%
37	<i>Prunella vulgaris</i> L./Labiatae	Leaf	KT695250, 100%
38	<i>Plantago asiatica</i> L./Plantaginaceae	Leaf	AY101862, 100%
39	<i>Caryopteris nepetaefolia</i> (Benth.)Maxim./Verbenaceae	Leaf	<i>Teucrium scorodonia</i> , KX167151, 92%
40	<i>Viola prionantha</i> Bunge/Violaceae	Leaf	<i>Viola tianschanica</i> KP231355, 97%
41	<i>Bidens frondosa</i> L./Asteraceae	Leaf	U67094, 97%
42	<i>Leonurus japonicus</i> Houtt/Labiatae	Leaf	KU743141, 100%
43	<i>Dianthus chinensis</i> L./Caryophyllaceae	Stem	KU722882, 99%
44	<i>Senecio scandens</i> Buch.-Ham/Asteraceae	Leaf	FJ980344, 100%
45	<i>Eclipta prostrata</i> L./Asteraceae	Root	KJ004296, 99%
46	<i>Patrinia villosa</i> (Thunb.) Juss./Valerianaceae	Stem	<i>Patrinia scabiosifolia</i> , EU591961, 100%
47	<i>Artemisia annua</i> L./Asteraceae	Leaf	KX581795, 100%
48	<i>Sonchus brachyotus</i> DC./Asteraceae	Leaf	<i>Sonchus arvensis</i> KX166002, 96%
49	<i>Melilotus suaveolens</i> Ledeb/Leguminosae	Stem	<i>Melilotus officinalis</i> KJ999361, 99%
50	<i>Silybum marianum</i> L./Asteraceae	Leaf	GQ281038, 100%
51	<i>Atractylodes macrocephala</i> Koidz./Asteraceae	Leaf	KF301212, 100%
52	<i>Juncus setchuensis</i> Buchen/Juncaceae	Leaf	JQ811756, 100%
53	<i>Saposhnikovia divaricata</i> (Turcz) Schischk/Umbelliferae	Stem	FJ609730, 100%
54	<i>Anemarrhena asphodeloides</i> Bunge/Liliaceae	Leaf	KJ405448, 99%
55	<i>Commelina communis</i> L./Commelinaceae	Leaf	KY218780, 99%
56	<i>Iris domestica</i> L. ( <i>Belamcanda chinensis</i> L. DC)/Iridaceae	Leaf	KP058312, 98%
57	<i>Malva sinensis</i> Cavan/Malvaceae	Stem	<i>Malva pusilla</i> , KJ999384, 100%
58	<i>Carpesium abrotanoides</i> L./Asteraceae	Leaf	JQ062529, 100%
59	<i>Potentilla discolor</i> Bunge/Rosaceae	Stem	KF912937, 100%
60	<i>Sanguisorba officinalis</i> L./Rosaceae	Leaf	KX394606, 100%
61	<i>Agrimonia pilosa</i> Ledeb/Rosaceae	Root	KX394602, 100%
62	<i>Trigonella foenum-graecum</i> L./Leguminosae	Stem	KU956947, 100%
63	<i>Papaver rhoeas</i> L./Papaveraceae	Stem	DQ250273, 98%
64	<i>Sophora flavescens</i> Ait./Leguminosae	Stem	HQ207664, 100%
65	<i>Abelmoschus esculentus</i> L. Moench/Malvaceae	Leaf	KP222392, 99%
66	<i>Aster tataricus</i> L. f./Asteraceae	Leaf	FJ539125, 100%
67	<i>Artemisia capillaries</i> Thunb./Asteraceae	Stem	<i>Artemisia campestris</i> , KX167650, 99%
68	<i>Artemisia argyi</i> Levl.et Vant/Asteraceae	Leaf	GU724269, 100%
69	<i>Rorippa globosa</i> (Turcz.) Hayek/Brassicaceae	Stem	<i>Rorippa indica</i> , AF128108, 99%
70	<i>Astragalus membranaceus</i> (Fisch.) Bunge/Leguminosae	Leaf	KU956933, 100%
71	<i>Arctium lappa</i> L./Asteraceae	Leaf	KR011991, 99%
72	<i>Artemisia anomala</i> S.Moore/Asteraceae	Stem	GU724268, 99%
73	<i>Zea mays</i> L./Poaceae	Leaf	EU955045, 99%
74	<i>Vigna angularis</i> (Willd.) Ohwi et Ohashi/Leguminosae	Leaf	JX233499, 100%
75	<i>Canavalia gladiata</i> (Jacq.) DC./Leguminosae	Leaf	FJ176928, 99%
76	<i>Phaseolus vulgaris</i> L./Leguminosae	Leaf	KF943718, 100%
77	<i>Allium fistulosum</i> L./Liliaceae	Leaf	JF990845, 100%
78	<i>Glebionis coronaria</i> (L.) Cass ex Spach/Asteraceae	Stem	<i>Glebionis segetum</i> , KX282421, 99%
79	<i>Coriandrum sativum</i> L./Umbelliferae	Leaf	KM051454, 100%
80	<i>Eriobotrya japonica</i> (Thunb.) Lindl./Rosaceae	Leaf	KJ170768, 100%

仪器 Eppendorf 移液器、排枪; Eppendorf vapo.protect PCR 扩增仪; DYY-6C 型双稳定时电泳仪 (北京市六一仪器厂); Syngene 凝胶成像系统 (G: BOX, Syngene 英国); 台式紫外透射仪 (UVP, 美国);

5415R 型高速冷冻离心机 (Eppendorf, 德国); Votex-Genie 涡旋振荡器 (Coleparmer, 美国)。

试剂 植物组织直接 PCR 试剂盒 (PDP, 包括样品处理液 Solution A、Solution B, Direct-PCRmix)、优

化 PCR mix、安全核酸染料、DNA marker 购自上海创英生物科技有限公司；琼脂糖购自 Amersco 公司；TAE 电泳缓冲液自配，所用 Tris 碱、冰醋酸、乙二胺四乙酸二钠盐 ( $\text{Na}_2\text{EDTA}$ ) 购自上海国药集团公司。

**样品 DNA 制备** 剪取上述植物不同组织部位材料少许，置于 200  $\mu\text{L}$  PCR 扩增用八连管中 (图 1A)，参照植物组织直接 PCR 试剂盒说明，每个 PCR 管中加入 90  $\mu\text{L}$  Solution A，于 PCR 扩增仪中运行 95  $^\circ\text{C}$  15 min；取出八连管，每管加入 10  $\mu\text{L}$  Solution B，混匀，简短离心，上清液即为样品 DNA (图 1B)，直接用作模板进行 PCR 扩增。

**直接 PCR 扩增及测序** ITS 序列扩增选用两对引物：18S-a (5'-CGTAACAAGTTTCCGTAGGTGAC-3')/26S-b (5'-TTATTGATATGCTTAACTCAGCGG-3')<sup>[4]</sup>；ITSF (5'-ATGCGATACTTGGTGTGAAT-3')/ITS3R (5'-GACGCTTCTCCAGACTACAAT-3')<sup>[5]</sup>。18S-a/26S-b 为本实验室常用引物，扩增产物包含 ITS1、5.8S 和 ITS2 区域，预期片段 750 bp 左右<sup>[4]</sup>；ITS2F/ITS3R 为 ITS2 扩增通用引物，预期片段 500 bp 左右<sup>[5]</sup>。20  $\mu\text{L}$  PCR 反应体系中含有 Direct PCRmix 10  $\mu\text{L}$ 、正反向引物 (10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 各 0.5  $\mu\text{L}$ 、样品 DNA 溶液 2  $\mu\text{L}$ ，无菌超纯水补至 20  $\mu\text{L}$ ；扩增程序为 95  $^\circ\text{C}$  2 min；35 X [95  $^\circ\text{C}$  30 s；55  $^\circ\text{C}$  (18S-a/26S-b) 或 51  $^\circ\text{C}$  (ITSF/ITS3R) 30 s；72  $^\circ\text{C}$  1 min]；72  $^\circ\text{C}$  5 min。取 5  $\mu\text{L}$  PCR 产物用于琼脂糖凝胶电泳检测，条带单一且清晰的样品送上海生工生物工程有限公司测序。

**直接 PCR 反应体系优化扩增** 首次 PCR 扩增没有清晰条带的样品，一部分按原有体系进行再次扩增；对另一部分颜色较深的样品 DNA 溶液用无菌水稀释 50 倍后为模板，参照原有体系进行 PCR 扩增；或者重新采集材料，以 ITS2F/ITS3R 为引物，以植物

组织直接 PCR 试剂盒处理后样品 DNA 原液或稀释 50 倍后为模板，再次进行扩增，反应程序同上。对所有 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳检测，条带单一且清晰的样品送公司测序。

**序列处理及分析** 对测得的序列，结合测序源文件，去除两侧读序不确定区域，获得 ITS 序列进行 Blast 在线分析。

## 结果与分析

### 1 样品 DNA 获得

苘麻 (*A. theophrasti*)、佩兰 (*E. fortunei*)、白花前胡 (*P. praeruptorum*)、细叶远志 (*P. tenuifolia*) 等植物不同组织部位材料 (图 1A)，经植物组织直接 PCR 试剂盒中 Solution A/B 处理后，裂解液即样品 DNA 溶液呈现不同颜色 (图 1B)，其中 12、15、16、17、18、19、21、23、29、37、44、58、59、60、61、63、67、72、80 号共 19 个材料的样品 DNA 溶液颜色较深，尤以 17、18、44、59、61、80 号样品为甚，呈现不透明的深褐色或红褐色。对比图 1A 可以看出，这些样品与其他材料在处理前颜色和取材大小差异并不明显。样品 DNA 溶液中颜色差异，是由于不同植物材料裂解后释放出不同的代谢产物。

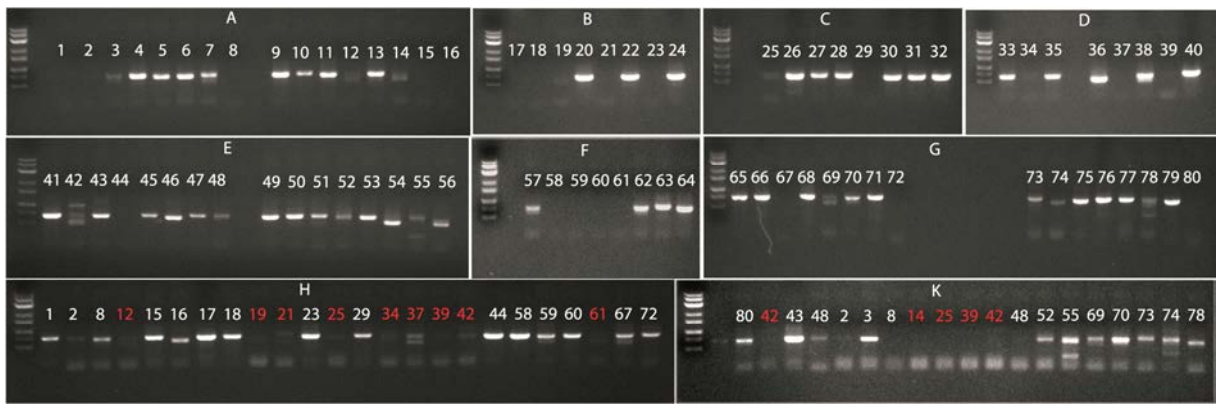
### 2 直接 PCR 首次扩增

首次 PCR 扩增以 18S-a/26S-b 为引物，琼脂糖凝胶电泳结果如图 2A~G 所示。

样品 DNA 溶液颜色较深且不透明的 19 个样品中，29、63 号材料出现明显扩增，其余 17 个材料首次扩增没有出现预期的单一条带；样品 DNA 溶液颜色较深但澄清的 8 个样品中有 6 个样品 (20、22、26、30、33、35、38 号材料) 的 PCR 产物条带单一且明晰，



**Figure 1** Samples from different plant species. A: Samples before treatment; B: Samples after treatment. Number in the figure indicate the sample numbers, which are consistent with those in Table 1



**Figure 2** Agarose gel electrophoresis results of Direct-PCR amplified ITS products. A–G: 1st PCR results; H, K: 2nd PCR results. Numbers in the figure indicate the sample numbers, which are consistent with those in Figure 1 and Table 1. Daily 1 kb DNA ladder (HerogenBio) was used to measure the size of PCR products

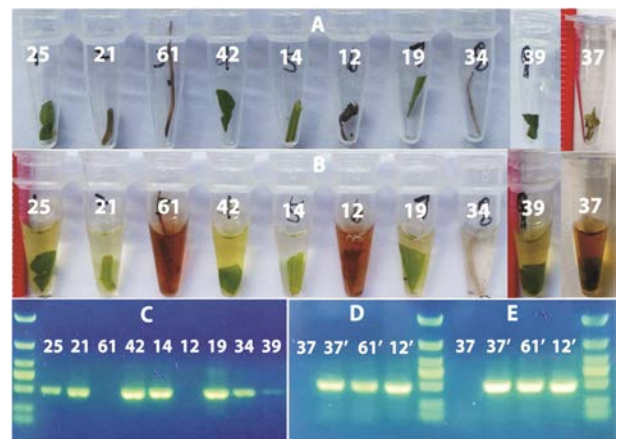
两个 (34、39 号样品) 材料没有扩增。由此推测, 样品 DNA 溶液中过多杂质会影响 PCR 扩增效果, 使样品 DNA 溶液颜色变深且浑浊的物质不利于 PCR 扩增。

### 3 直接 PCR 二次扩增

对首次扩增无条带、条带弱或有杂带的 15 个样品, 采用同样体系再次进行 PCR 扩增, 其中 8 个样品 PCR 扩增情况明显改善, 出现清晰条带 (图 2K, 2-78); 样品 DNA 溶液颜色较深的 24 个样品 (1、2、8、12、15、16、17、18、19、21、23、25、29、34、37、39、42、44、58、59、60、67、72、80 号材料) 稀释 50 倍后为模板进行扩增, PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳, 结果如图 2H, K (2-80) 所示: 24 个样品中有 14 个样品出现预期 ITS 产物, 且条带单一、清晰, 表明通过稀释模板可以有效降低杂质对 PCR 扩增影响, 提高 PCR 扩增效率。

### 4 直接 PCR 反应体系优化扩增

对二次扩增没有显著目标片段的 10 个样品 (图 2H, K, 红色数字样品) 重新采集材料 (图 3A), 以 Solution A/B 处理后样品 DNA 溶液为模板, 以 ITS2F/ITS3R 为引物进行 PCR 扩增, 结果如图 3C 所示: 10 个样品中, 7 个扩增到预期大小的 ITS 片段, 其中 6 个扩增产物较多, 产物条带清晰明亮; 12 号 (丹参)、37 号 (夏枯草)、61 号 (龙芽草) 无扩增产物。从样品 DNA 溶液图片 (图 3B) 可以看出, 12、37、61 号样品 DNA 溶液颜色较深, 含有较多杂质。对这 3 个样品 DNA 溶液稀释 50 倍后为模板, 连同 37 号样品 DNA 原液, 用 Direct-PCRmix 及优化 PCR mix 中 PR2、PR3、PR4 3 种 PCRmix 进行扩增, 结果显示: 以 37 号样品 DNA 原液为模板的 4 种 PCR 反应体系中没有得到目的基因产物; 而以样品 DNA 溶液稀释 50 倍后为模板的 4 种 PCR 反应体系, 12、37、61 号样



**Figure 3** Re-collected 10 samples Direct-PCR amplified ITS products. A: Samples before treatment; B: Samples after treatment; C–E: Agarose gel electrophoresis results with different PCR reactions. Direct-PCRmix with original DNA samples (C). Direct-PCRmix (D) and Sure-PCRmix-PR2 (E) with original DNA sample of No. 37 and 1/50 dilution DNA samples of No. 37, 61 and 12. Numbers in the figure indicate the sample numbers, which are consistent with those in Figure 1, 2 and Table 1. DM3000 DNA ladder (HerogenBio) was used to measure the size of PCR products

品 ITS 目的基因均得到高效扩增。以 Direct-PCRmix 和 PR2 为反应体系的扩增结果如图 3D, E 所示。

值得注意的是, 这 10 个植物材料中有 3 个属于唇形科: 丹参、夏枯草和益母草。由于同属物种在次生代谢产物上具有类似性, 以上结果进一步说明: 通过稀释样品 DNA 可有效提高直接 PCR 扩增效率。

综合以上结果可以看出, 采用植物组织直接 PCR 技术, 以 80 种植物不同组织的微量样品为起始材料, 通过调整 PCR 反应体系, 80 个样品 ITS 片段均得到有效扩增 (表 1), PCR 扩增成功率达 100%。

### 5 测序结果分析

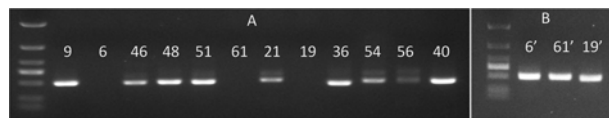
以上所得的 80 个样品的 PCR 扩增产物送公司

测序。对所得序列在 NCBI 网站进行 Blast 在线分析, 80 个样品中 78 个样品的 ITS 序列与 GenBank 中同物种或同属物种序列相同性在 96%~100% (表 1), 可以准确地对物种进行鉴别。

GenBank 数据库中没有收录单花蕈 [*Caryopteris nepetaefolia* (Benth.) Maxim. 表 1 样品 39] ITS 序列, Blast 结果显示其与唇形科植物林石蚕 (*Teucrium scorodonia*) ITS 序列具有 92% 同源性, 为本研究新发现序列。水苏 (*Stachys japonica* Miq) 样品 (表 1 样品 34) 的 ITS 序列与一枝黄花 (*Solidago virgaurea*) 显示出 98% 同源性。由于实验所用水苏材料为地下根, 而一枝黄花为生命力极强的广布生长植物, 推测这一结果可能是由于取样时误取了一枝黄花的地下根部分造成的。

## 6 直接 PCR 技术可重复性验证

为检测所建立方法的可重复性, 从上面 80 种植物材料中, 挑选了 12 个样品 (包括首次扩增即成功的 6、9、36、40、46 和 54 号样品, 首次扩增条带较弱的 48、51 和 56 号样品, 以及经 PCR 反应体系优化后得到条带的 19、21 和 61 号样品), 重新取样, 再次进行样品处理、PCR 扩增、电泳检测, 结果如图 4 所示。可以看出, 前面实验中首次即成功的 6 个样品中 5 个样品再次实验也成功扩增; 条带较弱的 3 个样品再次实验中两个样品目的基因条带明显, 56 号样品依然较弱; 前面实验需要进行 PCR 反应体系优化的 3 个样品中 21 号样品首次即出现扩增; 未出现扩增的 3 个样品 (6、61 和 19 号), 以其 1/50 稀释的样品 DNA 为模板再次扩增, 也获得 ITS 序列目的基因条带。以上结果说明, 本研究所建立的直接 PCR 方法具有可重复性。



**Figure 4** Repeated Direct-PCR results of ITS PCR amplification. A: Agarose gel electrophoresis results of ITS PCR products using original DNA samples as template. B: PCR products using 1/50 dilution DNA samples as template. 6–61: Sample numbers as in Table 1. 6', 61' and 19': The same samples correspond to 6, 61 and 19, respectively, but using 1/50 dilution DNA samples as template. DM3000 DNA ladder was used to measure the size of PCR products

## 讨论

PCR 作为一项经典技术, 已广泛应用于生物材料的分子检测鉴定。在确保结果准确、稳定的前提下,

提高 PCR 方法效率, 缩短检测时间, 是新方法开发时需要考虑的重要指标<sup>[6]</sup>。直接 PCR 技术可以快速有效地同时处理大量样本, 在以基因组 DNA 为模板的 PCR 扩增中, 具有很大优势和应用潜力。近年来, 在临床样本快速鉴定检测<sup>[7]</sup>、转基因玉米筛选<sup>[6]</sup>等方面得到探索和应用。以药用植物为材料的直接 PCR 研究尚未见报道。

本研究中, 随机选择了 80 种常见药用植物, 通过调整 PCR 反应体系, 建立了批量样本处理及分子鉴定的直接 PCR 方法。与传统的需要提取制备 DNA 相比, 本研究所建立的方法具有如下特点:

根据所用植物组织直接 PCR 试剂盒说明, 植物材料以 1~3 mg 为宜。实际操作中, 可通过估测取样。本实验用植物材料均来自本单位百草园, 取材时, 直接剪取少许植物材料, 并没有严格称量。从 PCR 扩增结果来看, 样品量最少的 13、53、54、62、63 号样品, 均在首次 PCR 扩增中即得到显著的目的基因条带; 样品量中等的如 30、31、32、65、66 号样品, 也在首次扩增时得到清晰的目的片段; 样品量相对最多的 23 号样品, 首次扩增没有预期片段, 采用同样体系再次进行 PCR 扩增时, 也得到了预期的目的基因。这说明微量植物材料即可取得预期扩增结果, 因而对植物影响也就很小, 可用于不同发育阶段、不同组织器官药用植物的无损鉴定, 尤其是特殊发育时期如种子萌发、幼苗期等生物量较少时的生物材料。

采用传统的提取制备 DNA 方法, 首先要建立针对特定药材的 DNA 提取方法, 以去除多糖、酚酸等影响 PCR 扩增的化学成分, 特别是含有较多次生代谢产物的药用植物如丹参<sup>[8,9]</sup>、夏枯草<sup>[10]</sup>、茴香<sup>[11]</sup>; 有时, 即使以提取纯化的 DNA 为模板, 也并非一次就能扩增成功, 需要对 PCR 反应体系进行优化, 以获得理想结果, 如夏枯草 RAPD 分子鉴定<sup>[10]</sup>、桔梗的 ITS2 序列扩增<sup>[12]</sup>等。

与之相比, 本研究可将多种药用植物材料同时进行处理, 所有样品 DNA 可在 15 min 内一次性获得。对于丹参、夏枯草、桔梗、羊蹄等含有较多杂质的 24 个样品 DNA, 使用 50 倍稀释液为模板, 所有材料均得到有效扩增。实验结果说明, 通过简单的稀释, 即可降低杂质对 PCR 扩增的影响, 显著提高 PCR 扩增效率。从植物材料处理、PCR 扩增、电泳检测, 到获得 ITS 序列的 PCR 扩增产物, 80 个样品可以在 8 h 左右完成, 工作效率大大提高。

本研究所用 80 种植物材料分属 27 科 71 属, 包括酚酸类化合物含量较多的唇形科植物丹参、紫苏、

夏枯草等;取材组织部位包括叶 51 份、茎 22 份、根 6 份、花 1 份,采用本研究所建立的直接 PCR 方法,其 ITS 序列都得到了有效扩增。

值得一提的是,本研究还随机选择了地肤子、白芍、川菊、百两金等 7 种干药材进行了针对 ITS 序列的直接 PCR 扩增,结果表明 3 种药材在首次 PCR 扩增中即有目的条带。可以预见,直接 PCR 技术应用于干药材的分子鉴定也将是可行的。

综上所述,直接 PCR 技术以微量样品为起始材料,高效扩增药用植物 ITS 基因片段,节省了时间和人力,可以显著提高工作效率。当有大量样品需要处理时,这一优势更为明显,为基于 ITS 序列的药用植物分子鉴定提供了更为便捷的技术思路。

## References

- [1] Chen S, Yao H, Han J, et al. Principles for molecular identification of traditional Chinese materia medica using DNA barcoding [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2013, 38: 141–148.
- [2] Luo K, Ma P, Yao H, et al. Study on DNA extraction method for Chinese herbs [J]. *World Sci Technol/Mod Tradit Chin Med Mater Med* (世界科学技术——中医药现代化), 2012, 14: 1432–1439.
- [3] Hwang H, Bae SC, Lee S, et al. A rapid and simple genotyping method for various plants by Direct-PCR [J]. *Plant Breed Biotechnol*, 2013, 1: 290–297.
- [4] Ye Z, Lu Y, Wang Z, et al. Identification of *Dendrobii Caulis* basing on ITS sequence [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2014, 39: 3928–3935.
- [5] Xiang L, Zhang W, Chen S. Literature study and DNA barcoding of traditional Chinese medicine Qinghao (*Artemisia annua* L.) [J]. *Acta Pharm Sin* (药学学报), 2016, 51: 486–495.
- [6] Xing Z, Dong L, Liu N, et al. Rapid screening of genetically modified maize by Direct PCR [J]. *J Maize Sci* (玉米科学), 2017, 1: 29–33.
- [7] Liu R, Yin L, Pu Y, et al. MTHFR C677T polymorphism rapidly detected with direct amplification protocol in peripheral blood samples [J]. *J Environ Occup Med* (环境与职业医学), 2007, 24: 21–24.
- [8] Wang C, Liang Z, Li D, et al. Optimization of DNA extraction methods from *Salvia miltiorrhiza* Bge. [J]. *Pharm Biotechnol* (药物生物技术), 2007, 14: 29–33.
- [9] Song Z, Wang M, Wang J, et al. Comparison of genomic DNA extraction methods for *Salvia miltiorrhiza* [J]. *Chin Wild Plant Resour* (中国野生植物资源), 2008, 27: 54–57.
- [10] Lai J, Li P, Yuan Y, et al. Extraction of genomic DNA and optimization of RAPD reaction condition for *Prunella vulgaris* L. [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2007, 19: 123–126, 134.
- [11] Li H. Comparison of genomic DNA extraction methods for *Foeniculum vulgare* Mill. [J]. *Northern Horticulture* (北方园艺), 2008, 3: 189–192.
- [12] Liu J, Pang M, Zhang G, et al. Identification of *Platycodonis Radix* seeds by using ITS2 DNA barcode [J]. *World Sci Technol/Mod Tradit Chin Med Mater Med* (世界科学技术——中医药现代化), 2016, 18: 173–178.