

★论著★

SNP测定结合芯片电泳法快速鉴别人参和西洋参*

宋沁馨¹, 冯芳¹, 张心悦², 周国华^{1, 2*}

(1. 中国药科大学药物分析教研室, 南京 210009

2. 南京军区联勤部药品仪器检验所, 南京 210002)

摘要 目的: 建立快速、准确的单核苷酸多态性 (SNP) 测定法鉴别人参、西洋参及 2 种样本的混合物。方法: 根据 ITS 和 5.8 s 基因上人参、西洋参的 SNP 位点设计特异性引物进行 PCR 扩增, 每对 PCR 引物中有 1 条引物的 3' 端正好位于 SNP 位点上, 当互补时发生 PCR 扩增反应, 否则无扩增产物; 另 1 条引物决定着 PCR 产物的长度。用芯片电泳法检测 PCR 产物的长度, 根据 PCR 的电泳条带大小进行鉴别。为了减少非特异性扩增, 在引物 3' 端的第 3 个碱基处人为引入 1 个错配碱基。结果: 当退火温度为 55 ℃ 时, 出现 252 bp 条带的为人参, 430 bp 条带的为西洋参。该鉴别反应特异性高、重现性好、操作简便, 能在同一反应中准确鉴别人参、西洋参。一系列不同比例的混合样本测定结果表明, 可以检出 5% 的掺杂成分。电泳分离时间小于 100 s。结论: 通过测定人参和西洋参基因组 DNA 中的 SNP, 可以进行品种鉴别和质量控制, 可用于中药材的快速鉴定。

关键词: 人参; 西洋参; 单核苷酸多态性 (SNP); ITS 和 5.8 s 基因; 芯片电泳

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2009)01-0001-05

Rapid detection the SNP of *Panax ginseng* and *P. quinquefolius* by microchip electrophoresis*

SONG Q in- x in¹, FENG Fang¹, ZHANG X in- yue², ZHOU Guo- hua^{1, 2**}

(1. Department of Pharmaceutical Analysis, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China; 2. The Institute of Quality Control of Medical Material and Equipment under the Joint Logistic Department of Nanjing Command, Nanjing 210002, China)

Abstract Objective To establish an accurate and rapid single nucleotide polymorphism (SNP) genotyping method of *Panax ginseng* and *P. quinquefolius*. **Method** PCR was carried out by using primers designed according to the SNPs in the ITS and 5.8 s genes of *P. ginseng* and *P. quinquefolius*. Using the microchip electrophoresis to detect the product of PCR. The switching characteristics of the primer extension reaction was increased by introducing an artificially mismatched base into the third position from the 3' end of the primers. **Result** When the annealing temperature was 55 ℃, the genome DNA of *P. ginseng* could be amplified 252 bp band whereas *P. quinquefolius* amplified 430 bp. The results showed that the method was specific, reproducible, easy to operate and could complete detection in one tube. It was also possible to very accurately determine mixed samples as low as 5%. All samples were analyzed within 100 s in microchip electrophoresis. **Conclusion** This SNP technique offers a quite feasible method as a criterion for the identification of *P. ginseng* and *P. quinquefolius*. It was a potential method to the rapid detection of traditional Chinese medicine.

Key words *Panax ginseng*; *Panax quinquefolius*; single nucleotide polymorphism (SNP); ITS and 5.8 s gene; microchip electrophoresis

* 国家自然科学基金项目 (No. 30470454); 南京军区卫生专业人才培养“122”工程资助项目

** 通讯作者 Tel/Fax: (025) 84540665, E-mail: ghzhou@public.pptt.cn

参类药材是常用的名贵中药,传统的参类鉴别主要采用外观性状鉴定,虽然方法简便、直接,但是主观性强,其准确性取决于鉴定者的经验,且对加工炮制后的碎片或粉末难以鉴定;建立适用于各种药材形态的客观性强、重复性和稳定性均好的中药鉴定标准是中药事业发展的关键科学问题。

近年来,随着分子生物学技术在中药学领域的渗透与发展,基于 DNA 分子标记技术的中药分子鉴定方法得到不断的发展与应用^[1-5]。以 DNA 分子特征进行中药鉴别,非常适合于近缘种、易混淆品种、珍稀品种、动物药材、破碎药材、陈旧药材及样品量极为有限的珍贵样品的鉴定。常用的方法主要有限制性片段长度多态性(RFLP)、随机扩增产的 DNA 多态性(RAPD)和扩增片段长度多态性 DNA(AFLP)等方法。这些方法的优点是预先不需要知道 DNA 序列的情况、模板质量要求低、快速、灵敏但同时也易受反应条件的影响,稳定性和重复性差。特别是当样品掺伪时,难以得出准确结果。

本文根据人参(*Panax ginseng* C. A. Mey.)、西洋参(*Panax quinquefolius* L.) ITS和 5.8 s 基因上的 SNP 位点设计特异性引物^[6],直接从基因组 DNA 进行 PCR 扩增,根据各自的特异性条带用芯片电泳法和常规琼脂糖凝胶电泳法均可以进行鉴别^[7]。该方法反应特异性高、重现性好、操作简便,能在同一反应中准确鉴别人参、西洋参。通过测定一系列不同比例的混合样本,本法最低可检测至 5% 的掺伪品。利用芯片电泳技术可以在 100 s 之内检测出结果^[8],使检测速度大大加快。

1 材料与方法

1.1 试剂 TaKaRa *Taq*[™] DNA 聚合酶及其他 PCR 反应试剂(宝生物公司,大连); Biospin 植物基因组 DNA 提取试剂盒(Bioer 公司,杭州); 芯片电泳试剂盒(Agilent 公司,美国); 琼脂糖凝胶(BioWest 公司,上海 YIFU 公司分装)。实验所用其他试剂均为分析纯或优级纯,水为灭菌超纯水。

1.2 仪器 PCR 扩增仪(PTC-225 型, MJ Research 公司,美国); 芯片电泳仪(2100 Bioanalyzer 型, Agilent 公司,美国); 凝胶电泳仪(Power PAC 1000 型, Bio-Rad 公司,美国); 凝胶电泳成像仪(ChemImager[™]型, Alpha Innotech 公司,美国)。

1.3 引物序列 公共引物 P1: 5'-cgaaacctgcatagcagaac-3'; 人参特异性引物 ASA-1 5'-agagc-

cgagatccgTAgT-3'; 西洋参特异性引物 ASA-2 5'-cgctcgactcccgTaa-3'; 人参特异性引物 ASA-3 5'-agagcggagatccgttG-3'; 西洋参特异性引物 ASA-4 5'-cgctcgactcccgcaa-3'。ASA-1、ASA-2 引物与 ASA-3、ASA-4 引物的区别是在 3' 末端倒数第 3 位人工引入 1 个不匹配碱基。所有引物均由上海英骏生物技术有限公司合成,并经聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)纯化。

1.4 参类基因组 DNA 的提取 取参类粉末各 50 mg 利用 Bioer 公司的 Biospin 植物基因组 DNA 提取试剂盒,能够快速提取参类的基因组 DNA。提取效果和自配提取液用十六烷基三乙基溴化铵(CTAB)法提取的没有显著差别。

1.5 参类 ITS 和 5.8 s 基因 SNP 位点的确定 查找 GenBank 上已收载的参类药材基因序列,发现人参、西洋参在 matK1、matK2、18 s 等基因上均存在种间 SNP,但是 ITS 和 5.8 s 基因上 SNP 位点最丰富,不仅人参、西洋参,其他如竹节参(*Panax japonicus* C. A. Mey.)、三七(*Panax notoginseng* F. H. Chen)、峨嵋参(*Panax emiensis* J. Wen)、越南参(*Panax vietnamensis* Ha & G. Mushv.)、狭叶竹节参(*Panax wangianus* S. C. Sun)、珠子参(*Panax bipinnatifidus* Seem.)等均有可供鉴别的 SNP 位点,非常适合于此类药物的鉴别,故本研究选择 ITS 和 5.8 s 基因进行分析。利用 ClustalW 软件进行比对分析,发现在该基因 235 bp 处,人参为 A,西洋参、竹节参、三七、峨嵋参、狭叶竹节参等其他参类药材为 G; 414 bp 处,西洋参为 T,人参、竹节参、三七、峨嵋参、狭叶竹节参等其他参类药材为 C。选择这 2 个 SNP 位点进行特异性引物设计和 PCR 扩增。

1.6 PCR 反应 PCR 反应的标准混合液(25 μL)的组成为引物 P1(10 pmol·L⁻¹)、ASA-1(10 pmol·L⁻¹)、ASA-2(10 pmol·L⁻¹)各 0.5 μL; dNTP(2.5 mmol·L⁻¹) 2 μL; MgCl₂(25 mmol·L⁻¹) 1.5 μL; 10×PCR buffer 2.5 μL; TaKaRa *Taq*(5 U·μL⁻¹) 0.1 μL; 基因组 DNA 模板 0.5 μL; 加 H₂O 至 25 μL。

PCR 反应条件: 94 °C 变性 5 min, 然后循环 30 次(94 °C, 30 s; 55 °C, 30 s; 72 °C, 40 s), 最后于 72 °C 置 7 min。人参扩增片段长度为 252 bp, 西洋参扩增片段长度为 430 bp。取 PCR 产物 1 μL 上样于芯片电泳仪或者用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测, 根据扩增片段的长度不同进行鉴别。

2 实验原理

本法利用三引物在同一管中直接以提取的参类基因组 DNA 为模板进行双重 PCR 扩增, 其中 1 个为公共引物 P1, 另外 2 个分别为人参特异性引物 ASA-1 和西洋参特异性引物 ASA-2。每个特异性引物的 3'端碱基分别与不同参类的 SNP 碱基类型相匹配, 当 3'端与模板序列完全互补时, 发生延伸反应, 所以引物的 3'端决定着 PCR 反应的特异性。为了增加引物的开关特性, 在每个特异性引物 3'端的第 3 个碱基处, 人为设计 1 个错配碱基, 来抑制非特异性延伸反应的发生, 从而减少假阳性信号的产生。其实验原理见图 1。

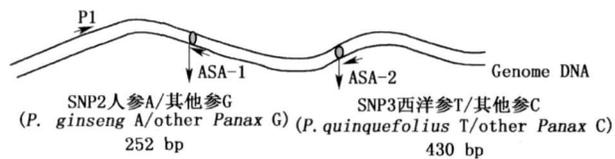


图 1 参类 SNP 鉴别法特异性扩增实验原理图

Fig 1 The principle for identifying *P. ginseng* and *P. quinquefolius* by using SNP typing method

3 实验结果

3.1 人参、西洋参对照药材的检测

取人参、西洋参对照药材粉末各 3 批 (江苏省药品检验所提供), 每批 50 mg 用 Biospin 植物基因组 DNA 提取试剂盒, 提取参类的 Genome DNA。然后用本法进行特异性 PCR 扩增, 最后用芯片电泳检测, 并用琼脂糖凝胶电泳结果验证。结果见图 2 其中图 2-A 为芯片电泳图、图 2-B 为凝胶电泳图。结果表明人参对照药材在 252 bp 出峰, 西洋参对照药材在 430 bp 出峰, 其片断大小正确, 证明方法准确可靠。

3.2 人参和西洋参混和样品的测定

为了考察该方法对于参类混合样本的测定灵敏度和准确度, 将人参和西洋参粉末按不同比例混合, 总重量 50 mg 其中西洋参分别占 0%, 10%, 25%, 50%, 75%, 95%, 100%。用 Biospin 植物基因组 DNA 提取试剂盒, 分别提取混和参类样本的基因组 DNA。

然后用本法进行特异性 PCR 扩增, 最后用芯片电泳检测, 并用琼脂糖凝胶电泳结果验证。结果见图 3, 其中图 3-A 为芯片电泳图、图 3-B 为凝胶电泳图。结果表明本法可以准确测定低至 5% 的混合物。

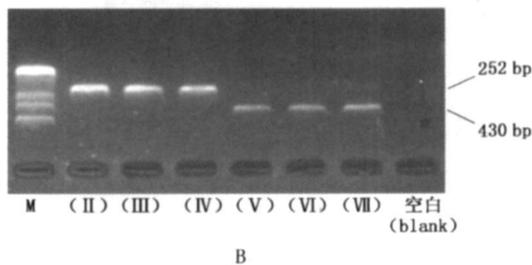
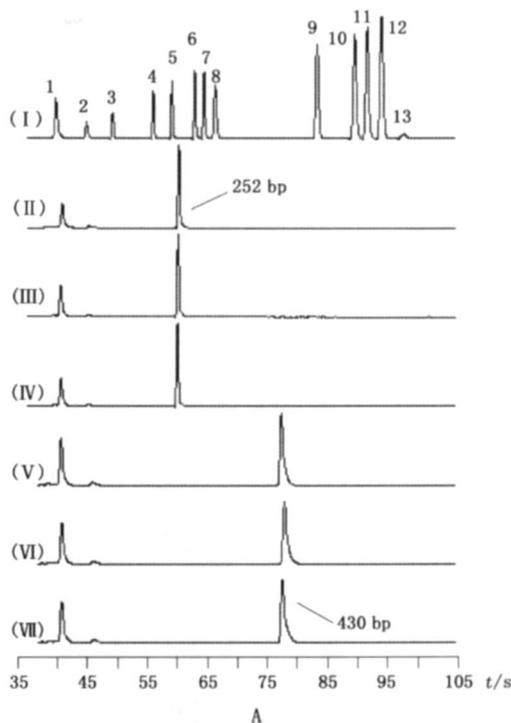


图 2 人参、西洋参鉴别电泳图

Fig 2 The electrophoretograms of *P. ginseng* and *P. quinquefolius*

A: 芯片电泳图 (microchip electrophoretogram) B: 凝胶电泳图 (gel electrophoretogram)

(I) 芯片电泳 DNA 分子标记 (Ladder): 1-13 分别为 23 72 118 194 234 271, 281, 310 603 872 1078, 1353 1893 bp (II)-(IV) 人参 (*P. ginseng*, 252 bp) (V)-(VII) 西洋参 (*P. quinquefolius*, 430 bp)

M: 凝胶电泳 DNA 分子标记 (Marker 150 200 300 400 600 bp)

3.3 实际样品的测定

人参在长期的栽培过程中, 产生了不同的农家品种; 西洋参原产地在美国、加拿大, 现在我国不少地区也已引种并大规模栽培。当人参、西洋参被加工成饮片装入胶囊, 又加大了鉴别的难度。为了验证本文所建立的方法的可靠性和准确性, 检测了若干市场上购买的人参、西洋参的药材、切片和胶囊等共 12 批, 具有一定的代表性。样品来源见表 1 (分别购自于南京各药房, 由南京中医药大学余黎鉴定)。

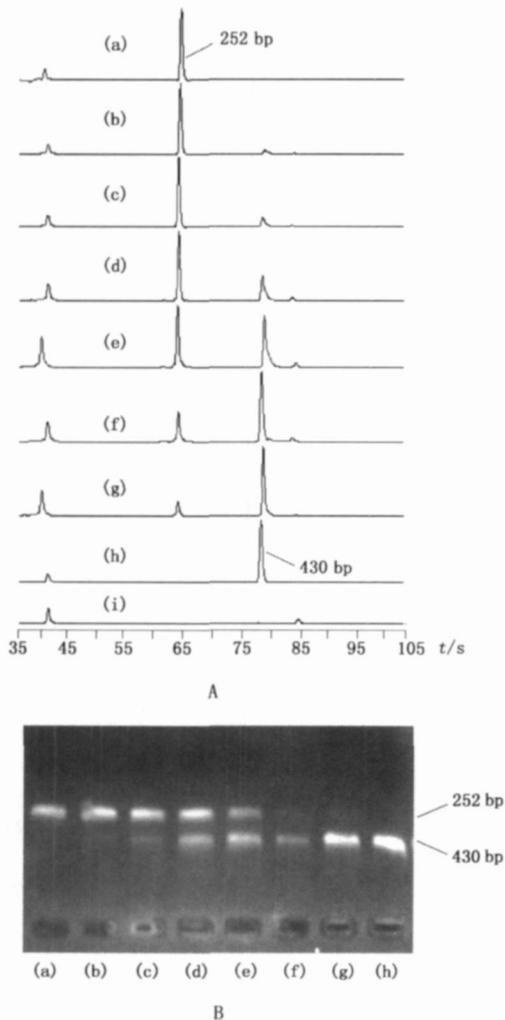


图 3 不同比例人参、西洋参混合物电泳图

Fig 3 The electrophoretograms of different ratio mixtures of *P. ginseng* and *P. quinquefolius*

A: 芯片电泳图 (microchip electrophoretogram) B: 凝胶电泳图 (gel electrophoretogram)

(a) 人参 (*P. ginseng*, 252 bp) (b) - (g) 西洋参比例 (ratio of *P. ginseng* and *P. quinquefolius*): 5%, 10%, 25%, 50%, 75%, 95% (h) 西洋参 (*P. quinquefolius*, 430 bp) (i) 空白 (blank)

表 1 参类样品来源

Tab 1 Samples of *P. ginseng* and *P. quinquefolius*

样品 (sample)	编号 (No.)	状态 (state)	来源 (origin)
人参 (<i>P. ginseng</i>)	(1)	生晒参 (Radix Ginseng)	辽宁 (Liaoning)
	(2)	生晒参 (Radix Ginseng)	吉林 (Jilin)
	(3)	切片 (slice)	吉林 (Jilin)
西洋参 (<i>P. quinquefolius</i>)	(4)	药材 (herbs)	吉林 (Jilin)
	(5)	野生药材 (wild herbs)	美国 (America)
	(6)	中长枝 (long sticks)	北京 (Beijing)
	(7)	短枝 (brachyblast)	北京 (Beijing)
	(8)	药材 (herbs)	加拿大 (Canada)
西洋参胶囊 (<i>P. quinquefolius</i> capsules)	(9)	LotN α 20060218	香港 (Hongkong)
	(10)	LotN α 20060512	美国威州 (W I U SA)
	(11)	LotN α 20050821	深圳 (Shenzhen)
	(12)	LotN α 20060921	广东佛山 (Foshan Guangdong)

8批药材和切片经芯片电泳法检测, 结果如图 4 所示, 图中 (1) ~ (8) 样品同表 1 中编号, 人参样品均在 252 bp 出峰; 西洋参样品均在 430 bp 出峰。结果表明: 市场上的参类药材和切片质量较可靠, 本法均能准确测定。

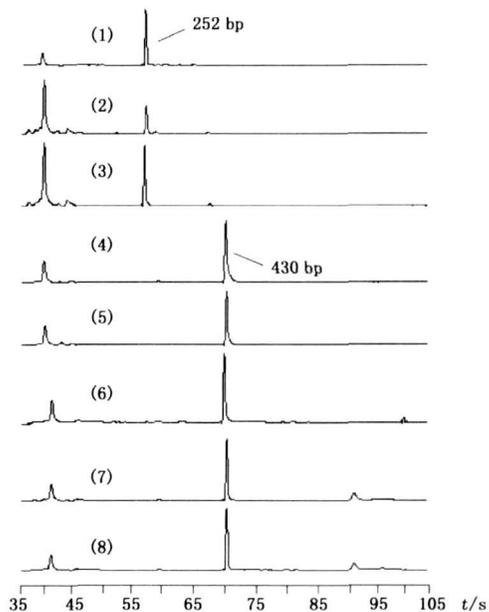


图 4 不同来源人参、西洋参样品芯片电泳图

Fig 4 The microchip electrophoretograms of different samples of *P. ginseng* and *P. quinquefolius*

4 讨论

4.1 提高 SNP 分析特异性的方法 实验表明, 在特异性引物的 3' 端的第 3 个碱基处, 人为导入 1 个错配的碱基, 可以提高 SNP 分析的特异性。由图 5 可见, 当采用未加入人工错配碱基的引物 ASA-3/ASA-4 来扩增人参、西洋参不同类型的 SNP 位点时, 检测结果会出现 2 条条带, 即发生错配延伸产生非特异性条带, 与正确的测序结果不符。说明特异性引物的 3' 端在与 DNA 模板退火时, 仅 3' 端 1 个碱基的不同不足以影响该引物的延伸反应, 当 3' 端区域有 2 个与模板不互补的碱基时, 可有效地阻止非特异性延伸反应。说明本文所采用的方法能有效地用于提高 SNP 检测的特异性。图中 (1) ~ (6) 样品同表 1 中编号。

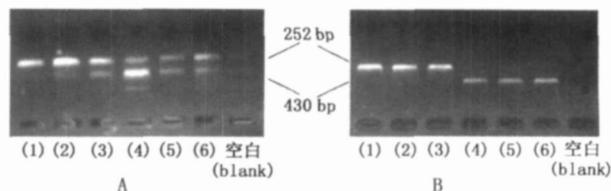


图 5 特异性引物中人工错配碱基的作用

Fig 5 Effect of artificial mismatch base in the specific primer

A: 无错配碱基 (primer with no artificial mismatch base) B: 有错配碱基 (primer with artificial mismatch base)

4.2 在西洋参掺假检测中的应用 一般药材和切片品种的质量较为可靠,但是胶囊制剂的质量存在很大问题,发现了掺假现象,即在西洋参胶囊中混入了价格低廉的人参。考察了市场上4家公司销售的4个不同批号的西洋参胶囊,实验结果见图6。图中(9)~(12)样品同表1中编号。

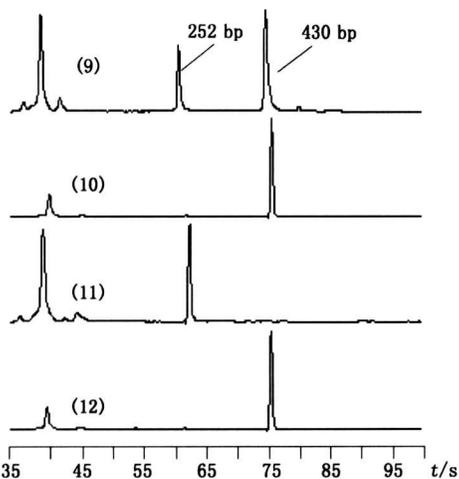


图6 市售西洋参胶囊的芯片电泳检测结果

Fig 6 Microchip electrophoretograms of real *P. quinquefolius* capsule samples

与饮片相比,粉末更易于造假,因为中国药典中规定参类药材和制剂只作显微鉴别和总皂苷的测定,而五加科植物有共同的特点,不能有效地控制混和样品和伪品。实验中在某些品牌西洋参胶囊中检测到人参,可能用价格便宜的人工种植普通生晒参代替了价格较贵的西洋参,例如在胶囊(9)中发现有人参的252 bp峰,根据峰面积的比值可知,该胶囊中含有大约40%左右的人参粉末;胶囊(11)没有发现西洋参430 bp峰,只出现了人参的252 bp峰,完全为人参粉末,属于造假产品;胶囊(10)、(12)未发现人参峰,应为合格品种。实验结果证明参类保健品市场较为混乱,本方法适合于参类保健品的打假鉴别。

5 结论

中药材的品种质量的多样主要是由其生物多样性所决定的。与生物多样性密切相关的SNP测定是后基因组时代的研究热点,已开发出许多有关的商品化仪器。随着SNP与动植物类型关系的研究深入,基因检测可以有效地进行中药材的鉴定。

本文建立的方法在特异性引物的3'端区域人为引入1个不匹配碱基,使得引物延伸的特异性大大提高,同时在1个反应管中用1个公共引物和2个特异性引物同时测定人参和西洋参的2个SNP位点,操作简便,而且不需要PCR预扩增基因片段,节约大量时

间,能够准确测定参类混合物低至5%的情况,且无需使用试剂盒精制产物。从参类基因组DNA的提取、特异性PCR扩增到芯片电泳(或凝胶电泳)检测,可在半个工作日内完成,利于药检系统进行快速准确检测。目前反应体系为25 μL,如将PCR反应体系减少到5 μL,选用384孔板对多个样品同时操作,则可大大提高SNP检测效率。若进一步采用自动化的并行液体加入装置,将更加节省时间。另外,本文建立的方法可通过制备快速检测试剂盒在基层药检单位推广使用,并且用芯片电泳技术取代传统的凝胶电泳,不仅简便快捷,而且采用荧光检测,不需要用溴化乙锭染色,减少了对环境的污染。

参考文献

- 1 LUO Zhi-yong(罗志勇), ZHOU Gang(周刚), ZHOU Si-qing(周肆清). Construction of genomic DNA fingerprinting in *Panax ginseng* and *P. quinquefolium* by AFLP(AFLP法构建人参、西洋参基因组DNA指纹图谱). *Acta Pharm Sin* (药学报), 2000, 35(8): 626
- 2 REN Yue-ying(任跃英), GAO Wei(高巍), GUO Ying(郭影). RAPD analysis of Yellow Fruit and Red Fruit *Panax ginseng* and *P. quinquefolius*(黄果及红果人参、西洋参基因组的RAPD分子标记研究). *J Jilin Agric Univ*(吉林农业大学学报), 2005, 27(1): 39
- 3 CAO Hu(曹晖), LIU Yu-ping(刘玉萍), SHAO Peng-zhu(邵鹏柱). DNA molecular markers: A new method for analysis of Chinese Medicinal Materials(DNA分子标记技术:一种新的中药分析方法). *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志), 1999, 19(5): 355
- 4 DING Jian-mi(丁建弥), WAN Shu-wen(万树文), MEI Qi-chun(梅其春). Distinguishing wild *Panax ginseng* based on RAPD method(用随机扩增多态DNA(RAPD)技术鉴定野山人参). *Chin Tradit Pat Med*(中成药), 2001, 23(1): 3
- 5 CUI Guang-hong(崔光红), TANG Xiao-jing(唐晓晶), HUANG Lu-q(黄璐琦). Application of multiplex allele-specific PCR for authentication of *Panax ginseng* and *P. quinquefolius*(利用多重等位基因特异PCR鉴别人参、西洋参). *China J Chin Mater Med*(中国中药杂志), 2006, 31(23): 1940
- 6 SONG Qin-xin(宋沁馨), LI Zheng-ping(李正平), ZHOU Guo-hua(周国华). Rapid detection of the mutation point of the human p53 Gene Exon 8 by microchip electrophoresis(用芯片电泳快速检测人p53基因外显子8上的突变点). *J China Pharm Univ*(中国药科大学学报), 2003, 34(4): 344
- 7 WANG Wei-peng(汪维鹏), NI Kun-yi(倪坤仪), ZHOU Guo-hua(周国华). Approaches for SNP genotyping(单核苷酸多态性检测方法的研究进展). *Hereditas*(遗传), 2006, 28(1): 117
- 8 SONG Qin-xin(宋沁馨), ZHOU Guo-hua(周国华). Genotyping three human SNPs by Cy5-ddNTP primer extension(用Cy5-ddNTP结合修饰引物延伸测定人类三种SNP). *J China Pharm Univ*(中国药科大学学报), 2006, 37(6): 569

(本文于2007年11月22日收到)