

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2022.07.007

人参实时荧光定量 PCR 鉴定方法的建立

周林^{1,2}, 孙涛^{1,2}, 滕少娜^{1,2}, 陈亭旭^{1,2},
何玲^{1,2}, 刘静远³, 付海滨⁴, 孔德英^{1,2}

1. 重庆海关技术中心, 重庆 400020; 2. 国家中药材物种鉴定及质量安全检测重点实验室, 重庆 400020;
3. 上海海关动植物与食品检验检疫技术中心, 上海 200135; 4. 沈阳海关技术中心, 沈阳 110016

摘要: 根据人参和人参属其他物种的 18S rRNA 基因序列差异设计特异引物和探针, 建立人参 TaqMan 实时荧光 PCR 鉴定方法. 应用该方法测试 58 个样品, 包括 30 个不同来源的人参样品、15 个其他人参属样品以及 13 个形态近似样品. 结果表明: 所有供试的人参样品均表现为阳性扩增, 非人参及空白对照均未出现阳性扩增. 灵敏度检测结果: 此实时荧光 PCR 方法的最低检测限为 0.03 pg/ μ L 反应. 此方法可快速、准确、灵敏地鉴定人参及其加工产品, 适用于口岸进出口鉴定.

关键词: 人参; 实时荧光定量 PCR; 鉴定

中图分类号: S567.5⁺1 **文献标志码:** A

文章编号: 1673-9868(2022)07-0070-06

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Development of Real-Time PCR for Identification of *Panax ginseng*

ZHOU Lin^{1,2}, SUN Tao^{1,2}, TENG Shaona^{1,2}, CHEN Tingxu^{1,2},
HE Ling^{1,2}, LIU Jingyuan³, FU Haibin⁴, KONG Deying^{1,2}

1. Chongqing Customs Technology Center, Chongqing 400020, China;
2. State Key Laboratory for Species Identification and Quality Safety Inspection of Traditional Chinese Medicine, Chongqing 400020, China;
3. Technical Center for Animal, Plant and Food Inspection and Quarantine of Shanghai Customs, Shanghai 200135, China;
4. Shenyang Customs Technology Center, Shenyang 110016, China

Abstract: In this paper, a TaqMan real-time PCR method for identification of *Panax ginseng* was developed with specific primers and probe designed from the 18S ribosomal RNA gene of *P. ginseng*. A total of 58 samples including 30 *P. ginseng* samples of various sources, 15 other *Panax* sp. samples and 13 samples

收稿日期: 2021-05-14

基金项目: 国家重点研发计划项目(2017YFF0210303).

作者简介: 周林, 硕士, 农艺师, 主要从事植物检疫研究.

通信作者: 孔德英, 正高级农艺师.

having similar appearance with *P. ginseng* were tested with the probe and primers for Taq Man real-time PCR. Results showed that typical amplification curves could be obtained from all the 30 *P. ginseng* samples, but not from other 28 samples and blank control. Sensitivity of this method reached to 0.03 pg/ μ L. The established TaqMan real-time PCR technique in this study enables rapid, accurate and sensitive identification of *P. ginseng*, which is suitable for the application for customs surveillance.

Key words: *Panax ginseng*; real-time PCR; identification

人参 *Panax ginseng* 被称为“百草之王”，是我国应用最广泛的名贵中药材，其地理分布有局限性，对生态环境要求甚严，其野生资源由于长期无控制地采挖几近枯竭，被列入《国家重点保护野生药材物种名录》。同时，人参作为馈赠佳品经常被游客携带或邮寄跨境，是海关植物检疫工作中非贸渠道执法时高频截获物之一。由于人参中的俄罗斯联邦种群属于濒危野生动植物种国际贸易公约(CITES)附录 II 中所列物种，因此探索人参种类鉴定方法，积极履行 CITES 公约，有助于保护其濒危野生资源。同时，市面上使用华山参根、商陆根、紫茉莉根、栝兰根等冒充人参的现象屡见不鲜，为人参的鉴定工作增加了很大的难度，因此亟待建立准确快速的人参鉴定技术。

人参类中药的传统鉴定方法主要有基原鉴定、性状鉴定、显微鉴定、理化鉴定和病原鉴定^[1-3]。传统鉴定方法的理论基础建立于分类群的性状特征分析，这些性状特征是与环境紧密相关的表型，受环境影响较大。从分子遗传学角度来看，物种表型的差异归根结底应追溯到其基因型的差异，即 DNA 序列差异^[4]。因此，对基因组序列差异的比较研究无疑为植物分类和鉴定提供了重要依据。

随着分子生物学的迅猛发展，基于 DNA 分子标记技术鉴定中药材的研究应运而生，并取得了快速发展。从 1994 年随机引物 PCR(arbitrarily primed PCR, AP-PCR)首次用于人参、西洋参的鉴别以来^[5]，DNA 分子标记鉴定技术应用于参类药材鉴别已有不少报道，restriction fragment length polymorphism (RFLP)、random amplified polymorphic DNA (RAPD)、amplified fragment length polymorphism (AFLP)、sequence characterized amplified region(SCAR)、single nucleotide polymorphism(SNP)^[6-10]等技术相继应用于参类药材的鉴别鉴定。然而，这些技术存在操作步骤繁琐、工作量大、实验结果重复性差等缺点。

实时荧光定量 PCR 作为基因检测的重要手段，具有操作方便、灵敏、快捷、结果准确的特点^[11-13]。本文开发了一种适用于人参的实时荧光定量 PCR 鉴定方法，以期为我国 CITES 履约、海关执法、市场监管等提供更加科学准确的技术依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试样品包括 30 个人参样品以及其他人参属或形态近似的 16 个物种的 28 个样品，共计 17 种 58 个样品(表 1)。样品经本实验室鉴定后，结合 Internal Transcribed Spacer(ITS)序列测序鉴定确定种名。样品保存于国家中药材物种鉴定及质量安全检测重点实验室。

1.2 试剂与仪器

磁珠法植物基因组 DNA 提取试剂盒购自珠海宝瑞生物公司；Premix Taq © Version 2.0、Premix Ex Taq(Probe qPCR)购自宝生物(大连)有限公司。球磨仪(德国莱驰的 MM400)，全自动核酸提取仪(赛默飞世尔 Kingfisher Duoprime)，实时荧光 PCR 仪(美国 ABI stepone plus)。

1.3 DNA 提取

用 70%酒精对样品进行擦洗，再在无水乙醇中浸泡 5 min，晾干后用球磨仪将样品研磨成粉^[14]。按照磁珠法植物基因组 DNA 提取试剂盒说明书方法进行样品 DNA 提取，提取的 DNA 用 Nanodrop One 超微量核酸蛋白检测仪测定核酸质量和浓度，随后保存于 -20 °C 冰箱备用。

1.4 引物与探针设计

分别比对分析人参属物种及人参常见伪混品的常用备选条码基因及 18S *rRNA* 基因序列, 筛选人参种内保守、种间特异区域. 在 18S *rRNA* 基因序列中, 发现人参在 497 bp 和 501 bp 处为 G 和 C, 其他物种为 C 和 G, 且种内高度保守(图 1). 据此用 Primer Express 3.0 软件设计特异引物探针, 引物为 Pgf(5'-CACGGGGAGGTAGTGACAATA-3')/ Pgr(5'-AGACTTGCCTCCAATGGAT 3'), 探针为 Pgp(FAM-CGGGCTGATTCAGTCT-MGB), 由生工生物工程(上海)股份有限公司合成.

1.5 实时荧光 PCR

PCR 反应体系为 20 μL , 包括 10 μL 2 \times 荧光 PCR 反应预混液, 上下游引物各 0.4 μL (10 $\mu\text{mol/L}$), 探针 0.8 μL (10 $\mu\text{mol/L}$), DNA 模板 4 μL , 灭菌去离子水补至 20 μL .

实时荧光 PCR 反应程序为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s; 然后以 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s 进行 40 个循环. 每个循环中 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s 结束时设置荧光通道采集荧光.

1.6 灵敏度测试

将阳性样品 RS-06 的 DNA 测定核酸浓度后进行 10 倍梯度稀释, 共稀释成 8 个浓度梯度, 然后按照 1.5 中的方法进行实时荧光 PCR 扩增, 测试引物探针的检测灵敏度.

表 1 试验材料及来源

编号	中文名	学名	来源	编号	中文名	学名	来源
RS-01	人参	<i>P. ginseng</i>	韩国	RS-30	人参粉	<i>P. ginseng</i>	同仁堂/北京
RS-02	人参	<i>P. ginseng</i>	韩国	XYS-31	西洋参	<i>P. quinquefolium</i>	吉林露水河
RS-03	人参	<i>P. ginseng</i>	韩国	XYS-32	西洋参	<i>P. quinquefolium</i>	吉林临江
RS-04	人参	<i>P. ginseng</i>	韩国	XYS-33	西洋参	<i>P. quinquefolium</i>	黑龙江鸡西
RS-05	人参	<i>P. ginseng</i>	韩国	XYS-34	西洋参	<i>P. quinquefolium</i>	吉林通化
RS-06	人参	<i>P. ginseng</i>	韩国	XYS-35	西洋参	<i>P. quinquefolium</i>	吉林敦化
RS-07	人参	<i>P. ginseng</i>	韩国	XYS-36	西洋参	<i>P. quinquefolium</i>	美国
RS-08	人参	<i>P. ginseng</i>	朝鲜	XYS-37	西洋参	<i>P. quinquefolium</i>	美国
RS-09	人参	<i>P. ginseng</i>	朝鲜	XYS-38	西洋参	<i>P. quinquefolium</i>	新加坡
RS-10	人参	<i>P. ginseng</i>	朝鲜	XYS-39	西洋参片	<i>P. quinquefolium</i>	美国
RS-11	人参	<i>P. ginseng</i>	朝鲜	XYS-40	西洋参片	<i>P. quinquefolium</i>	美国
RS-12	人参	<i>P. ginseng</i>	新加坡	XYS-41	西洋参片	<i>P. quinquefolium</i>	新加坡
RS-13	人参	<i>P. ginseng</i>	黑龙江七台河	SQ-42	三七	<i>P. notoginseng</i>	老挝
RS-14	人参	<i>P. ginseng</i>	黑龙江鸡西	SQ-43	三七	<i>P. notoginseng</i>	云南文山
RS-15	人参(林下参)	<i>P. ginseng</i>	辽宁淮阴	SQ-44	三七	<i>P. notoginseng</i>	云南文山
RS-16	人参(林下参)	<i>P. ginseng</i>	吉林集安	ZJS-45	竹节参	<i>P. japonicus</i>	重庆巫山
RS-17	人参	<i>P. ginseng</i>	吉林露水河	CMS-46	川明参	<i>Chuanmingshen violaceum</i>	太极集团/四川
RS-18	人参(林下参)	<i>P. ginseng</i>	吉林露水河	XS-47	玄参	<i>Scrophularia ningpoensis</i>	太极集团/四川
RS-19	人参	<i>P. ginseng</i>	吉林通化	CP-48	党参	<i>Codonopsis pilosula</i>	太极集团/甘肃
RS-20	人参(林下参)	<i>P. ginseng</i>	吉林通化	SM-49	丹参	<i>Salvia miltiorrhiza</i>	四川中江
RS-21	人参	<i>P. ginseng</i>	黑龙江宝清	TM-50	天麻	<i>Gastrodia elata</i>	老挝
RS-22	人参	<i>P. ginseng</i>	吉林敦化	SH-51	石斛	<i>Dendrobium nobile</i>	老挝
RS-23	人参	<i>P. ginseng</i>	黑龙江伊春	BZ-52	白芷	<i>Angelica dahurica</i>	四川遂宁
RS-24	人参	<i>P. ginseng</i>	吉林长白	BSS-53	北沙参	<i>Glehnia littoralis</i>	太极集团/河北
RS-25	人参	<i>P. ginseng</i>	黑龙江沾河	HSS-54	华山参	<i>Physochlaina infundibularis</i>	安徽亳州
RS-26	人参	<i>P. ginseng</i>	吉林临江	SL-55	商陆	<i>Phytolacca acinosa</i>	云南昆明
RS-27	人参片	<i>P. ginseng</i>	吉林抚松	ZML-56	紫茉莉	<i>Mirabilis jalapa</i>	广西玉林
RS-28	人参片	<i>P. ginseng</i>	吉林敦东	LL-57	枎兰	<i>Talinum paniculatum</i>	浙江台州
RS-29	人参粉	<i>P. ginseng</i>	吉林白山	JG-58	桔梗	<i>Platycodon grandiflorus</i>	安徽亳州

KC593817.1 P.ginseng	CAAATTACCCAATCCTGACACGGGGAGGIAGTGACAATAA	480
AF107574.1 P.quinquefolius	CAAATTACCCAATCCTGACACGGGGAGGIAGTGACAATAA	460
AB088021.1 P.bipinnatifidus	CAAATTACCCAATCCTGACACGGGGAGGIAGTGACAATAA	480
D84100.1 P.japonicus	CAAATTACCCAATCCTGACACGGGGAGGIAGTGACAATAA	480
AB027525.1 P.notoginseng	CAAATTACCCAATCCTGACACGGGGAGGIAGTGACAATAA	479
AB088026.1 P.pseudoginseng	CAAATTACCCAATCCTGACACGGGGAGGIAGTGACAATAA	479
Consensus	caattaccaatcctgacacggggaggtagtgacaataa	
KC593817.1 P.ginseng	ATAACAATACCGGGCTGATTGAGTCTGGTAATTGGAATGA	520
AF107574.1 P.quinquefolius	ATAACAATACCGGGCTGAGTCTGGTAATTGGAATGA	500
AB088021.1 P.bipinnatifidus	ATAACAATACCGGGCTGATTGAGTCTGGTAATTGGAATGA	520
D84100.1 P.japonicus	ATAACAATACCGGGCTGATTGAGTCTGGTAATTGGAATGA	520
AB027525.1 P.notoginseng	ATAACAATACCGGGCTGATTGAGTCTGGTAATTGGAATGA	519
AB088026.1 P.pseudoginseng	ATAACAATACCGGGCTGATTGAGTCTGGTAATTGGAATGA	519
Consensus	ataacaataccgggct a t agtctggtaattggaatga	
KC593817.1 P.ginseng	GTACAATCTAAATCCCTTAACGAGGATCCATTGGAGGGCA	560
AF107574.1 P.quinquefolius	GTACAATCTAAATCCCTTAACGAGGATCCATTGGAGGGCA	540
AB088021.1 P.bipinnatifidus	GTACAATCTAAATCCCTTAACGAGGATCCATTGGAGGGCA	560
D84100.1 P.japonicus	GTACAATCTAAATCCCTTAACGAGGATCCATTGGAGGGCA	560
AB027525.1 P.notoginseng	GTACAATCTAAATCCCTTAACGAGGATCCATTGGAGGGCA	559
AB088026.1 P.pseudoginseng	GTACAATCTAAATCCCTTAACGAGGATCCATTGGAGGGCA	559
Consensus	gtacaatctaaatcccttaacgaggatccattggagggca	

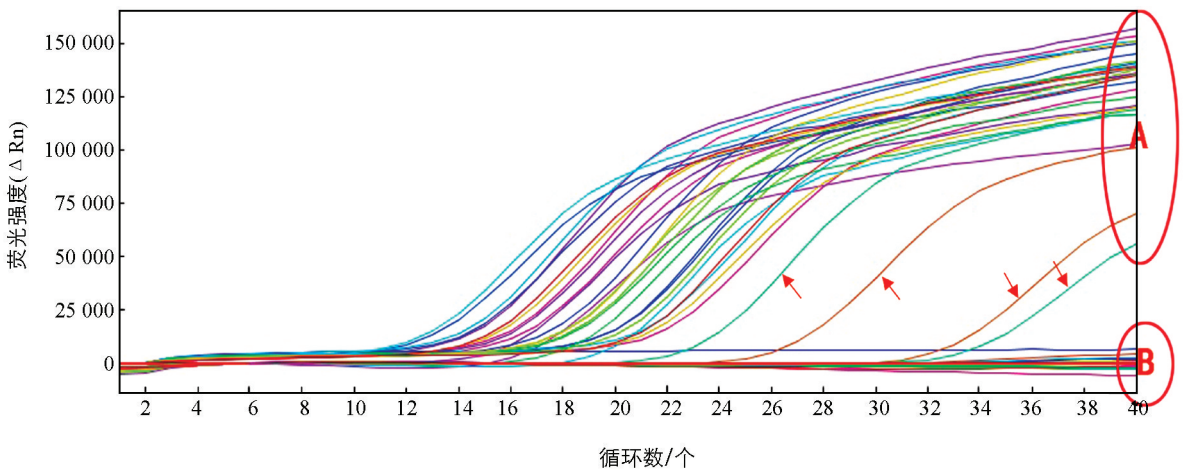
红框处示意人参 18S rRNA 序列在 497 bp 和 501 bp 处为 G 和 C, 其他物种为 C 和 G.

图 1 人参与其他 5 个物种的 18S rRNA 序列比对图

2 结果与分析

2.1 探针特异性

利用设计的引物探针针对 58 份 DNA 样品进行实时荧光 PCR 检测, 结果表明 30 份人参样品 DNA 均有特异扩增曲线, 而供试的其他 28 份样品 DNA 及空白对照均无扩增曲线(图 2). 其中, 4 个人参片/粉剂的 CT 值相对偏高, 可能是因为炮制工艺导致(箭头所示). 结合在美国国家生物技术信息中心(NCBI)中的同源性与特异性比较结果, 说明该引物与探针用于人参检测具有良好的特异性.



A 区: 人参样品; B 区: 非人参样品及空白对照; 箭头所示为 4 个人参片/粉剂(RS27-RS30).

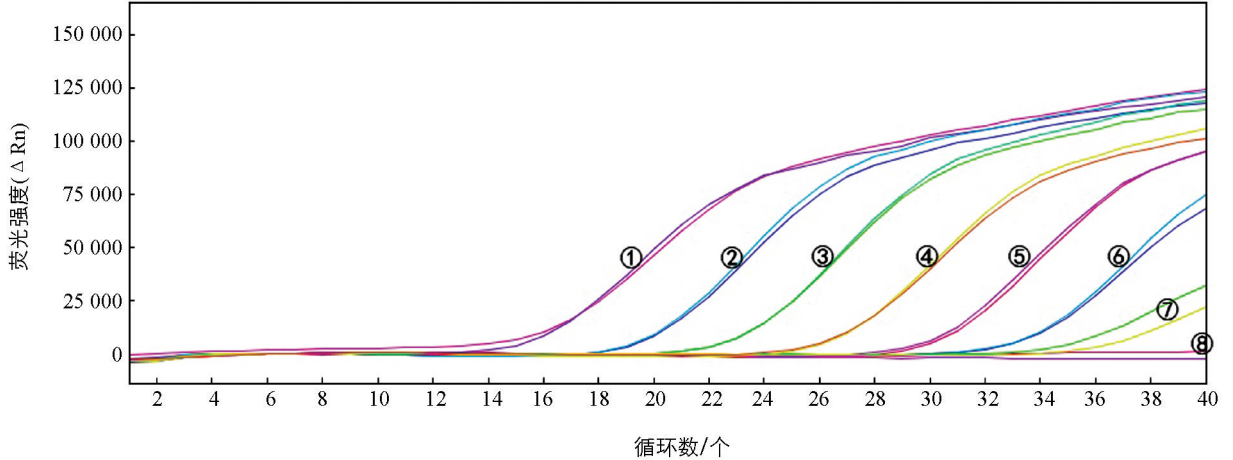
图 2 人参与实时荧光 PCR 特异性扩增结果

2.2 灵敏度检测

用灭菌去离子水将提取的人参(样品编号 RS-06)DNA(初始浓度为 3.04×10^4 pg/ μ L)10 倍梯度稀释成 8 个系列梯度, 稀释后浓度分别为 3.04×10^4 pg/ μ L \sim 3.04×10^{-3} pg/ μ L, 取 4 μ L 作为模板用于灵敏度检测, 结果表明 DNA 原液及 $10^1 \sim 10^6$ 倍稀释液样品均得到典型的扩增曲线(图 3).

DNA 浓度从 3.04×10^4 pg/ μ L \sim 3.04×10^{-2} pg/ μ L 对应的 CT 值分别为 17.11, 19.95, 23.08, 26.67, 30.3, 33.63, 36.74. 以扩增曲线的 CT 值为纵坐标, 相应浓度为横坐标, 绘制标准曲线(图 4). 所得线

性方程为 $y = -3.375x + 40.275$, 标准曲线相关系数为 0.997, 扩增效率为 97.83%, 最低检测限是 0.03 pg/ μL 反应。



①~⑧分别为初始浓度 3.04×10^4 pg/ μL 的 8 级 10 倍稀释 DNA 样品的扩增曲线。

图 3 实时荧光 PCR 检测人参灵敏度

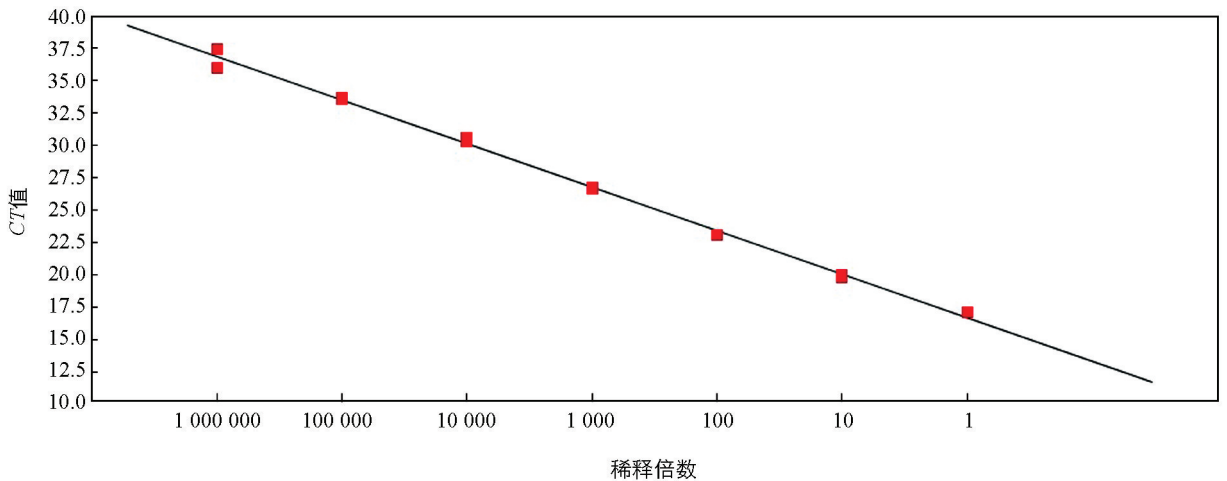


图 4 人参实时荧光 PCR 扩增标准曲线

3 结论与讨论

传统的中药材鉴定手段由于易受环境条件的影响或植物本身的限制, 人为干扰因素较多, 无法直接体现种质的遗传特征, 难以快速得到准确的结果。DNA 分子鉴定技术因其准确性和客观性, 在中药材鉴定中的应用越来越受到人们的重视。DNA 条形码分子鉴定法是利用基因组中一段公认的、相对较短的 DNA 序列来进行物种鉴定的一种 DNA 分子鉴定技术, 具有适应性广、样品用量少、结果准确性高及可重复性好等优点^[15-17]。然而, 一些中药材在生产过程中的加工工艺会引起 DNA 的严重降解, 提取到的 DNA 往往浓度较低、质量较差, 且易含较多的 PCR 抑制剂^[18-19], 这时使用 DNA 条形码鉴定法较难取得理想的效果。本研究中的样品 RS-29 和 RS-30 人参粉产品, 利用普通 PCR 进行 ITS 序列扩增时发现条带较弱, 送样后因浓度较低无法测序, 但利用实时荧光 PCR 检测时却有典型的扩增曲线, CT 值分别为 32.95 和 33.42, 说明实时荧光定量 PCR 较普通 PCR 能更好地克服中药材 DNA 部分降解造成的缺陷。

本研究通过 BLAST 序列比对, 选取人参 18S rRNA 序列, 设计开发了人参特异性引物探针。该引物探针可将其他人参属中药材和市场上常见伪品与人参进行区分, 表现出良好的特异性。李忠华等^[20] 根据人参的 5.8S rRNA 及 ITS2 序列与常见近源物种的差异设计引物探针, 研究了人参的实时荧光定量 PCR 鉴定, 其灵

敏度达到 1 pg/ μ L 反应. 本研究的实时荧光定量 PCR 法灵敏度达到 0.03 pg/ μ L 反应, 灵敏度有所提高.

本方法的建立有助于人参及其加工品被快速、准确、灵敏地鉴定, 也可有效地区分形态近似的伪混品, 可在实际应用中推广, 以期为人参药材鉴定、市场监管等提供更加科学准确的依据. 同时, 本方法的建立有助于进一步规范出入境人参的监管, 为口岸快速、准确地鉴定提供依据, 对防止人参种质资源流失, 维护我国物种资源安全有着重要的意义.

参考文献:

- [1] 杨慧洁, 杨世海, 张淑丽, 等. 药用植物 DNA 条形码研究进展 [J]. 中草药, 2014, 45(18): 2581-2587.
- [2] 王凯, 巢建国, 谷巍, 等. 不同育苗方式对丹参种苗形态、农艺性状及生理生化指标的影响 [J]. 南方农业学报, 2020, 51(1): 162-168.
- [3] 何洁, 梁霜, 张国俊, 等. 太子参叶斑病病原鉴定及室内药剂筛选 [J]. 南方农业学报, 2021, 52(8): 2124-2132.
- [4] 孙涛, 滕少娜, 孔德英, 等. DNA 条形码技术应用于人参鉴定 [J]. 中国生物工程杂志, 2013, 33(4): 143-148.
- [5] CHEUNG K S, KWAN H S, BUT P P, et al. Pharmacognostical Identification of American and Oriental Ginseng Roots by Genomic Fingerprinting Using Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction (AP-PCR) [J]. Journal of Ethnopharmacology, 1994, 42(1): 67-69.
- [6] JO I H, KIM Y C, KIM D H, et al. Applications of Molecular Markers in the Discrimination of *Panax* Species and Korean Ginseng Cultivars (*Panax ginseng*) [J]. Journal of Ginseng Research, 2017, 41(4): 444-449.
- [7] LI Y, YING Y X, ZHAO D Y, et al. Microbial Community Diversity Analysis of *Panax ginseng* Rhizosphere and Non-Rhizosphere Soil Using Randomly Amplified Polymorphic DNA Method [J]. Open Journal of Genetics, 2012, 2(2): 95-102.
- [8] KIM B B, JEONG J H, JUNG S J, et al. Authentication of Korean *Panax* Ginseng from Chinese *Panax ginseng* and *Panax quinquefolius* by AFLP Analysis [J]. Journal of Plant Biotechnology, 2005, 7(2): 81-86.
- [9] WANG J, HA W Y, NGAN F N, et al. Application of Sequence Characterized Amplified Region (SCAR) Analysis to Authenticate *Panax* Species and Their Adulterants [J]. Planta Medica, 2001, 67(8): 781-783.
- [10] WANG H T, LI G S, KWON W S, et al. Development of EST Intron-Targeting SNP Markers for *Panax ginseng* and Their Application to Cultivar Authentication [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2016, 17(6): 884.
- [11] EISCHEID A C. A Method to Detect Allergenic Fish, Specifically Cod and Pollock, Using Quantitative Real-Time PCR and COI DNA Barcoding Sequences [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2019, 99(5): 2641-2645.
- [12] MINKUS C L, BISPO P J M, PAPALIODIS G N, et al. Real-Time Multiplex PCR Analysis in Infectious Uveitis [J]. Seminars in Ophthalmology, 2019, 34(4): 252-255.
- [13] 龚美蓉, 陈凤丽, 曹晨, 等. 实时荧光定量 PCR 技术及其在中医药研究中的应用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(22): 238-241.
- [14] 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): 747-754.
- [15] 吴亚男, 许亮, 王冰. DNA 条形码技术对药用植物的鉴定研究进展 [C]. 沈阳: 第十届中国中药鉴定学教学研讨会暨第十三届全国中药标本馆学术研讨会论文集, 2014.
- [16] GASTON K J, O'NEILL M A. Automated Species Identification: Why Not? [J]. Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences, 2004, 359(1444): 655-667.
- [17] 陈念, 付晓燕, 赵树进, 等. DNA 条形码: 物种分类和鉴定技术 [J]. 生物技术通讯, 2008, 19(4): 629-631.
- [18] 许腊英, 夏险峰, 毛维伦. 中药苍术炮制前后 DNA 指纹图谱研究 [J]. 中成药, 2006, 28(5): 674-676.
- [19] EASPARRO B, SOLDAT S, PROCTOR C, et al. Plant PCR Inhibitor Release as a Function of Sample Dissociation Method in Different Tissue Types of *Ocimum basilicum* [J]. The FASEB Journal, 2018, 32(S1): 522.
- [20] 李忠华, 杨宝, 马宁, 等. 人参实时荧光定量 PCR 快速鉴别方法 [J]. 山西大学学报(自然科学版), 2021, 44(3): 609-616.