

覆盆子及其近缘混淆品的 PCR-RFLP 鉴别研究

郑诚¹, 留钰秀², 袁莉霞², 吴瑶², 王杰¹, 傅杨群³, 彭昕^{1*} (1.宁波市中医院, 浙江 宁波 315016; 2.浙江药科职业大学, 浙江 宁波 315100; 3.浙江大成药业有限公司, 浙江 金华 322300)

摘要: 目的 建立一种覆盆子特异性的分子鉴别方法。方法 通过对覆盆子及其混淆品的 ITS 序列进行测序分析, 根据差异位点设计限制性内切酶, 采用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性方法(polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP)进行鉴别, 建立并优化 PCR 鉴别方法, 并对其稳定性和适用性进行考察与验证。结果 设计的引物可实现对覆盆子及其混淆品序列的扩增, 扩增产物为 800 bp 大小的条带, 通过对限制性内切酶 MboI 进行酶切后的片段长度进行分析, 仅覆盆子的序列可被酶切形成 2 个片段, 而混淆品的序列不能被切开, 从而特异性鉴别是否为覆盆子。结论 本实验建立的 PCR-RFLP 方法可用于鉴别覆盆子。

关键词: 覆盆子; 混淆品; 聚合酶链反应-限制性片段长度多态性; 分子鉴定

中图分类号: R282.5 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2022)11-1458-06

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2022.11.010

引用本文: 郑诚, 留钰秀, 袁莉霞, 等. 覆盆子及其近缘混淆品的 PCR-RFLP 鉴别研究[J]. 中国现代应用药学, 2022, 39(11): 1458-1463.

Identification of *Rubus Chingii* Hu and Its Related Confounders by PCR-RFLP

ZHENG Cheng¹, LIU Yuxiu², YUAN Lixia², WU Yao², WANG Jie¹, FU Yangqun³, PENG Xin^{1*} (1.Ningbo Traditional Chinese Medicine Hospital, Ningbo 315016, China; 2.Zhejiang Pharmaceutical Vocational University, Ningbo 315100, China; 3.Zhejiang Dacheng Pharmaceutical Co., Ltd., Jinhua 322300, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a specific molecular identification method for *Rubus chingii* Hu. **METHODS** The ITS sequences of *Rubus chingii* Hu and its adulterants were sequenced and analyzed. A restriction enzyme was screened according to the variation sites of sequence analysis results. Subsequently, polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism PCR-RFLP method was established and optimized to distinguish *Rubus chingii* Hu and its adulterants, the stability and applicability of the method was investigated and verified. **RESULTS** The designed primers could amplify the sequences of *Rubus chingii* Hu and its adulterants to produce a 800 bp specific fragment. MboI restriction endonuclease could only digest the amplified fragment of *Rubus chingii* Hu into two smaller pieces and could not digest the amplified fragment of the adulterants. In this way, *Rubus chingii* Hu was identified specifically. **CONCLUSION** The PCR-RFLP method established in this study can be used to identify the authenticity of *Rubus*(PCR-RELP) *chingii* Hu.

KEYWORDS: *Rubus chingii* Hu; adulterants; polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism(PCR-RELP); molecular identification

覆盆子是新“浙八味”药材之一, 中国药典中记录其来源为蔷薇科悬钩子属植物华东覆盆子 *Rubus chingii* Hu 的干燥未成熟果实^[1]。它属药食同源品种, 具有益肾固精缩尿、养肝明目的功效, 是一味传统补肾中药, 也是五子衍宗丸等经典名方的主要组成。在现代中医临床上, 常用于治疗遗尿尿频, 阳痿早泄, 头晕眼花等肾精亏虚病症。

华东覆盆子与其同属多种植物(茅莓、寒莓、插田泡、高粱泡、蓬蘽等)的地上部分, 尤其是果实形态非常接近, 极易混淆, 在生产和临床应用中误采误用或掺杂混用等现象时有发生, 为确保临床用药安全有效, 对覆盆子药材基原植物的鉴

定对保证药材质量至关重要。目前关于华东覆盆子的研究多集中在药理药效、化学组分等方面^[2-3], 对其物种的鉴定方面研究甚少。传统的中药鉴定方法包括性状鉴定、显微鉴定及理化鉴定等, 但植物经加工炮制后, 失去原来的外观特征, 显微特征也有不同程度的破坏, 难以准确鉴别真伪。近年来, 随着分子生物学技术的发展, DNA 指纹检测技术被用于中药的鉴别, 其直接利用特征 DNA 序列的变异进行物种的鉴定, 不受生长发育阶段、供试部位、环境条件的影响, 具有高度准确性, 且经优化后实验过程标准化, 操作简单快速, 样品用量少^[4]。吕群丹等^[5]探索了 ITS2 条形

基金项目: 磐安县重大科技项目(201901)

作者简介: 郑诚, 女, 主管药师 E-mail: 354570149@qq.com

*通信作者: 彭昕, 女, 博士, 教授 E-mail: pengx@nit.zju.edu.cn

码序列分析在搁公扭根(掌叶覆盆子根)及其易混种高粱泡、山莓、蓬蘽、茅莓、三花悬钩子和武夷悬钩子等分子鉴别中的应用, NJ 进化树中覆盆子序列单独聚为一支, 可与其他物种成功区分。然而该方法需要 DNA 测序, 成本高, 耗时长, 难以满足基层快检的需求。聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP)鉴别法是在 PCR 的基础上, 通过特异性酶切后的 DNA 条带特征进行鉴别, 进一步检测其种属来源, 已应用于鹿茸^[6]、天麻^[7]、霍山石斛^[8]等药材的鉴定与质量评价相关研究。本研究拟建立简便稳定的华东覆盆子的 PCR-RFLP 鉴别方法, 为覆盆子的质量控制提供一种新的分析方法。

1 材料

1.1 仪器

GeneAmp 9700 型 PCR 仪(美国 Applied Biosystem 公司); Veriti 96 孔热循环仪(美国 Applied Biosystems); Gel Doc XR+凝胶成像系统、Bio-Rad 电源及电泳仪均来自美国 Bio-Rad; 紫外凝胶成像系统(美国 Protein Simple 公司); Milli-Q 纯水仪(Millipore 公司); Nano Value 微量紫外分光光度计(美国 GE)。Epoch 超微量核酸测定仪(美国 BioTek)。

1.2 药品与试剂

Ezup 柱式超级植物基因组 DNA 提取试剂盒(上海生工); 100bp Plus DNA Ladder、2×EasyTaq® PCR SuperMix(北京全式金); 50002 琼脂糖(瑞士 Lonza); 其他试剂均为分析纯。实验所用样品由各地收集, 经浙江省中药研究所王志安教授级高工鉴定为表 1 中各实验材料的干燥未成熟果实。

表 1 药材来源信息

Tab. 1 Source information of medicinal materials

编号	材料名称	拉丁名	批次	来源
1	覆盆子	<i>R. chingii</i> Hu	20	浙江淳安、磐安、丽水、景宁, 江西上饶、樟树等
2	周毛悬钩子	<i>R. amphidasys</i> F.	3	浙江磐安, 安徽休宁
3	木莓	<i>R. swinhoei</i> H.	2	浙江金华
4	寒莓	<i>R. buergeri</i> Miq.	2	浙江磐安
5	蓬蘽	<i>R. hirsutus</i> T.	4	浙江金华、宁波、磐安
6	茅莓	<i>R. parvifolius</i> L.	4	浙江磐安、宁波、丽水
7	高粱泡	<i>R. lambertianus</i> Ser.	2	浙江衢州
8	太平莓	<i>R. pacificus</i> H.	1	浙江临安
9	树莓	<i>R. idaeus</i> L.	2	浙江宁波
10	插田泡	<i>R. coreanus</i> Miq.	2	浙江磐安

2 方法

2.1 样品基因组 DNA 提取及 PCR 扩增

取华东覆盆子与其同属多种植物(表 1)的干燥果实约 0.5 g 于研钵中, 加液氮研成细粉, 小心快速转入 2 mL 离心管中, 而后采用 Ezup 柱式超级植物基因组 DNA 提取试剂盒提取基因组总 DNA, 其余步骤按照试剂盒说明书进行。上游引物 ITSF: 5'-CCTTATCATTAGAGGAAGGAG-3'; 下游引物 ITSr: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'。25 μL PCR 反应体系包括: 2×EasyTaq PCR SuperMix、20 μmol·L⁻¹ 引物, DNA 模板 2 μL, PCR 反应程序为 95 °C 变性 30 s, 50 °C 退火 40 s, 72 °C 延伸 30 s, 35 个循环, 最后 72 °C 延伸 5 min, 得到 PCR 产物。

2.2 差异限制性酶切位点的获得

对表 1 中样品 PCR 产物进行测序分析, 利用 MEGA 5.1 软件进行同源对齐, 手动矫正后利用 BioXM 2.7 软件分析覆盆子和其他混淆品的 SNP 位点, 设计出鉴别覆盆子的特异性限制性内切酶 MboI。

2.3 RFLP 分析

取表 1 中样品 PCR 产物进行 RFLP 分析, 反应总体积为 20 μL, 反应体系包括 10×酶切缓冲液 2.0 μL(含 10 mmol·L⁻¹ 三羟甲基氨基甲烷-盐酸, 100 mmol·L⁻¹ 氯化钾, 1 mmol·L⁻¹ 乙二醇四乙酸, 0.2 mg·mL⁻¹ 牛血清白蛋白, 50%甘油, 0.05%溴酚蓝), PCR 反应液 17.5 μL, MboI(10 U·μL⁻¹)0.5 μL。酶切反应 37 °C 水浴反应 10 min。取反应产物 5 μL, 加入 6×Loading buffer 2 μL, 混匀后于 GelStain 染色的 1.5%琼脂糖凝胶电泳检测, Gel Doc XR+凝胶成像系统成像。

2.4 条件考察

在确定引物对相应覆盆子药材的特异性 PCR 条件后, 对可能影响 PCR 鉴别准确性和稳定性的主要条件进行考察, 包括循环数、退火温度、DNA 模板量、酶切时间。

3 结果

3.1 差异限制性酶切位点的获得

通过对覆盆子和其他混淆品的 ITS 序列比对分析, 发现覆盆子与其混淆品在 ITS 序列第 171 bp 左右处存在 1 个 SNP 位点, 其中覆盆子为 MboI 限制性内切酶识别序列(5'...[^]GATC...3'), 而其他混淆品在该段序列中均无该酶识别位点, 见图 1, 通过特异性酶切可以使得覆盆子 ITS 序列被切开,

混淆品无法切开。对凝胶电泳条带进行区分,覆盆子酶切后产生 2 条大小分别为 171 bp 和约 600 bp 的条带,而其他近缘种仍为 800 bp 左右大小的一条带。

3.2 条件考察结果

3.2.1 循环数 取覆盆子及其混淆品,使用覆盆子鉴别引物进行 PCR 扩增。设定不同的循环数进行扩增,结果在 25 和 30 循环时条带较黯淡,35 循环时所有样品均扩增获得较明亮条带,最终确定循环数 35 进行鉴别反应。结果见图 2。

3.2.2 退火温度 取覆盆子及其混淆品,使用覆盆子鉴别引物进行 PCR 扩增。分别设定退火温度为 36~60 ℃进行 PCR 反应,结果 36, 60 ℃时扩增的条带黯淡,52, 44 ℃下条带均较亮。为减少非特异条带扩增,最终确定 52 ℃作为 PCR 退火温度。结果见图 3。

3.2.3 DNA 模板量 取覆盆子及其混淆品提取的 DNA,稀释成不同浓度。使用覆盆子鉴别引物进行 PCR 扩增,设定 PCR 循环数为 35,退火温度

为 52 ℃进行 PCR 扩增,DNA 模板量为 10 ng 时,PCR 扩增量小,条带不清晰;PCR 体系中 DNA 模板量>20 ng 时,均能扩出较明亮条带,因此选择 20 ng 为最佳模板量。结果见图 4。

3.2.4 酶切时间 在确定 PCR 条件的同时,对酶切条件进行了考察,取覆盆子及混淆品各 2 个进行 PCR 扩增,并取扩增产物进行酶切反应,取 MboI 限制性内切酶进行酶切,设定酶切时间为 5~20 min,结果不同酶切时间下混淆品均不能酶切,为约 800 bp 的单一条带,而覆盆子均被酶切为 2 条带,主带大小约 600 bp。为达到最佳酶切效果,取 10 min 作为酶切时间。结果见图 5。

3.2.5 PCR 扩增重复性考察 取 3 批覆盆子及混淆品样品,提取 DNA,经 10 次 PCR 扩增试验以考察 PCR 体系的重复性。电泳结果皆一致,说明此方法重复性好。结果见图 6,考察结果见表 2。

3.3 方法适用性考察

采用上述优化体系,对收集的覆盆子及混淆品样品进行扩增,不同样品均可产生约 800 bp 条

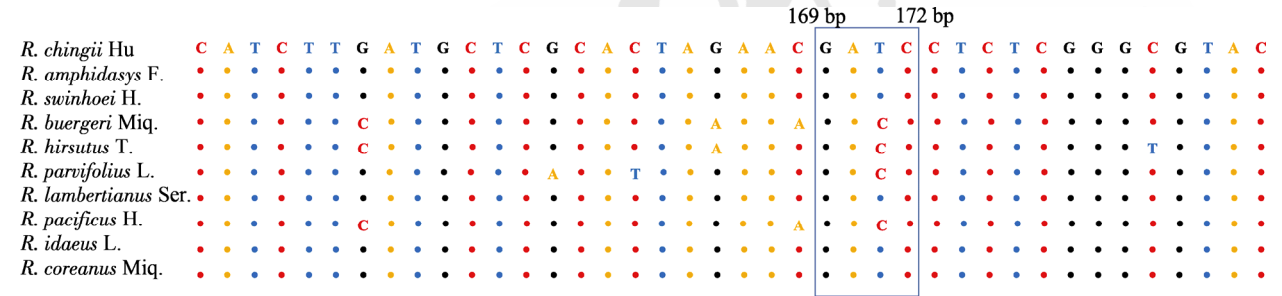


图 1 覆盆子 PCR-RFLP 引物设计位点
Fig. 1 Design site of PCR-RFLP primer for *R. chingii* Hu

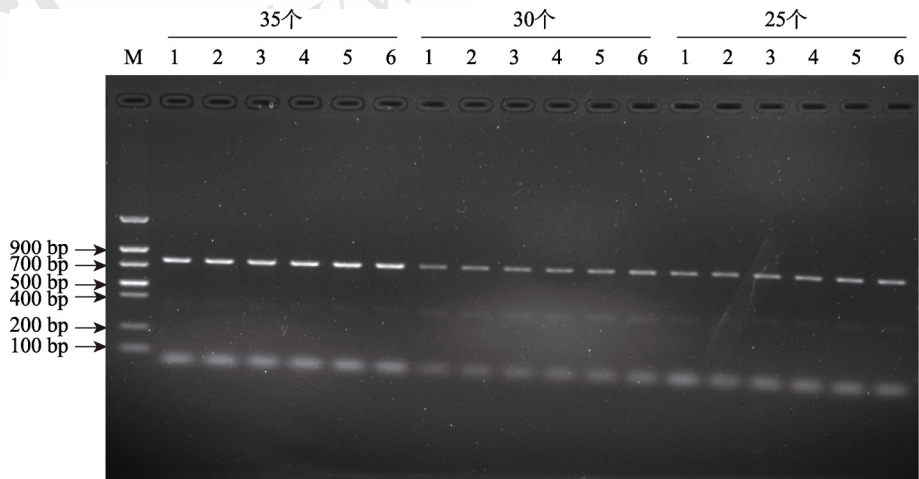


图 2 不同循环数对覆盆子、蓬蘽和树莓 ITS 序列 PCR 扩增结果的影响
M-marker; 1~2-覆盆子; 3~4-蓬蘽; 5~6-树莓。

Fig. 2 Effects of different cycle numbers on PCR identification results of *R. chingii* Hu, *R. hirsutus* T. and *R. idaeus* L.
M-marker; 1~2-*R. chingii* Hu; 3~4-*R. hirsutus* T.; 5~6-*R. idaeus* L..

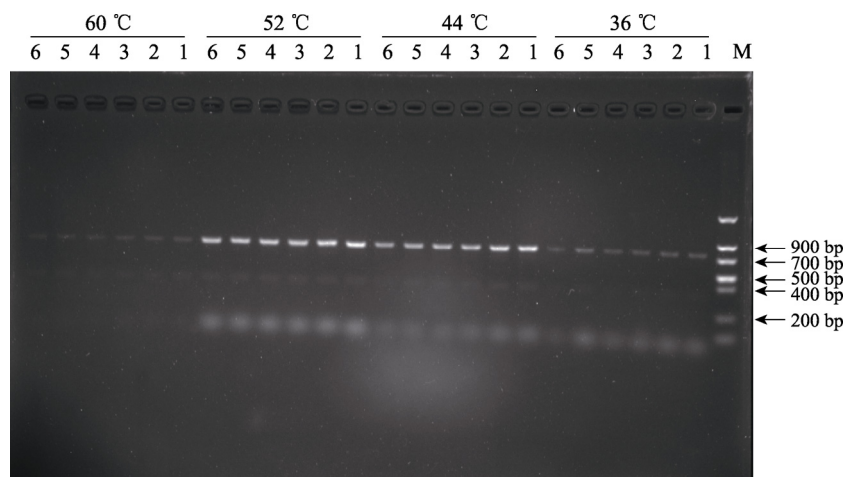


图3 不同退火温度对覆盆子、蓬蘽和树莓 ITS 序列 PCR 鉴别扩增结果的影响

M-marker; 1~2-覆盆子; 3~4-蓬蘽; 5~6-树莓。

Fig. 3 Effects of different annealing temperatures on PCR identification results of *R. chingii* Hu, *R. hirsutus* T. and *R. idaeus* L.
M-marker; 1~2-*R. chingii* Hu; 3~4-*R. hirsutus* T.; 5~6-*R. idaeus* L..

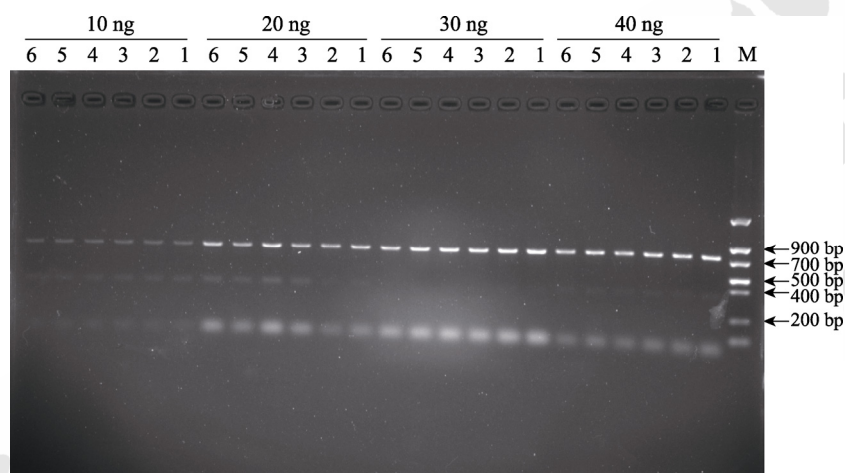


图4 不同模板量对覆盆子、蓬蘽和树莓 ITS 序列 PCR 鉴别结果的影响

M-marker; 1~2-覆盆子; 3~4-蓬蘽; 5~6-树莓。

Fig. 4 Effects of different template amounts on PCR identification results of *R. chingii* Hu, *R. hirsutus* T. and *R. idaeus* L.
M-marker; 1~2-*R. chingii* Hu; 3~4-*R. hirsutus* T.; 5~6-*R. idaeus* L..

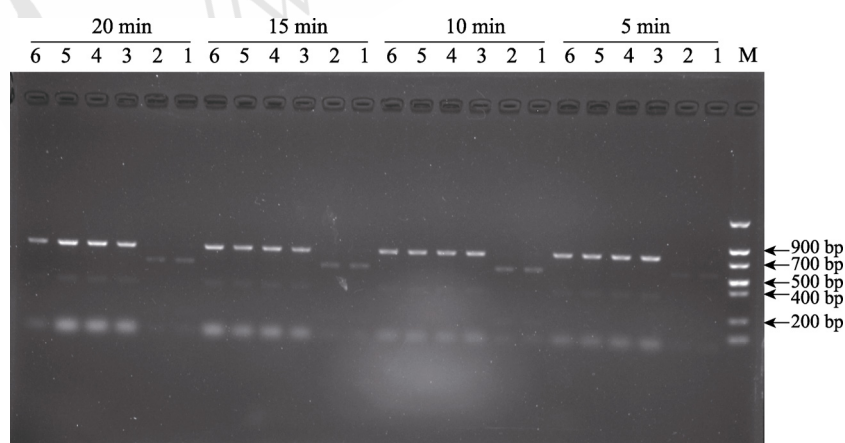


图5 不同酶切时间对覆盆子、蓬蘽和树莓 ITS 序列 PCR 鉴别结果的影响

M-marker; 1~2-覆盆子; 3~4-蓬蘽; 5~6-树莓。

Fig. 5 Effects of different enzyme digestion time on PCR identification of *R. chingii* Hu, *R. hirsutus* T. and *R. idaeus* L.
M-marker; 1~2-*R. chingii* Hu; 3~4-*R. hirsutus* T.; 5~6-*R. idaeus* L..

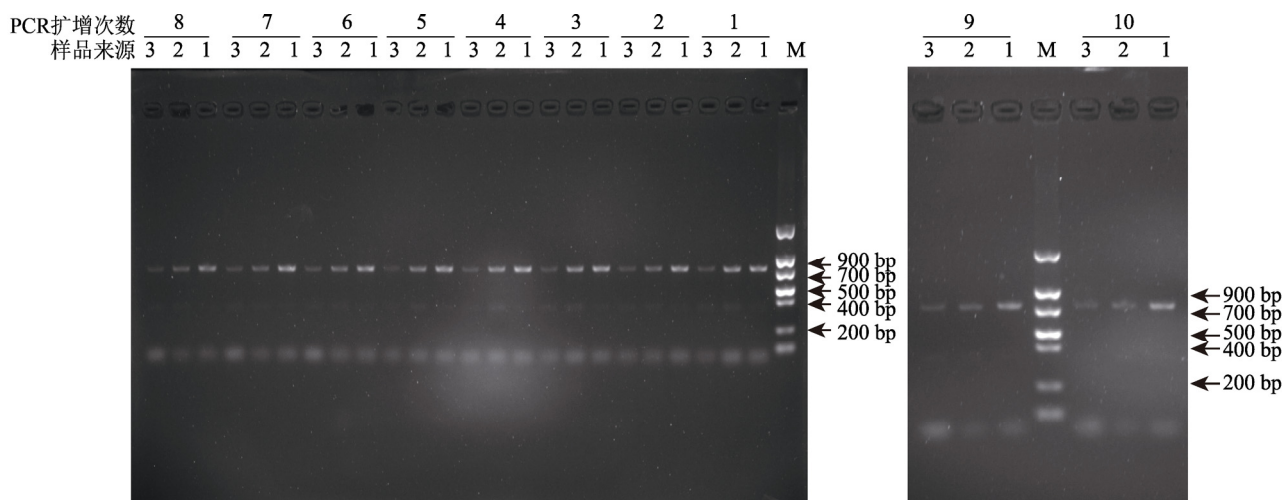


图 6 PCR 扩增重复性考察电泳结果

M-marker; 1-覆盆子; 2-蓬蘽; 3-树莓。

Fig. 6 Electrophoretic results of PCR amplification repeatability test

M-marker; 1-*R. chingii* Hu; 2-*R. hirsutus* T.; 3-*R. idaeus* L..

表 2 覆盆子 PCR-RFLP 条件考察结果

Tab. 2 Investigation results of PCR-RFLP conditions of *R. chingii* Hu

参数	参数值	最优条件
循环数	25, 30, 35	35
退火温度/°C	36, 44, 52, 60	52
DNA 模板量/ng	10, 20, 30, 40	20
酶切时间/min	5, 10, 15, 20	10

带,经 MboI 酶切后,覆盆子产生大小约为 170 bp 和 600 bp 的 2 条带,而混淆品均无法酶切,表明本方法能稳定、准确地鉴别覆盆子。典型图谱见图 7。

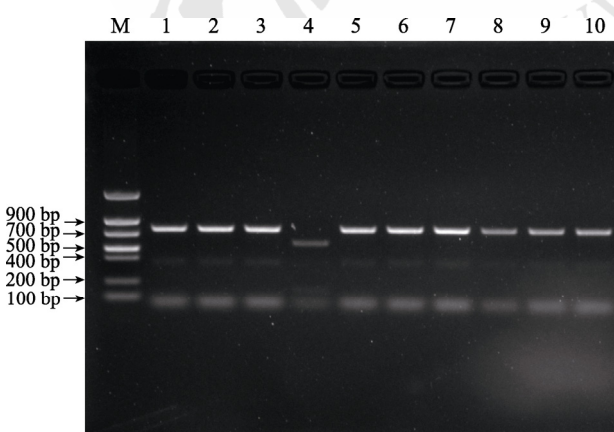


图 7 覆盆子及其混淆品典型鉴别图谱

M-marker; 1-周毛悬钩子; 2-木莓; 3-寒莓; 4-覆盆子; 5-蓬蘽; 6-茅莓; 7-高粱泡; 8-太平莓; 9-树莓; 10-插田泡。

Fig. 7 Typical identification atlas of *R. chingii* Hu and its adulterants

M-marker; 1-*R. amphidasys* F.; 2-*R. swinhoei* H.; 3-*R. buergeri* Miq.; 4-*R. chingii* Hu; 5-*R. hirsutus* T.; 6-*R. parvifolius* L.; 7-*R. lambertianus* Ser.; 8-*R. pacificus* H.; 9-*R. idaeus* L.; 10-*R. coreanus* Miq..

4 讨论

中医药是我国在国际上具有竞争力并拥有独立知识产权的产业,然而中药掺杂违禁的问题成为了影响其品质的一大问题。中药材传统的鉴定手段大多依据其外部形态、显微结构或理化鉴别,但由于植物经过产地粗加工和饮片炮制后,难以看出其本身的形状和颜色,显微特征也有不同程度的破坏,鉴别结果主观性强。理化鉴别只适于区分化学成分有明显差异的伪品,而化学成分容易受到品种、产地、生长周期、贮存条件、炮制方法、运输方式等一系列的影响,所以传统方法存在一定的局限性。

以 DNA 分子标记为代表的分子鉴定方法近年来逐渐应用于中药材分子的真伪鉴别,“中药材 DNA 条形码分子鉴定法指导原则”首次收载于中国药典 2015 年版,标志着中药材的分子鉴定由实验室科研层面进入国家标准的应用层面。目前使用的 DNA 分子标记^[1]主要包括随机扩增多态性 DNA、简单重复序列间区多态性、PCR-RFLP、DNA 条形码技术等,不受环境因素、生长发育阶段、供试部位的影响,且具有快速、微量、特异性强以及操作简便的特点^[9]。与传统鉴别相比,分子鉴别也存在一些问题。例如,随机扩增多态性 DNA 与简单重复序列间区多态性的稳定性较差;DNA 条形码技术等则需要测序仪等大型仪器等。

中药覆盆子为我国常用中药材,由于悬钩子属内物种较多、表观特征类似,因此鉴别非常困难,易混品众多,误用和混用现象严重,给用药

安全带来极大的隐患。目前对悬钩子属植物的分类鉴别研究较多,李昌吉等^[10-12]依据果实外形、组织结构和粉末显微等性状特征对覆盆子及常见的混淆品如茅莓、插田泡、山莓等进行了传统鉴别。向雪姣等^[13]建立了基于腺毛和草酸钙结晶等性状和显微特征鉴别覆盆子与山莓的方法。方洁等^[14]测定了掌叶覆盆子及高粱泡、山莓等5种常见同属易混种 ITS2 序列,并基于序列构建 NJ 进化树实现了 24 份市售覆盆子药材的鉴定。然而以上方法均需进行 DNA 测序,成本高,鉴别时间长,因此迫切需要尝试进一步挖掘新方法,以满足覆盆子分子鉴别准确、快速、高通量、低成本的要求。

本研究根据覆盆子及其混淆品的测序结果筛选 SNP 位点设计了 PCR-RFLP 鉴别方法,并分别对影响特异性鉴别的 PCR 反应条件和反应程序中的关键因素进行了考察,确定了最优 PCR 鉴别条件,建立覆盆子特异性 PCR 鉴别方法。本方法无需 DNA 测序,效率高、成本低、稳定且特异性强,可为覆盆子鉴别提供一种新的途径。

REFERENCES

- [1] 中国药典. 一部[S]. 2020: 附录 73-74.
- [2] KOWALSKA K, OLEJNIK A, ZIELIŃSKA-WASIELICA J, et al. Raspberry (*Rubus idaeus* L.) fruit extract decreases oxidation markers, improves lipid metabolism and reduces adipose tissue inflammation in hypertrophied 3T3-L1 adipocytes[J]. J Funct Foods, 2019(62): 103568.
- [3] MAO J H, CHEN Z J, FANG J, et al. Rapid determination of six tannins in Chinese medicinal materials based on UPLC-MS/MS[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2021, 38(9): 1055-1059.
- [4] PENG X, WU X R, JI Q Y, et al. Molecular authentication of *Tetrastigma hemsleyanum* from its adulterant species using ISSR, CAPS, and ITS2 barcode[J]. Mol Biol Rep, 2016, 43(8): 785-794.
- [5] LV Q D, FANG J, PAN J J, et al. Identification of traditional She medicine Gegongniugen and its confusable species of genus *Rubus* using ITS2 barcode[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2018, 49(13): 3102-3109.
- [6] XU Y, SHAO B Y, XU N. An experimental study on the identification of sika deer antler and cervus pilose antler by PCR-RFLP[J]. Chin Pharm J(中国药理学杂志), 2020, 55(24): 2021-2028.
- [7] LI H, QIAN R, TIAN N. Identification of *Gastrodia elata* and its hybrid by polymerase chain reaction[J]. Chin J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2020, 45(15): 3666-3671.
- [8] HU C, ZHANG Y Z, YUAN Y, et al. Molecular identification of *Dendrobiumhuoshanense* by PCR-RFLP analysis[J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2020, 40(12): 2109-2115.
- [9] JIANG C, HUANG L Q, YUAN Y, et al. Comparison of several methods and their progresses on molecular authentication of *Lonicera japonica* thunb[J]. Mod Tradit Chin Med Mater Mater World Sci Technol(世界科学技术-中医药现代化), 2014, 16(8): 1831-1839.
- [10] 李昌吉. 覆盆子与其伪品山莓的鉴别[J]. 中国药理学杂志, 1988, 23(1): 18.
- [11] 赵建邦, 张洁, 杨静. 覆盆子及其4种混淆品的性状鉴别[J]. 中药材, 1995, 18(5): 508.
- [12] 杨静, 赵建邦, 张洁. 覆盆子及4种混淆品的显微鉴别[J]. 中药材, 1996, 19(9): 449-450.
- [13] XIANG X J, YANG Y M, ZHENG X D, et al. Pharmacognostic identification of *Rubus chingii* fructus and *Rubus corchorifolius* fructus[J]. J Tradit Chin Vet Med(中兽医医药杂志), 2019, 38(6): 54-56.
- [14] FANG J, LYU Q D, CHEN Z D, et al. Identification of commercially available rubi fructus based on DNA barcoding technology[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2020, 37(4): 437-442.

收稿日期: 2021-08-17
(本文责编: 李艳芳)