

安全监测

利用多重连接探针扩增结合熔解曲线法
鉴别人参与西洋参中掺杂的研究*王文斌^{1 2} 莫静³ 胡志刚² 杜巍^{4 **} 汪波^{1 **}

(1. 湖北省药品监督管理局药品质量检验研究院, 国家药品监督管理局中药质量控制重点实验室, 武汉 430075; 2. 湖北中医药大学, 武汉 430065;
3. 湖北大学生命科学学院, 武汉 430062; 4. 武汉大学生命科学院, 武汉 430072)

摘要 目的: 针对人参与西洋参饮片中相互掺杂问题建立快速检测鉴别方法。方法: 依据多重连接探针扩增(multiplex ligation-dependent probe amplification, MLPA)技术检测序列单核苷酸多态性(SNP)和点突变的原理, 针对人参与西洋参的18S序列寻找SNP位点; 设计特异性探针进行MLPA扩增, 并由熔解曲线形成的熔解曲线峰得出熔解温度(melting temperature, T_m)。根据 T_m 值的差异来鉴别人参与西洋参, 并进行特异性、灵敏度、掺伪比实验, 验证方法的可行性。结果: 人参探针的特异性熔解曲线 T_m 值为 $(79.3 \pm 0.2)^\circ\text{C}$, 西洋参探针的熔解曲线 T_m 值为 $(81.2 \pm 0.2)^\circ\text{C}$ 。当西洋参探针与人参探针比例为0.6:1.0时, 人参掺杂10%的西洋参, 或者西洋参中掺杂10%的人参均可被有效检出。结论: 本研究建立了稳定的人参与西洋参掺伪鉴别方法, 该方法具有特异性强、灵敏度高的特点。

关键词: 多重连接探针扩增技术; 熔解曲线; 人参; 西洋参; 掺伪; 鉴别

中图分类号: R 917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793(2022)09-1577-09

doi: 10.16155/j.0254-1793.2022.09.11

Identification of mutual adulteration of *Panax ginseng* and
Panax quinquefolius by multiplex ligation-dependent probe
amplification combined with melting curve method*WANG Wen-bin^{1 2}, MO Jing³, HU Zhi-gang², DU Wei^{4 **}, WANG Bo^{1 **}

(1. Hubei Institute for Drug Control, NMPA Key Laboratory for Quality Control of Chinese Medicine, Wuhan 430075, China;

2. Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430060, China; 3. School of Life Sciences, Hubei University, Wuhan 430062, China;

4. College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072, China)

Abstract Objective: To establish a rapid detection and identification method for mutual adulteration in prepared slices of *Panax ginseng* and *Panax quinquefolius*. **Methods:** Based on the principle of using multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) to detect single nucleotide polymorphism (SNP) and point mutation

* 湖北省青年拔尖人才培养计划; 湖北省科技重大专项(2020ACA007)“湖北中药质控标准物质研制及技术平台建立”; 湖北省自然科学基金重点类项目“基于Q-marker的湖北特色道地药材质控关键技术研究”(2020CFA024); 中国食品药品检定研究院项目“常见与重要中药材及饮片DNA分子鉴定研究项目(TCM2021-YJ11)”

** 通信作者 汪波 Tel: 13618638636; E-mail: wangbo1986@hotmail.com

杜巍 Tel: 13807190894; E-mail: wdu@whu.edu.cn

第一作者 Tel: 18649345243; E-mail: 1585919031@qq.com

in sequences, a specific probe was designed to find SNP sites in the 18S sequences of *Panax ginseng* and *Panax quinquefolius* for MLPA amplification. The melting temperature (T_m) was derived from the peak of the melting curve, and the differences in T_m values were used to identify *Panax ginseng* and *Panax quinquefolius*. Specificity, sensitivity and adulteration ratio experiments were performed to verify the feasibility of the method. **Results:** The specific melting curve T_m value of *Panax ginseng* probe was (79.3 ± 0.2) °C, and that of *Panax quinquefolius* probe was (81.2 ± 0.2) °C. When the ratio of *Panax quinquefolius* probe to *Panax ginseng* probe was 0.6:1.0, *Panax ginseng* adulterated with 10% *Panax quinquefolius*, or *Panax quinquefolius* adulterated with 10% *Panax ginseng* could be effectively detected. **Conclusion:** This study establishes a stable method for the identification of *Panax ginseng* adulterated with *Panax quinquefolius*, which is specific and sensitive.

Keywords: multiplex ligation – dependent probe amplification technique; melting curve; *Panax ginseng*; *Panax quinquefolius*; Adulteration; Identification

中药材人参(*Ginseng Radix et Rhizoma*)为五加科人参属植物人参(*Panax ginseng* C. A. Mey.)的干燥根和根茎;西洋参(*Panacis Quinquefolii Radix*)为五加科人参属植物西洋参(*Panax quinquefolius* L.)的干燥根,均是具有保健和药用价值的名贵中药材。人参性微温,具有大补元气、复脉固脱、补脾益肺、生津养血、安神益智的功效;西洋参性凉,补气养阴、清热生津^[1],误用混用或者相互掺杂,会因其药性药效差异影响药效或用药安全。人参与西洋参根茎在形态上虽有差异,但经干燥切制或以粉末入药时,难以通过外观性状、显微特征比较和化学成分分析正确有效区分。因此开发快速准确鉴别人参及西洋参的方法对安全用药具有重要意义。

中药材DNA条形码分子鉴定法是利用中药基原植物基因组中1段公认标准的、相对较短的DNA序列来进行中药材真伪鉴定的鉴定方法,在中药材和部分深加工产品的鉴定中得到广泛应用^[2]。孙涛等^[3]发现ITS2序列作为DNA条形码可有效鉴别人参属植物,其在人参与西洋参中存在32位C/T、43位T/C变异^[4]。宋晓娜等^[5]基于 $trnL-trnF$ 序列对人参与西洋参进行DNA条形码鉴别,发现存在153位G/A、463位T/A、732位C/G、818位T/C变异。此外,通过对人参、西洋参的18S rRNA基因片段分析发现,在其第497、499和501位存在稳定的SNP位点,表明18S rRNA基因片段上500 bp左右位置上的核苷酸序列差异亦可作为人参及西洋参鉴别分子标记^[6]。

多重连接探针扩增(multiplex ligation – dependent probe amplification, MLPA)技术是由针对目的DNA序列进行定性和半定量分析的新技术^[7],具有

特异性好、灵敏度高、重复性好、操作简单、高通量和多重检测等优势。其原理是样品DNA序列在高温下变性成为单链,探针与目标片段杂交结合,在连接酶的作用下将左右探针连接成完整片段,所有连接片段经通用引物扩增,利用毛细管电泳实现对检测产物的特异性和高灵敏度分析。目前,该技术已应用于HPV等^[8]临床诊断,食物过敏原和转基因成分检测,川贝母^[9]、金钱白花蛇^[10]等中药材真伪鉴定等多个领域。

在本研究,通过对ITS2、 $trnL-trnF$ 及18S rRNA进行综合分析,根据人参、西洋参18S rRNA基因片段上501 bp处的G/C变异位点,设计人参西洋参特异性探针,在传统MLPA技术基础上结合熔解曲线分析手段,弥补传统MLPA技术费时、昂贵,易导致污染等不足,建立检测人参与西洋参掺伪鉴别的方法,为有效鉴别中药人参与西洋参掺伪情况提供了技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料

植物基因组DNA提取试剂盒(DP305-03, TIAN-GEN®公司);金牌Mix(green)(TSE101, TSINGKE); DNA产物纯化试剂盒(D1300, Solarbio公司); 9°N™ DNA Ligase(M0238S, TSINGKE公司); 2×TSINGKE® Master qPCR Mix – SYBR(+UDG)(TSE203, TSINGKE公司); DL1000 DNA Marker(Takara公司); 琼脂糖(BIOWEST公司, 182215); 引物和MLPA探针由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

MS204S万分之一电子天平(梅特勒公司); 75002420冷冻高速离心机(Thermo Fisher公司);

Nanodrop 2000 超微量分光光度计(Thermo Ficher 公司); PCR 扩增仪(Bio – Rad 公司); MyGo Mini 便携式荧光定量 PCR 仪(Life Technologies 公司); Quant-Gene 9600 实时荧光定量 PCR 分析仪(杭州博日科技有限公司); GGI54TW 蒸汽消毒锅(ZEALWAY 公司); SYERGYUV 超纯水系统(Millipore 公司); MX – RL – E 旋转混悬仪(大龙兴创公司); DYY – 10C 电泳仪(北京君意公司); Gel Doc XR + 凝胶成像系统

(Bio – Rad 公司); UF55 干燥箱(美墨尔特公司); 移液器(艾本德股份公司)。

本试验所用人参样品采自人参主产地东北地区以及药材市场,西洋参采自河北、吉林及药材市场,经湖北省药品监督检验研究院中药检验研究中心肖凌博士鉴定,采用天根试剂盒提取样本 DNA 后,保存于湖北省药品监督检验院,样品信息见表 1。

表 1 人参、西洋参样品信息

Tab. 1 Sample information of *P. ginseng* and *P. quinquefolius*

编号(No.)	样品(sample)	样本来源(sample source)
1	人参对照药材(<i>P. ginseng</i> reference crude drug)	中国食品药品检定研究院(National Institutes for Food and Drug Control)
2	人参(<i>P. ginseng</i>)	安徽亳州(Bozhou ,Anhui)
3	人参(<i>P. ginseng</i>)	福建厦门(Xiamen ,Fujian)
4	人参(<i>P. ginseng</i>)	河北保定(Baoding ,Hebei)
5	人参(<i>P. ginseng</i>)	黑龙江大庆(Daqing ,Heilongjiang)
6	人参(<i>P. ginseng</i>)	湖南株洲(Zhuzhou ,Hunan)
7	人参(<i>P. ginseng</i>)	辽宁抚顺(Fushun ,Liaoning)
8	人参(<i>P. ginseng</i>)	辽宁辽阳(Liaoyang ,Liaoning)
9	人参(<i>P. ginseng</i>)	吉林吉林(Jilin ,Jilin)
10	人参(<i>P. ginseng</i>)	吉林延边(Yanbian ,Jilin)
11	人参(<i>P. ginseng</i>)	山东菏泽(Heze ,Shandong)
12	人参(<i>P. ginseng</i>)	山东青岛(Qingdao ,Shandong)
13	人参(<i>P. ginseng</i>)	上海奉贤区(Fengxian District ,Shanghai)
14	人参(<i>P. ginseng</i>)	四川成都(Chengdu ,Sichuan)
15	人参(<i>P. ginseng</i>)	四川广安(Guang'an ,Sichuan)
16	人参(<i>P. ginseng</i>)	新疆乌鲁木齐(Urumqi ,Xinjiang)
17	人参(<i>P. ginseng</i>)	吉林吉林(Jilin ,Jilin)
18	人参(<i>P. ginseng</i>)	吉林通化(Tonghua ,Jilin)
19	人参(<i>P. ginseng</i>)	吉林白山(Baishan ,Jilin)
20	人参(<i>P. ginseng</i>)	辽宁丹东(Dandong ,Liaoning)
21	人参(<i>P. ginseng</i>)	北京怀柔区(Huairou District ,Beijing)
22	人参(<i>P. ginseng</i>)	吉林白山(Baishan ,Jilin)
23	人参(<i>P. ginseng</i>)	黑龙江哈尔滨(Harbin ,Heilongjiang)
24	人参(<i>P. ginseng</i>)	安徽亳州中药城(Anhui Bozhou Traditional Chinese Medicine City)
25	人参(<i>P. ginseng</i>)	安徽亳州中药城(Anhui Bozhou Traditional Chinese Medicine City)
26	人参种子(<i>P. ginseng</i>)	吉林通化(Tonghua ,Jilin)
27	人参(<i>P. ginseng</i>)	辽宁抚顺(Fushun ,Liaoning)
28	人参(<i>P. ginseng</i>)	吉林通化(Tonghua ,Jilin)
29	西洋参对照药材(<i>P. quinquefolius</i>)	中国食品药品检定研究院(National Institutes for Food and Drug Control)
30	西洋参(<i>P. quinquefolius</i>)	北京怀柔区(Huairou District ,Beijing)
31	西洋参(<i>P. quinquefolius</i>)	吉林白山(Baishan ,Jilin)
32	西洋参(<i>P. quinquefolius</i>)	辽宁抚顺(Fushun ,Liaoning)
33	西洋参(<i>P. quinquefolius</i>)	山东威海(Weihai ,Shandong)
34	西洋参(<i>P. quinquefolius</i>)	山东青岛(Qingdao ,Shandong)

表 1(续)

编号(No.)	样品(sample)	样本来源(sample source)
35	西洋参(<i>P. quinquefolius</i>)	吉林白山(Baishan, Jilin)
36	西洋参(<i>P. quinquefolius</i>)	河北石家庄(Shijiazhuang, Hebei)
37	西洋参(<i>P. quinquefolius</i>)	吉林白山(Baishan, Jilin)
38	西洋参(<i>P. quinquefolius</i>)	北京怀柔区(Huairou District, Beijing)
39	西洋参(<i>P. quinquefolius</i>)	安徽亳州中药城(Anhui Bozhou Traditional Chinese Medicine City)
40	西洋参(<i>P. quinquefolius</i>)	吉林白山(Baishan, Jilin)
41	西洋参粉末(<i>P. quinquefolius</i> powder)	安徽亳州(Bozhou, Anhui)
42	西洋参粉末(<i>P. quinquefolius</i> powder)	安徽亳州(Bozhou, Anhui)
43	西洋参粉末(<i>P. quinquefolius</i> powder)	安徽亳州(Bozhou, Anhui)

1.2 方法

1.2.1 探针设计及合成 从 NCBI 数据库中下载人参、西洋参的 18S rRNA 序列,以 501bp 处 C/G 位点作为 SNP 位点。根据 MLPA 探针设计原则,选择合适区域分别设计人参、西洋参的左右探针,为避免交叉反应,用 BLAST 搜索来评估探针序列的特异性,利用 DNA Folding Form (<http://www.unafold.org/mfold/applications/dna-folding-form.php>) 对它们的二级结构进行分析。使用 RAW 程序预测探针序列的长度、GC 含量和 T_m 值。探针进行 HPLC 纯化,右探针 5' 端进行磷酸化处理。同时利用 primer 3 在线网站 (<https://primer3.ut.ee/>) 设计特异性引物进行扩增,使之没有发夹结构、引物二聚体、回文序列等引发扩增错误。探针、引物信息见表 2。

表 2 引物序列表

Tab. 2 Primers used in this study

引物名称 (primer name)	序列 (sequence)	长度 (length)
18S - F	TGAGAAACGGTACCACA	18
18S - R	AACCCAAAGTCCAACCTACGA	20
Primer - F	GGGTTCCTAAGGGTTGGA	19
Primer - R	GTGCCAGCAAGATCCAATCTAGA	23
RS - F	ATAACAATACCGGGCTGATAC	21
RS - R	GCCAGTTAAGGACAGGAG	18
XYS - F	AAATGCGGGTTATGACAAA	19
XYS - R	TTCTGCATATACGCCAAATT	21
R - F	GGGTTCCTAAGGGTTGGATAATCT GTAGTGACAATAAATAACAATACCGGGCTGATTC	59
R - R	AGTCTCGTAATTGGAATGAGTACAATCTAAACCCCTT TCTAGATTGATCTTGTCTGGCAC	60
X - F	GGGTTCCTAAGGGTTGGAGCCACTCCGAAC GTAGTGACAATAAATAACAATACCGGGCTCAGTG	65

1.2.2 DNA 模板准备 分别称取人参、西洋参对照药材和样品粉末,参照植物 DNA 提取试剂盒操作提取总 DNA、PCR 扩增后,采用纯化产物试剂盒进行纯化获得目的 DNA 片段。通过梯度稀释样品纯化产物模板,得到各个模板 DNA 量(表 3)。将等浓度的人参与西洋参纯化产物模板混合配制成不同比例,西洋参占比 99%、97%、95%、90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%、5%、3%、1%。

表 3 人参、西洋参 DNA 稀释后模板量

Tab. 3 Sample amount after dilution of *P. ginseng* and *P. quinquefolius* DNA template

编号 (No.)	模板量(sample amount) / (ng · mL ⁻¹)	
	西洋参(<i>P. quinquefolius</i>)	人参(<i>P. ginseng</i>)
1	48.6	45.6
2	24.2	22.7
3	10.3	9.7
4	5.2	5.8
5	4.2	2.7
6	1.4	0.9
7	0.72	0.45
8	0.42	0.27

1.2.3 MLPA 反应 MLPA 反应包括杂交、连接、实时荧光扩增和熔解过程。杂交反应: DNA 纯化产物 1 μL、1.5 μL 探针, TE 缓冲液补足体积至 8 μL。98 °C 变性 5 min, 70 °C 杂交 20 min。连接反应: 取 1.28 μL 杂交产物至连接体系(9°N DNA Ligase 0.32 μL, NE Buffer for 9°N DNA Ligase 0.8 μL, ddH₂O 5.6 μL)。45 °C 反应 15 min 连接左右探针, 98 °C 反应 5 min 灭活连接酶。

荧光定量 PCR 反应体系为: $2 \times \text{T5 Fast qPCR Mix}$ $10 \mu\text{L}$, 上游引物 $0.8 \mu\text{L}$ ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 下游引物 $0.8 \mu\text{L}$ ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), $50 \times \text{ROX Reference Dye I}$ $0.4 \mu\text{L}$, ddH_2O $3 \mu\text{L}$; 反应程序: 95°C 1 min ; 95°C 10 s , 60°C 5 s , 72°C 10 s , 24 个循环; 72°C 5 min ; 获取熔解曲线: 95°C 3 min , $45 \sim 97^\circ\text{C}$ ($0.05^\circ\text{C} \cdot \text{s}^{-1}$)。

2 结果

2.1 探针特异性分析

按 MLPA 反应要求配制混合探针, 为了评价探针的特异性, 将人参与西洋参对照药材的 DNA 模板分别与单个探针和混合探针进行杂交。如图 1-a 所示, 人参 DNA 与人参探针在 79.3°C 出现特征峰, 西洋参 DNA 与人参探针并未出现扩增峰; 西洋参 DNA 与西洋参探针在 81.2°C 出现特征峰, 人参 DNA

与西洋参探针并未出现扩增峰。如图 1-b 所示, 人参 DNA、西洋参 DNA 分别与混合探针在 79.3°C 和 81.2°C 出现单一扩增峰, 人参与西洋参混合 DNA 与混合探针在 79.3°C 和 81.2°C 均出现扩增峰。当西洋参探针与人参探针比例为 $0.6:1.0$ 时, 混合样品的扩增峰值相同。

探针特异性分析结果表明, 人参、西洋参的 DNA 分别只与其对应的 MLPA 特异性探针杂交, 各自特异性探针熔解峰的温度分别为 79.3°C 和 81.2°C , 且无交叉反应的产生, 无非特异性熔解曲线峰, 单一探针特异性良好。混合探针只与特定模板反应仅能产生对应的单一特异性熔解曲线峰, 并不影响探针的特异性, 表明混合探针特异性良好。

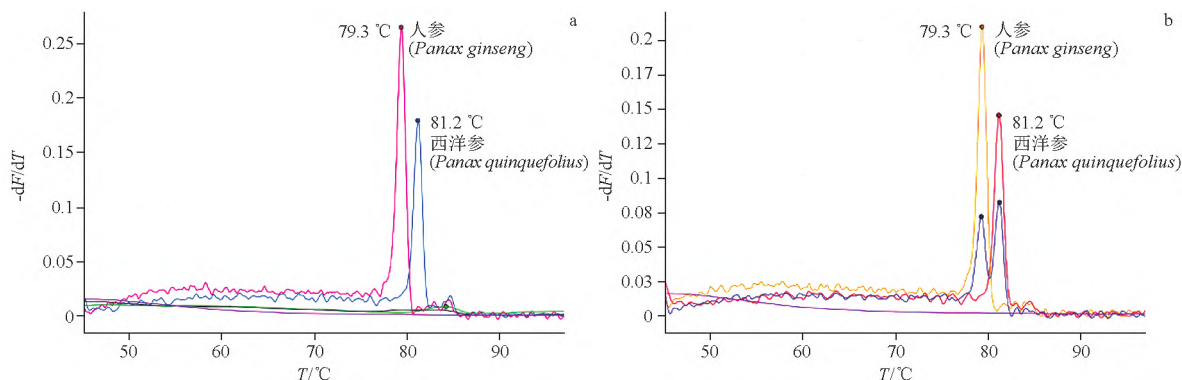


图 1 单探针(a)和混合探针(b)特异性试验熔解曲线

Fig. 1 Melting curve of specific test of single probe(a) and mixed probe(b)

2.2 MLPA 法灵敏度的评估

通过将两物种的纯化产物的浓度从 $100 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 不断稀释至 $0.3 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, 分别与混合探针杂交进行敏感性试验, 验证 MLPA 方法的灵敏度。稀释参考样本 DNA 浓度, 人参与西洋参的 DNA 浓度分别从 $45.6 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 等梯度稀释至 0.27 、 $48.6 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 等梯度稀释至 $0.42 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 。在大多数情况下, 熔解峰的高度与样本中的 DNA 模板量无关, 但当人参和西洋参 DNA 的模板量分别降低到 0.27 、 0.42 ng 时, 仍能产生较强信号峰(图 2)。结果表明, MLPA 法灵敏度高, 重现性好, 人参样品 DNA 检测限为 0.27 ng , 西洋参为 0.42 ng 。

2.3 MLPA 法检测人参、西洋参互相掺杂情况

分别选取等浓度的人参与西洋参纯化产物模板, 配制混合模板(西洋参占比 $99\% \sim 1\%$) 进行

MLPA 扩增, 评价混合掺伪比。当西洋参 DNA 含量占比 $90\% \sim 10\%$ 时, 可检测到人参、西洋参探针位于 79.3°C 和 81.2°C 的 2 个熔解峰(图 3)。而当西洋参 DNA 含量占比为 5% 或 95% 时, 只出现 1 个熔解峰。这意味着, 本研究的 MLPA 法可以检测 10% 的掺伪, 当西洋参探针与人参探针比例为 $0.6:1.0$ 时, 人参掺杂 10% 的西洋参, 或者西洋参中掺杂 10% 的人参均可被有效检出。

2.4 不同荧光定量 PCR 仪的适用性检验

为了验证本方法的普遍适用性, 选取了 Quant-Gene 9600 实时荧光定量 PCR 分析仪进行考察, 如图 4 所示, 人参 DNA 与人参探针和混合探针在 79.3°C 出现特征峰, 人参 DNA 与西洋参探针并未出现扩增峰; 西洋参 DNA 与西洋参探针和混合探针在 81.2°C 出现特征峰, 西洋参 DNA 与人参探针并未出现扩增峰。

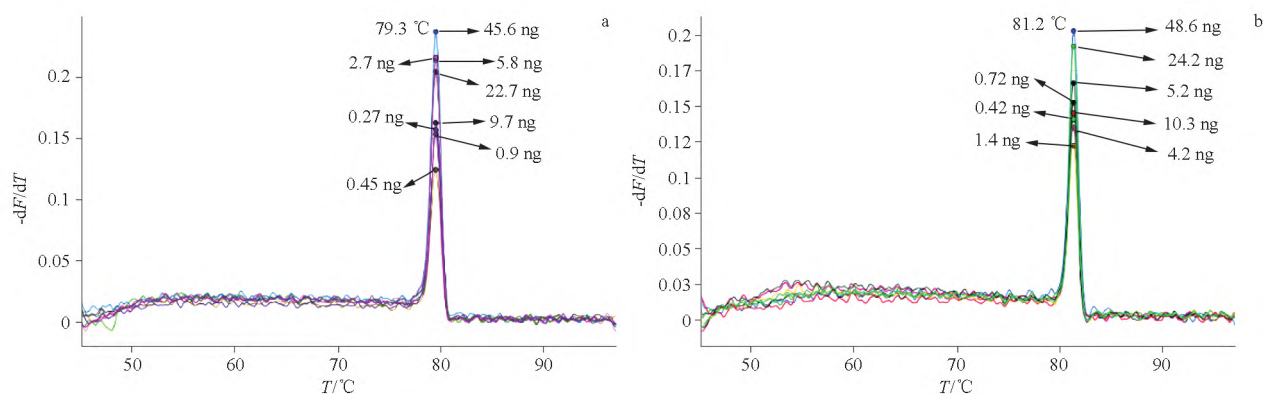
a. 人参 (*P. ginseng*) b. 西洋参 (*P. quinquefolius*)

图2 人参、西洋参探针灵敏度检测

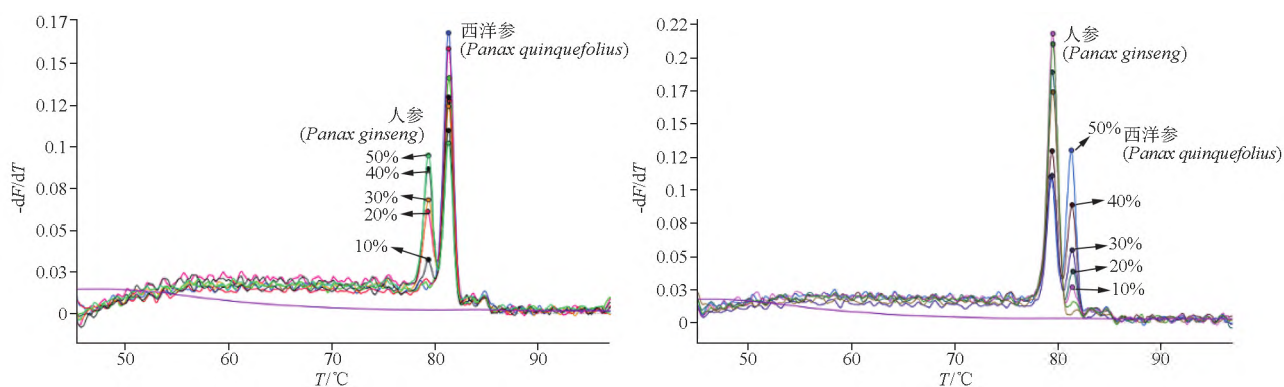
Fig. 2 Sensitivity detection of *P. ginseng* and *P. quinquefolius* probe

图3 西洋参(a)和人参(b)掺混比例检测

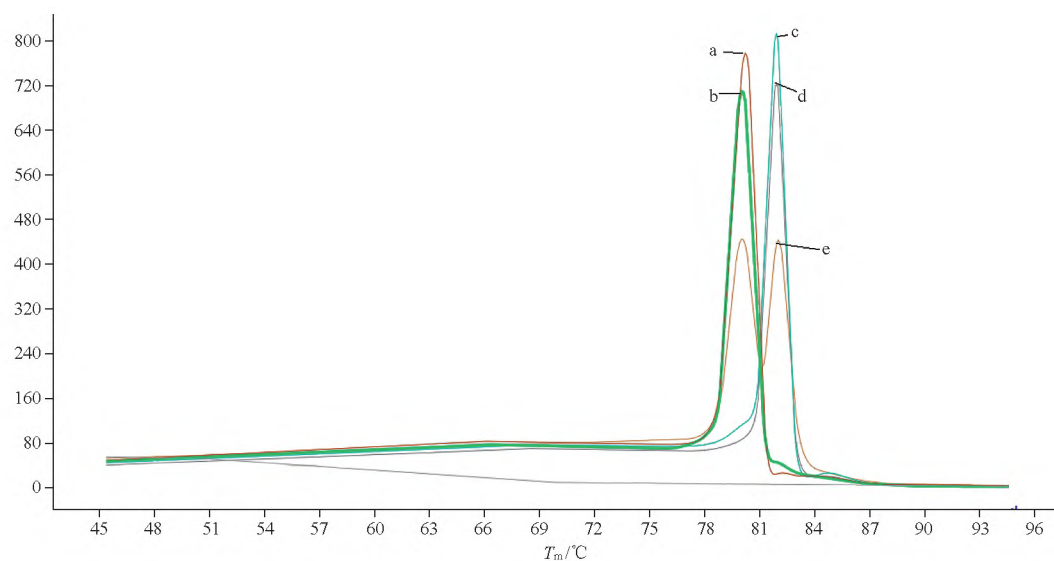
Fig. 3 Detection of adulteration ratio of *P. quinquefolius* (a) and *P. ginseng* (b)a. 人参 + 人参探针 (*P. ginseng* + *P. ginseng* probe) b. 人参 + 混合探针 (*P. ginseng* + mixed probe) c. 西洋参 + 西洋参探针 (*P. quinquefolius* + *P. quinquefolius* probe) d. 西洋参 + 混合探针 (*P. quinquefolius* + mixed probe) e. 混合样品 + 混合探针 (mixed sample + mixed probe)

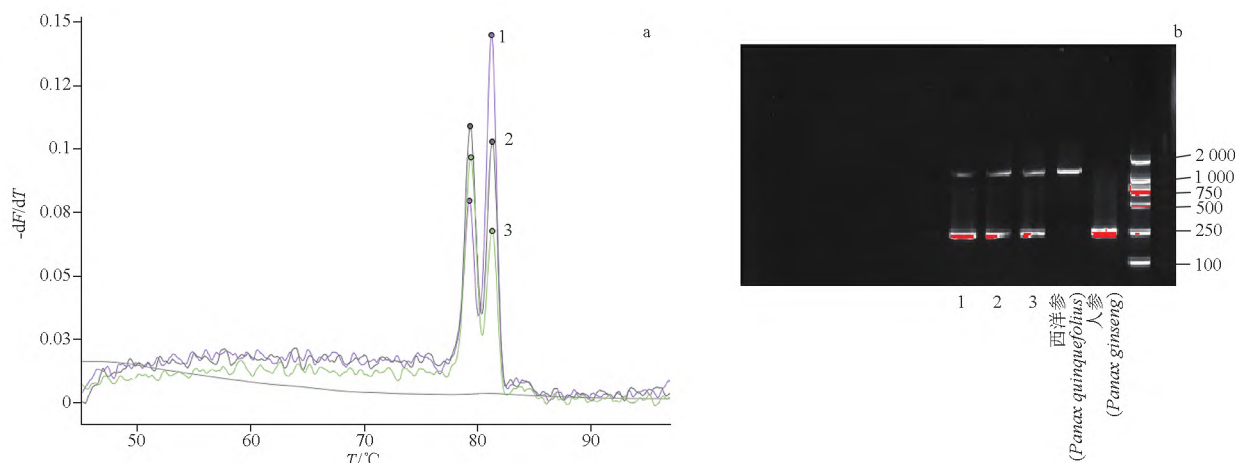
图4 人参、西洋参探针的特异性试验

Fig. 4 Specificity test of *P. ginseng* and *P. quinquefolius* probe

2.5 对市场样品的检测

使用上述建立的方法对市场收集的 43 个批次的人参、西洋参药材样品(各取 1 份)进行验证,并将结果与 DNA 条形码测序的结果进行比较。在全部 43 份人参、西洋参药材样品中,发现 28 份为人参药材,12 份为西洋参药材,3 份为人参西洋参混合药材。为保证实验的准确性,使用 DNA 条形码方法对

3 份混合药材进行 *ITS2* 扩增,经多次测序发现在 *ITS2* 序列峰图上 32、43 bp 处出现杂峰,符合人参及西洋参的 *ITS2* 鉴定位点特征。同时基于蒋超^[14]开发的方法进行验证,验证了这 3 份样品为人参西洋参混合药材(图 5)。总体而言,基于 43 份市场样品的检测结果表明,MLPA 检测方法可以有效检出人参、西洋参掺混样品。



1~3. 人参西洋参混合药材(mixture of *P. ginseng* and *P. quinquefolius*)

a. MLPA 检测结果(testing results of MLPA) b. 多重位点特异性 PCR 检测结果(testing results of MAS-PCR)

图 5 人参西洋参混合样品检测结果

Fig. 5 Testing results of mixed samples of *P. ginseng* and *P. quinquefolius*

3 讨论

人参与西洋参均为五加科人参属植物,在植物形态和显微结构上具有相似的特征,所含化学成分也有很大相似之处,因此常被相互替代。尤其对于以人参总皂苷含量作为评价依据的商业化人参产品,由于西洋参的人参皂苷含量较高,某些不法商家会用西洋参代替人参;而西洋参价格又比人参药材高,有时会被人参代替。准确鉴别人参与西洋参对于确保药用效能和食药安全具有至关重要的作用。目前对于人参与西洋参的鉴别开发了一系列 DNA 分子标记的方法。如崔光红等^[11]建立了人参、西洋参的多重等位基因 PCR,在 1 个 PCR 反应中同时特异检测人参、西洋参的 SNP 位点实现鉴别人参、西洋参鉴定;詹鑫婕等^[12]采用单链构象多态性(PCR-SSCP)方法鉴别人参和西洋参;刘丽等^[13]利用多重 PCR 扩增通过单次 PCR 反应鉴别人参及西洋参;蒋超等^[14]利用多重位点特异性 PCR 方法对人参和西洋参进行了鉴别;陈康等^[15]

将 HRM 分析引入人参属多来源药材物种鉴别;王志科等^[16]利用 DNA 条形码与 HRM 结合依据熔解曲线的峰形和 T_m 值差异实现了市售人参粉末的快速可视化鉴别;王戎博等^[17]开发了 indel 分子标记对人参西洋参的鉴别研究。而对于西洋参、人参相互掺伪的研究却鲜见报道。

在本研究中,验证了 MLPA 结合熔解曲线法鉴定人参及西洋参相互掺杂的可行性。与现有的一些方法(DNA 条形码、多重 PCR 分析方法等)相比,MLPA 结合熔解曲线分析方法具有以下优势。(1) 特异性好,应用单一探针、混合探针进行试验,其只与特定药材模板 DNA 杂交,均只能产生相应的熔解曲线峰,且相互之间没有干扰。(2) 灵敏性高,使用微量的 DNA 模板就可被探针检测出来,且可检测常见人参、西洋参掺混 10% 及以上,且通过调整物种左右探针比例,可检测到更小比例的伪品掺伪,这在中药粉末掺混鉴别方面具有较大意义及应用潜力。(3) 操作简便,无需测序,本方法包括变性

杂交、连接、实时荧光扩增和熔解过程,且所有样品检测均与混合探针杂交,在样品 DNA 模板制备好的情况下,使用 MyGo Mini 荧光定量 PCR 仪 3 h 内可完成至少 16 个样品的检测。(4) 普遍适用性好,在不同的 PCR 仪器上,本方法均可以有效鉴别人参西洋参以及其掺混品,本方法的前提是 DNA 质量好,对于不同年限、不同炮制方法的药材饮片,只影响其熔解峰的高低,而不会影响其熔解温度的差异,方法稳定性较好。

本方法的关键点在于探针的设计:应注意左右探针杂交序列应选取基因的保守区域,且选取的区域应该直接相连。本研究依据人参、西洋参的 18S RNA 序列 497、499、501 变异位点,选择 501 为 G/C 位点作为连接位点, T_m 值应 72 °C;杂交序列的长度大于或等于 21 个核苷酸;探针长度最佳大小在 100 bp 左右;每个杂交探针(LHS 和 RHS)的 T_m 值应大于 71 °C(绝对值 ≥ 68 °C);二级结构的 $\Delta G \geq 0$;GC 含量尽量接近 50%^[18]。探针符合这些原则,在进行 MLPA 实验更容易成功。

目前 MLPA 技术主要应用在疾病的遗传筛查、病菌的快速鉴定等,在中药材的检测方面应用较少。MLPA 技术有其特异性强、灵敏度高优点,也有其局限性:如只能检测已知序列的基因检测,不适合检测未知的点突变类型。熔解曲线可以根据不同熔解温度来确定不同的反应产物,就对相应的物种 DNA 进行定性。两者结合可以提高检测效率,节省检测时间,在中药快速检测方面有广泛应用前景。在实验时发现熔解曲线峰 T_m 值存在 ± 0.2 °C 波动,这可能是由于仪器每个孔间温度存在差异造成的,这个波动范围在可接受范围内。总之,本文建立了 MLPA 结合熔解曲线鉴别人参的方法,并对其灵敏度、特异性、混伪品检测限进行了考察,证明该方法可用于人参、西洋参的鉴别以及相互掺混鉴别,为人参、西洋参药材鉴别提供了可靠的、有效的检测方法。

参考文献

- [1] 李永国,王峰涛. 人参、西洋参质量标准研究进展[J]. 中国药品标准 2005, 6(5): 10
LI YG, WANG ZT. Advanced in research of standardization of *Panax ginseng* C A Meyer and *Panax quinquefolius* [J]. Drug Stand China, 2005, 6(5): 10
- [2] 陈士林,姚辉,韩建萍,等. 中药材 DNA 条形码分子鉴定指

导原则[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(2): 141

CHEN SL, YAO H, HAN JP, et al. Principles for molecular identification of traditional Chinese materia medica using DNA barcoding[J]. China J Chin Mater Med, 2013, 38(2): 141

- [3] 孙涛,孔德英,滕少娜,等. 基于 ITS2 条形码的人参属物种鉴定研究[J]. 湖北农业科学, 2016, 55(19): 5072

SUN T, KONG DY, TENG SN, et al. Identification of *Panax* sp. species based on ITS2 DNA barcode [J]. Hubei Agric Sci, 2016, 55(19): 5072

- [4] 曹佩,王刚,白璇姣,等. 基于 SNP 双峰法的人参西洋参花三七花及其混合物的快速鉴定[J]. 中国现代中药, 2021, 23(1): 37

CAO P, WANG G, BAI XJ, et al. Rapid identification method of *Panax ginseng* flower, *P. quinquefolium* flower, *P. notoginseng* flower and their mixture based on SNP double peak method [J]. Mod Chin Med, 2021, 23(1): 37

- [5] 宋晓娜,顾选,刘春生,等. 基于 trnL-trnF 序列的人参和西洋参 DNA 条形码鉴定研究[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(10): 1914

SONG XN, GU X, LIU CS, et al. DNA barcoding identification of Ginseng radix et rhizoma and *Panax quinquefolii* Radix based on trnL-trnF sequences [J]. China J Chin Mater Med, 2015, 40(10): 1914

- [6] FUSHIMI H, KOMATSU K, ISOBE M, et al. 18S ribosomal RNA gene sequences of three *Panax* species and the corresponding ginseng drugs [J]. Biol Pharm Bull, 1996, 19(11): 1530

- [7] SCHOUEN PJ, MCELGUNN CJ, WAAIJ RR, et al. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification [J]. Nucleic Acids Res, 2002, 30(12): 1157.

- [8] 张隼鹏,张惠玲,张青,等. 一管法 MLPA 荧光探针溶解曲线分析技术检测 15 种高危型 HPV 方法的建立[J]. 贵州医科大学学报, 2016, 41(6): 675

ZHANG YP, ZHANG HL, ZHANG Q, et al. Establishment of a method to detect 15 high risk HPV based on one tube MLPA melting curve analysis technique [J]. J Guizhou Med Univ, 2016, 41(6): 675

- [9] ZHU HL, WANG WB, ZHOU YX, et al. Simultaneous identification of *Fritillariae Cirrhosae* Bulbus and its common adulterants in one reaction by multiplex ligation-dependent probe amplification and high-resolution melting curve assay [J]. Gene, 2021, 785: 145620

- [10] ZHOU YX, NIE J, YU SQ, et al. Multiplex ligation-dependent probe amplification for simultaneous identification of *Bungarus multicinctus* and its common adulterants in a single assay [J]. Front Pharmacol, 2020, 11: 501

- [11] 崔光红,唐晓晶,黄璐琦. 利用多重等位基因特异 PCR 鉴别人参、西洋参[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(23): 1940

CUI GH, TANG XJ, HUANG LQ. Application of multiplex allele specific PCR for authentication of *Panax ginseng* and *P. quinque-*

- lis[J]. China J Chin Mater Med, 2006, 31(23): 1940
- [12] 詹鑫婕, 田程, 张媛, 等. 基于 ITS2 条形码 SNPs 的人参和西洋参 PCR-SSCP 分子鉴别研究[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(24): 3748
- ZHAN XJ, TIAN C, ZHANG Y, et al. PCR-SSCP molecular identification of *Panax ginseng* and *P. quinquefolius* based on ITS2 bar coding SNPs[J]. China J Chin Mater Med, 2012, 37(24): 3748
- [13] 刘丽, 肖炳燚, 罗晖明, 等. 多重 PCR 方法同时鉴别人参、西洋参、三七[J]. 药物分析杂志, 2016, 36(4): 668
- LIU L, XIAO BY, LUO HM, et al. Identification of *Panax ginseng*, *Panax quinquefolius* and *Panax notoginseng* by multiplex PCR assay[J]. Chin J Pharm Anal, 2016, 36(4): 668
- [14] 蒋超, 罗宇琴, 袁媛, 等. 多重位点特异性 PCR 鉴别人参、三七、西洋参掺杂[J]. 中国中药杂志, 2017, 42(7): 1319
- JIANG C, LUO YQ, YUAN Y, et al. Identification of *Panax ginseng*, *P. notoginseng* and *P. quinquefolius* admixture by multiplex allele-specific polymerase chain reaction[J]. China J Chin Mater Med, 2017, 42(7): 1319
- [15] 陈康, 蒋超, 金艳, 等. 人参属中药材高分辨率熔解曲线鉴定及其方法学考察[J]. 药物分析杂志, 2017, 37(1): 64
- CHEN K, JIANG C, JIN Y, et al. Identification of high resolution melting curves of *Panax* species and methodological investigation[J]. Chin J Pharm Anal, 2017, 37(1): 64
- [16] 王志科, 鲁放, 熊超, 等. Bar-HRM 技术在人参和西洋参药材鉴定中的应用研究[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2016, 18(2): 191
- WANG ZK, LU F, XIONG C, et al. Application of Bar-HRM technology in identification of medicinal material of *Panax ginseng* and *Panax quinquefolius*[J]. World Sci Technol - Mod Tradit Chin Med Mater Med, 2016, 18(2): 191
- [17] 王戎博, 田惠丽, 王洪涛, 等. 开发 indel 分子标记对参与西洋参的鉴别研究[J]. 中国中药杂志, 2018, 43(7): 1441
- WANG RB, TIAN HL, WANG HT, et al. Development of indel markers for molecular authentication of *Panax ginseng* and *P. quinquefolius*[J]. China J Chin Mater Med, 2018, 43(7): 1441
- [18] 何海健, 刘正奎, 吴媛, 等. 猪病毒性腹泻病相关病原的 ML-PA 检测技术的建立及应用[J]. 农业生物技术学报, 2020, 28(9): 1699
- HE HJ, LIU ZK, WU Y, et al. Establishment and application of multiplex ligation-dependent probe amplification assay for identification of pathogens causing porcine viral diarrhea diseases[J]. J Agric Biotechnol, 2020, 28(9): 1699
- (本文于 2022 年 4 月 17 日修改回)