

川贝母分子鉴别方法的应用及改进

鲍方名,薛满

(苏州市食品药品检验所,江苏 苏州 215104)

摘要:**目的** 改进《中国药典》2015 版中川贝母分子鉴别方法,为《中国药典》的应用和标准修订提高提供参考。**方法** 优化聚合酶链式反应(PCR)模板与引物的比率,提高退火温度至 61 ℃;采用乙醇沉淀法纯化 PCR 反应液。**结果** 原方法 PCR 出现明显非特异性条带,酶切结果模糊。方法改进后,非特异性条带得到明显抑制,同时目的条带量没有明显影响,酶切结果清晰,效果良好。**结论** 该方法专属性强、重现性好,可以满足川贝母的鉴别。

关键词:川贝母;分子鉴别;中药质量标准

doi:10.3969/j.issn.1009-6469.2016.10.015

Implementation and improvement for molecular identification of *Fritillariae cirrhosae bulbus*

BAO Fangming, XUE Man

(Suzhou Institute for Food and Drug Control, Suzhou, Jiangsu 215104, China)

Abstract:**Objective** To improve the molecular identification method of *Fritillariae cirrhosae bulbus* in Chinese Pharmacopoeia (2015 version), and to provide reference for implementation of the standards of Chinese Pharmacopoeia. Methods Primer quantity was reduced while template quantity was improved. And the annealing temperature was changed from 56 ℃ to 61 ℃. Ethanol precipitation was used for PCR purification. **Results** Using original method, one nonspecific band (200 bp to 300 bp) was found in PCR result and the result of restriction endonucleases digestion was too fuzzy to identify. After the method was improved, the nonspecific band was obviously inhibited, while the purpose band was not significantly affected. The result of restriction endonucleases digestion was clear for identification. Good results were achieved with the improved method. **Conclusion** This method has good repeatability and can be used for molecular identification of *Fritillariae cirrhosae bulbus*.

Key words: *Fritillariae cirrhosae bulbus*; Molecular identification; Quality standard of traditional Chinese medicine

中药川贝母为百合科植物川贝母、暗紫贝母、甘肃贝母、梭砂贝母、太白贝母或瓦布贝母的干燥鳞茎^[1]。川贝母具有苦寒之性,有清热化痰之功。用治肺热咳嗽之证,常与知母相须为用,可以清气滋阴;兼有甘味微寒,尚能清润肺燥,长于润肺化痰止咳,多用于治阴虚燥咳,常与杏仁、麦门冬、紫苑等药同用;还可用于治老嗽咳血,常与百部、天冬、沙参等药同用^[2]。随着人们对川贝母的应用,在许多治疗急性气管炎、支气管炎、肺结核等的中成药制剂中都加入了川贝母:二母宁嗽丸、川贝雪梨膏、止嗽化痰丸、贝羚胶囊、牛黄蛇胆川贝液、甘露消毒丸、百合固金口服液、妙灵丸、金嗓清音丸、治咳川贝枇杷露、参茸保胎丸、复方川贝精片、川贝止咳露、养阴清肺丸、小儿止咳糖浆、小儿化毒散、小儿

至宝丸、小儿金丹片、小儿咳喘颗粒、小儿清肺止咳片、蛇胆川贝胶囊、贝母瓜蒌散等^[1,3]。

川贝母按照药材性状的不同常分为松贝、青贝、炉贝及栽培品^[1]。川贝母的传统鉴别方法就是根据各种川贝母的性状的细微差别来鉴别混淆品与伪品^[4]。随着自然科学技术的发展,分子生物学技术在中药鉴定中开始了大规模的研究,使中药鉴定的手段从传统的形态表征扩展到了遗传物质 DNA:核糖体上的 ITS 保守区序列、叶绿体上的 psbA-tmH 序列、18S rRNA 及 tmK 基因等^[5-6]。川贝母的分子鉴别方法也得到了突飞猛进的发展,《中国药典》2015 版已经收录了川贝母的聚合酶链式反应-限制性内切酶长度多态性方法^[1,7-9]。

本实验按照《中国药典》2015 版川贝母项下聚合酶链式反应-限制性内切酶长度多态性方法,进行川贝母鉴别研究,发现聚合酶链式反应(PCR)结果

出现干扰后续判断的非特异性条带,酶切结果模糊。因此,对川贝母的分子鉴别方法进行了再研究,并通过一些经济实用的实验对现有方法进行了补充。改进后非特异性条带得到明显抑制,酶切结果清楚容易判断。

1 材料

1.1 试验药材 川贝母对照品(粉末)来源于中国食品药品检定研究院(批号:121000-201108),川贝母样品1(药品委托检验:江阴市天江药业有限公司,委托编号 SZ2016QS0106,产地:四川阿坝);川贝母样品2(药品委托检验:江阴市天江药业有限公司,委托编号 SZ2016QS0107,产地:拉萨);川贝母样品3(药品委托检验:苏州九珍堂健康药业有限公司,委托编号 SZ2016QS0229,产地:四川);川贝母样品4(药品委托检验:吴江上海蔡同德堂中药饮片有限公司,委托编号 SZ2015QS0607),以上川贝母样品均为饮片。

1.2 仪器和试剂 PCR 仪(AB Applied Biosystems),核酸电泳仪(Bio-Rad Power Pac TM Basic),凝胶成像系统(GEL DocTM XR + Bio RAD),高速低温离心机(Thermo scientific Biofuge primo R)。DNA 提取试剂为 TIANGEN Plant Genomic DNA Kit DP305-02(批号: N226, 吸附柱批号: N2106), DREAM Taq Green PCR Master Mix(2 ×)为 Thermo Scientific 公司产品(批号:00108596),限制性内切酶 Sma I(批号:K6001BA)购自 TaKaRa,引物 ITS1: 5' CGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAA3' 和 ITS2:5' GCTACGTTCTTCATCGAT3' 合成于上海生工(批号: 9304435540 和 9304435541), GelRed 购自 BIOTIUM 公司,批号 11G0127),TIANGEN 100 bp DNA Ladder(所有条带:100、200、300、400、500、600、700、800、900、1 000 bp)和 50 bp DNA Ladder(所有条带:50、100、150、200、250、300、350、400、500 bp)。其他试剂药品皆为国产或进口的分析纯试剂。

2 川贝母鉴别方法研究

2.1 药典方法

2.1.1 基因组 DNA 提取 从供试品随机抽取少许,置乳钵中,加适量液氮,充分研磨。取 30 mg 左右粉末置 1.5 mL 离心管中,按植物基因组 DNA 提取试剂盒使用说明书步骤提取基因组 DNA,提取得到的供试品 DNA 置零下 20 ℃ 保存备用。对照品 DNA 制备:取川贝母对照品 30 mg 左右置 1.5 mL 离心管中,按前述方法提取川贝母对照品基因组 DNA。

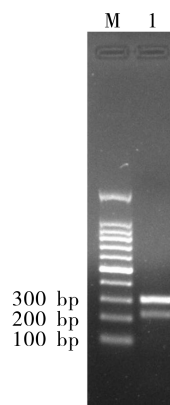
2.1.2 PCR 反应 PCR 反应体系:在 200 μL PCR

管中进行,反应总体积为 25 μL, DREAM Taq Green Pcr Master Mix(2 ×)12.5 μL, 20 μmol · L⁻¹ 的引物各 0.5 μL, DNA 模板 1 μL, 去离子水 10.5 μL。PCR 反应参数:95 ℃ 预变性 4 min, 循环反应 30 次(95 ℃ 30 s, 56 ℃ 30 s, 72 ℃ 30 s), 72 ℃ 延伸 5 min。

2.1.3 酶切反应 酶切反应体系:在 1.5 mL 离心管中进行,反应总体积为 20 μL, 10X 酶切缓冲液 2 μL, 0.1% BSA 2 μL, 供试组 PCR 反应液 6 μL, SmaI 2 μL, 去离子水 8 μL。酶切反应在 30 ℃ 水浴反应 2 h, 结束时加入 2 μL 10 × Loading buffer 终止酶切反应。

2.1.4 电泳检测 按琼脂糖凝胶电泳法(三部附录 IV B)。电泳条件:电泳缓冲液为 TAE, 胶浓度为 2%, 在融化的琼脂糖中加入核酸胶染色剂 GelRed; 5 V · cm⁻¹ 恒压电压下, 电泳时间约 50 min。

供试品与对照药材 PCR 反应溶液、供试品与对照药材酶切反应溶液的上样量:6 mL; DNA 分子量标记(100 bp DNA Ladder 和 50 bp DNA Ladder)上样量:3 μL; 电泳结束后, 取凝胶片在凝胶成像仪上检视。按照药典方法规定的 PCR 条件进行川贝母的鉴别时发现, 川贝母对照品 PCR 结果有比较明显的非特异性带出现, 大小在 200 ~ 300 bp 之间, 如图 1 所示。按照药典方法对 PCR 产物直接酶切操作, 结果出现条带模糊, 无法区分目的条带是否存在的现象。



注:M:100 bp DNA Ladder; 泳道1:川贝母对照品。

图1 川贝母对照药材 PCR 结果电泳图

2.2 改进后的方法

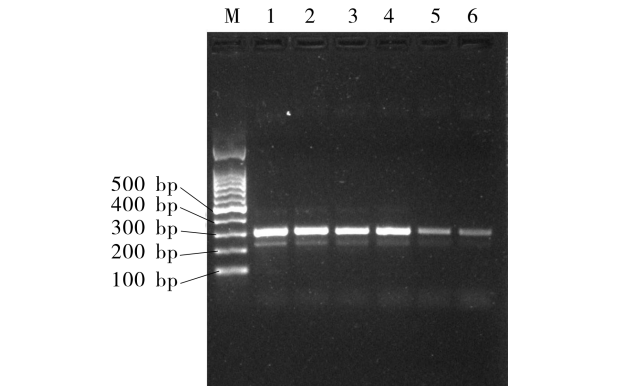
2.2.1 非特异性条带的干扰 使用 Primer5 软件对设计引物进行分析, 结果如表 1 所示。从引物 Tm 计算结果可以发现, Tm 在 47.3 ~ 64 ℃ 之间, 所以 56 ℃ 只是在药典标准发布者的条件下(PCR 仪和 PCR 试剂)的最佳温度, 在本次操作的 PCR 反应体系中还有提高的空间。

表 1 引物分析结果

长度 /bp	T /℃	GC /%	ΔG [1 cal·mol ⁻¹]	活性 [μg/OD]	其他
18	47.3	44.4	-32.3	29.9	有引物二聚体
25	64.0	44.0	-47.0	33.0	有发卡结构和引物二聚体

2.2.2 PCR 条件的优化 优化后的 PCR 反应体系:在 200 μL 离心管中进行,反应总体积为 25 μL , DREAM Taq Green Pcr Master Mix (2 ×) 12.5 μL (Thermo Scientific,批号:00134703),20 μmol · L⁻¹ 的引物(上海生工,引物 1 批号:9304435540 和引物 2 批号:9304435541)各 0.2 μL ,DNA 模板 2 μL,去离子水 10.1 μL。阴性对照将模板替换为灭菌去离子水。PCR 反应参数:95 ℃ 预变性 4 min,循环反应 30 次(95 ℃ 30 s,梯度 58 ~ 63 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s),72 ℃ 延伸 5 min。

为了减少非特异性条带的出现,加大了 DNA 模板量,减少了引物量,并适当提高了退火温度。结果如图 2 所示,退火温度在 61 ℃ 时,主带亮度没有明显减少的同时,非特异性条带得到了明显抑制。

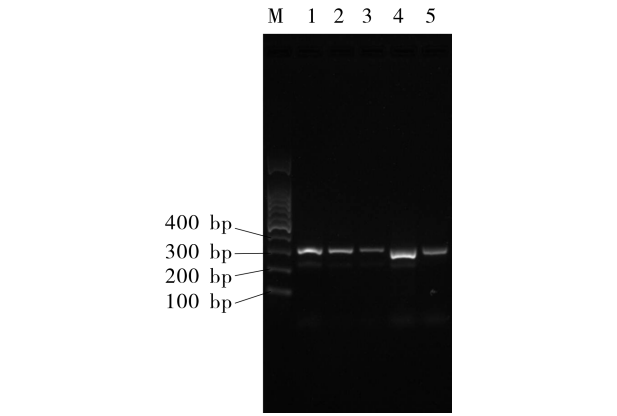


注:M;100 bp DNA Ladder;泳道 1:58 ℃;泳道 2:59 ℃;泳道 3:60 ℃;泳道 4:61 ℃;泳道 5:62 ℃;泳道 6:63 ℃。

图 2 川贝母对照药材梯度 PCR 结果电泳图

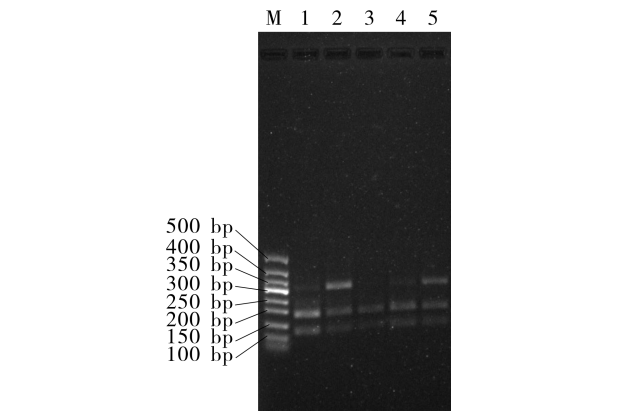
2.2.3 PCR 产物的纯化 尝试使用乙醇沉淀法对 PCR 反应液进行缓冲液置换后再进行酶切。乙醇沉淀法:(1)加入 1/10 体积的醋酸钠(3 mol · L⁻¹, pH 5.2)于 DNA 溶液中充分混匀,使其最终浓度为 0.3 mol · L⁻¹; (2)加入 2.5 倍体积预冷的无水乙醇混合后再次充分混匀置于 -20 ℃ 中 15 ~ 30 min; (3)14 000 r · min⁻¹ 离心 15 min 4 ℃,小心移出上清液,吸去管壁上所有的液滴;(4)加入 1/2 离心管容量的 70% 乙醇,14 000 r · min⁻¹ 离心 5 min 4 ℃,小心移出上清液; (5)于室温下将开盖的 EP 管置于实验桌上以使残留的液体挥发至干;(6)加适量

的去离子水溶解 DNA 沉淀。
2.3 改进后方法的应用 基因组提取、PCR 产物酶切及电泳检测方法同药典方法,PCR 反应体系及条件进行了优化,具体参数见“2.2.2”项,并在 PCR 之后酶切之前增加了纯化步骤。按照优化后的方法对川贝母样品 1 ~ 4 进行分子鉴别,PCR 结果和酶切结果如图 3 和图 4 所示,在 300 bp 左右有目的条带的出现,200 ~ 300 bp 出现的非特异性条带得到明显抑制,酶切之后,在 100 ~ 200 bp 之间有明显酶切片段。结果该方法能够适用于日常川贝母检品的鉴别。



注:M;100 bp DNA Ladder;泳道 1:川贝母对照品;泳道 2:SZ2016QS0106 供试品;泳道 3:SZ2016QS0107 供试品;泳道 4:SZ2016QS0229 供试品;泳道 5:SZ2015QS0607 供试品。

图 3 供试品和川贝母对照药材 PCR 结果电泳图



注:M;50 bp DNA Ladder;泳道 1:川贝母对照品;泳道 2:SZ2016QS0106 供试品;泳道 3:SZ2016QS0107 供试品;泳道 4:SZ2016QS0229 供试品;泳道 5:SZ2015QS0607 供试品。

图 4 酶切结果电泳图

3 讨论

按照《中国药典》2015 版川贝母项下聚合酶链式反应-限制性内切酶长度多态性方法,进行川贝母鉴别研究发现,PCR 结果在 200 ~ 300 bp 出现一条明显的非特异性条带,直接干扰后续酶切结果的判断;PCR 产物直接酶切后发现条带模糊,无法区分