

应用微芯片电泳 MultiNA 鉴定中药材金银花和山银花

MultiNA-014

摘要：利用改动的基因提取试剂盒方法提取中药材金银花和山银花的基因组，基于 GenBank 金银花和山银花的基因序列差异，分别设计金银花和山银花特异性引物，进行 PCR 扩增，微芯片电泳仪 MultiNA 检测扩增产物，实验结果显示 PCR 扩增产物片段长度与预期长度基本一致。另外，为了验证引物的特异性，用金银花引物扩增山银花样品及山银花引物扩增金银花样品，MultiNA 检测结果均未出现特征条带。本实验表明基于微芯片电泳 MultiNA 开发的方法可实现金银花和山银花的鉴定。

关键词：微芯片电泳 MultiNA PCR 中药材品种鉴定 金银花和山银花

金银花为忍冬科植物忍冬的干燥花蕾或初开的花，主要活性成分为绿原酸、木樨草苷等黄酮类物质。金银花临床应用非常广泛，《中国药典》成方和制剂中药中就有 61 个方剂以金银花作为主要的组成成分，现代药理实验证明其具有抑菌、抗炎、抗病毒、抗氧化、解热、镇痛、调节免疫、保肝、中枢兴奋和神经保护、抗心肌缺血等作用。尽管在 2005 年版《中国药典》中已明确将忍冬作为金银花唯一植物来源，但之前各版《中国药典》根据临床疗效、地区用药习惯等，曾先后选定忍冬、红腺忍冬、华南忍冬、水忍冬等为金银花的基原植物。且 2005 年版《中国药典》同时规定红腺忍冬、华南忍冬、灰毡毛忍冬和黄褐毛忍冬列为山银花药材基原植物。目前，金银花和山银花的区分是一个热点话题。

为保证用药安全，需要准确地鉴定金银花和山银花，然而两者的形态和化学成分高度相似，且传统形态学和

化学鉴别常受到人为或环境因素的影响。因此，需要开发一种快速、准确地进行金银花、山银花的鉴定方法。应用分子生物学手段可以实现品种的鉴定，其原理是不同物种具有不同的基因序列。本文根据 NCBI GenBank 中金银花和山银花的基因序列差异，设计两者的特异性引物，PCR 过程后，岛津微芯片电泳 MultiNA 检测 PCR 产物。实验结果显示，当样品为金银花时，用金银花特异性引物扩增得到的 PCR 产物检测出相应条带，尺寸与理论基本一致，而用山银花特异性引物扩增得到的 PCR 产物未能检测出条带；当样品为山银花时，用山银花特异性引物的 PCR 产物检测出特异性条带，尺寸与预期相符，而用金银花特异性引物的 PCR 产物未检测出对应条带。这表明本文开发的方法可以成功地鉴定金银花和山银花，且具有良好的特异性。

实验部分

1.1 仪器

微芯片电泳 MCE-202 MultiNA

1.2 试剂

TaKaRa MiniBEST Plant Genomic DNA Extraction Kit(宝生物工程有限公司, 9768)

SYBR®Premix Ex Taq™ II(宝生物工程有限公司, RR820A)

SYBR®Gold Nucleic Acid Gel Stain(Invitrogen, S-11494)

1×TE Buffer

25 bp DNA Ladder(Invitrogen, 10597-011)

DNA-500 Reagent Kit for MultiNA(岛津公司, P/N 292-27910-91)

样品：金银花样品来自山东产地；山银花样品为产自山东的红腺忍冬

PCR 引物：根据文献和 NCBI 序列，针对金银花和山银花序列差异设计各自对应的特异性引物，金银花的 PCR 目标产物长度为 468 bp，山银花的 PCR 目标产物长度为 331 bp。

1.3 样品中 DNA 的提取与纯化

样品的基因提取和纯化基本按照 TaKaRa MiniBEST Plant Genomic DNA 操作方法中富含多糖、多酚及油脂植物材料的提取方法进行，改动之处为开始时取样量为 50 mg，加入 Buffer HS II 1 mL，另外在洗脱 DNA 时，只用 30 μ L Elution Buffer 冲洗了 Spin Column 膜，以获得高浓度的 DNA。

1.4 PCR 反应体系

PCR 反应试剂与反应条件见表 1 和表 2。

表1 PCR反应试剂

	使用量	终浓度
SYBR® Premix Ex Taq II(Tl RNaseH Plusi)(2x)	10.0 μ L	1 \times
PCR Forward Primer (10 μ M)	0.8 μ L	0.4 μ M
PCR Reverse Primer (10 μ M)	0.8 μ L	0.4 μ M
DNA 模板	2.0 μ L	20 ng/ μ L
dH ₂ O (灭菌蒸馏水)	6.4 μ L	
总体积	20.0 μ L	

表2 PCR反应参数

作用	时间/s	温度/ $^{\circ}$ C
活化 DNA 活性酶和预变性	30	95
PCR (35个循环)		
变性	30	94
退火	30	61
延伸	45	72
循环后保持	420	72

1.6 MultiNA 检测

PCR 扩增产物进入 MultiNA 进行测定。根据理论产物片段大小，实验中选用 500 bp 的试剂盒进行测定。为了验证测量的准确性，本文同时阴性对照实验，阴性对照的反应体系中以纯水代替 DNA 模板。

结果讨论

图 1 与是微芯片电泳 MultiNA 测量金银花引物和山银花引物分别扩增金银花和山银花样品的 PCR 产物电泳图。根据实验结果，山银花 + 山银花引物的 PCR 产物及金银花 + 金银花引物的 PCR 产物都观察到了相应条带，说明基因组被成功的提取出来且 PCR 过程被顺利执行，另外金银花 + 山银花引物的 PCR 产物及山银花 + 金银花引物的 PCR 产物则未得到相应条带，表明本方法设计的引物特异性好。阴性对照以纯水代替样品 DNA 模板，实验没有检测到相关片段，证明无假阳性检出。图 2 是微芯片电泳 MultiNA 测量金银花 + 金银花引物的 PCR 产物电泳图，实验结果显示基因片段长度为 475 bp，与预期的 468 bp 基本一致。图 3 是微芯片电泳 MultiNA 测量山银花 + 山银花引物的 PCR 产物电泳图，实验结果显示基因片段长度为 349 bp，由于实验时选用 DNA 500 试剂盒，仪器具有 5% 误差，与理论片段长度 331 bp 相比，结果合理。

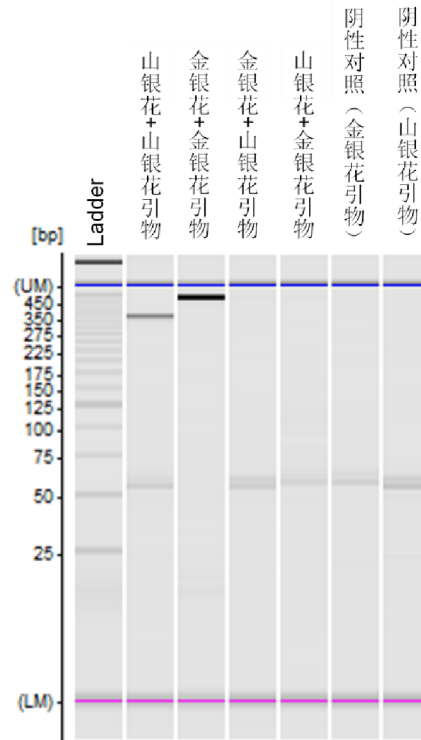


图1 微芯片电泳MultiNA检测金银花引物和山银花引物分别扩增金银花和山银花样品的PCR产物电泳图

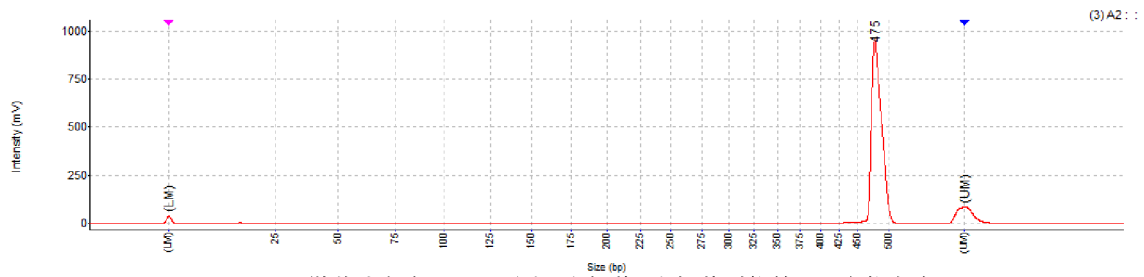


图2 微芯片电泳MultiNA测量金银花+金银花引物的PCR产物电泳图

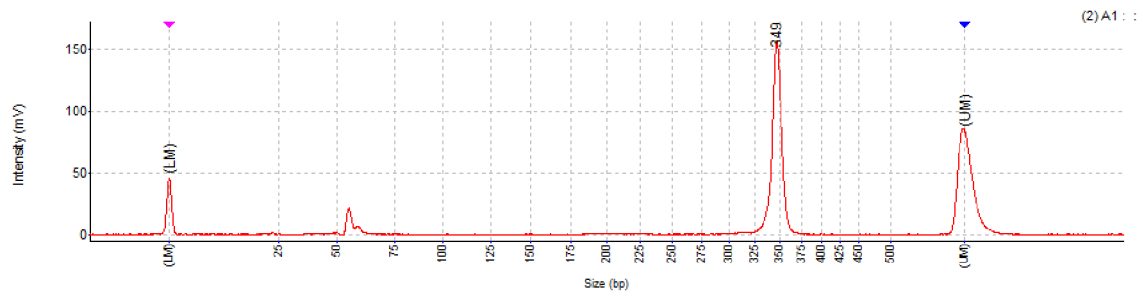


图3 微芯片电泳MultiNA测量山银花+山银花引物的PCR产物电泳图

■ 结论

本文应用岛津微芯片电泳 MCE-202 MultiNA 成功建立了鉴定金银花和山银花的方法，本方法特异性强，较传统的以测序仪进行基因测序方法相比，本方法操作简单，成本低，速度快，可供相关检测机构作为参考。