

番红花及其混淆品的 rDNA ITS 序列 与 AS-PCR 鉴别

毛善国^{1,2}, 罗玉明², 沈洁¹, 丁小余¹

(1. 南京师范大学生命科学学院, 江苏 南京 210097)
(2. 淮阴师范学院生物系, 江苏 淮安 223300)

[摘要] 通过对番红花及其混淆品的 rDNA ITS 区序列进行 PCR 扩增、测序, 并运用 Clustal X、Mega 3.0 等软件进行序列分析. 结果表明番红花 rDNA ITS 区序列全长 650 bp, GC 百分比为 60.3%, 与其混淆品的 rDNA ITS 区序列存在着显著差异. 另外, 还设计出了鉴别番红花的位点特异性 PCR 引物, 无需测序即可对番红花及其混淆品进行准确的分子鉴别.

[关键词] 番红花, rDNA ITS 区, 混淆品, 位点特异性 PCR, 分子鉴别

[中图分类号] Q94-334 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1001-4616(2007)02-0089-04

Authentication of *Crocus sativus* L. and its Adulterants by rDNA ITS Sequences and Allele-Specific PCR

Mao Shanguo^{1,2}, Luo Yuming², Shen Jie¹, Ding Xiaoyu¹

(1. School of Life Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China)
(2. Department of Biology, Huaiyin Teachers College, Huai'an 223300, China)

Abstract: The PCR products of rDNA ITS regions of *Crocus sativus* L. and its adulterants were sequenced and analyzed using Clustal X/Mega 3.0 software. The results showed that the full length of rDNA ITS regions of *C. sativus* was 650 bp, and the percentage of GC contents was 60.3%, which displayed the remarkable distinction between rDNA ITS regions of *C. sativus* and its adulterants. In addition, a pair of allele-specific PCR (AS-PCR) primers were designed to authenticate *C. sativus* and its adulterants accurately without sequencing.

Key words: *Crocus sativus* L., rDNA ITS region, adulterant, allele-specific PCR, molecular authentication

0 引言

番红花 (*Crocus sativus* L.) 为鸢尾科 (Iridaceae) 番红花属 (*Crocus*) 多年生药用草本植物, 又名藏红花、西红花^[1]. 番红花作为一种珍贵药用植物, 以柱头入药, 具有镇静、祛痰、刺激、解痉、活血、化瘀生新之功效, 用于治疗痢疾、麻疹、发热黄疸、肝脾肿大、泌尿道感染及糖尿病等多种疾病^[2].

番红花以柱头入药, 产量极低, 因而价格高达 2 000 美元/kg^[3]. 近年来, 一些不法商贩为牟取暴利, 用混淆品充斥市场, 引起了番红花药材市场的混乱并影响了疗效. 经调查发现, 一些廉价的混淆品, 如睡莲科植物莲 (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) 的干燥雄蕊、菊科植物菊花 (*Chrysanthemum morifolium* Ramat.) 的舌状花冠、红花 (*Carthamus tinctorius* L.) 的干燥花、百合科植物萱草 (*Hemerocallis fulva* L.) 的花丝和禾本科植物玉米 (*Zea mays* L.) 的花柱等^[4,5], 被加工或染色成番红花的混淆品出售. 因此, 为控制番红花药材的质

收稿日期: 2006-08-30. 修回日期: 2006-11-12.
基金项目: 江苏省普通高校高新技术产业发展项目基金 (JH02-124) 资助项目.
作者简介: 毛善国 (1969—), 硕士研究生, 主要从事植物学的学习与研究. E-mail: msg319@126.com
通讯联系人: 丁小余 (1965—), 教授, 博士生导师, 主要从事药用植物的教学与研究. E-mail: dingxynj@263.net

量,确保番红花药效的安全性和有效性,迫切需要寻求一种高效准确的番红花鉴别方法.

随着分子生物学技术的发展,DNA 分子指纹标记技术已广泛地应用于中药材的鉴定等相关方面的研究^[6],近年来,由于 α DNA ITS区具有高度重复性、能反映种间差别和物种进化程度、不易受药材加工而完全降解等特点,不仅被广泛用于亲缘关系较近的属间^[7]、种间^[8]的分子系统学研究,而且还被用于居群间的分子鉴别^[9].关于番红花的研究,前人主要集中于对其混淆品的显微和理化鉴定^[4,5],而根据 α DNA ITS序列鉴别番红花药材则尚未见报道.本文拟对番红花及其混淆品的 α DNA ITS序列进行扩增、测序和序列分析,并建立番红花及其混淆品的 α DNA ITS数据库,为药用植物番红花的鉴别提供可靠、便捷的分子标记.

1 材料和方法

1.1 材料

莲、玉米、萱草、红花和菊花等混淆品的实验材料取其新鲜的可混淆部分,并用硅胶干燥保存,番红花药材的实验材料取自花柱并用硅胶干燥保存,其来源及编号详见表 1.

表 1 番红花及其混淆品的采集地点及取材部位

Table 1 Localities and material positions of <i>Crocus sativus</i> and its adulterants				
名称	采集地点	取材部位	个体数	编号
番红花 (<i>Crocus sativus</i> L.)	四川成都	花 柱	8	F - 1
番红花 (<i>Crocus sativus</i> L.)	江苏南京	花 柱	6	F - 2
	江苏南京	花 丝	3	F - 3
	江苏苏州	花 丝	2	
莲 (<i>Nelumbo nucifera</i> Gaertn.)	江苏靖江	花 丝	3	F - 4
萱草 (<i>Hemerocallis fulva</i> L.)	江苏南京	花 丝	2	
玉米 (<i>Zea mays</i> L.)	江苏南京	柱 头	6	F - 5
红花 (<i>Carthamus tinctorius</i> L.)	浙江杭州	花 序	5	F - 6
菊花 (<i>Chrysanthemum morifolium</i> Ramat)	江苏南京	花 序	5	F - 7

1.2 方法

1.2.1 总 DNA 提取

植物总 DNA 的提取采用 CTAB 法,具体方法如下:取用硅胶干燥保存的实验材料,置于液氮中研磨成粉状,加入约 650 μ L 的 CTAB 提取液 (2 % CTAB, 0.1 mmol/L Tris - HCl, 0.02 mol/L EDTA, 1.4 mol/L NaCl,使用前加入 0.2 %的 β -巯基乙醇并充分混合),60 $^{\circ}$ C 水浴 45 min 接着加入与 CTAB 等体积的 24:1 氯仿异戊醇,颠倒混匀抽提 10 min,6 500 r/min 离心 15 min,重复此步骤,直至两相间澄清为止.再取上清,加入 2.5 倍体积的无水乙醇 - 20 $^{\circ}$ C 沉淀 1 ~ 2 h (可过夜),10 000 r/min 离心 10 min 取沉淀,用 70%乙醇反复清洗 2 次后放置在超净台上吹干,于双蒸水或 TE 中溶解 (30 ~ 50 μ L).采用分光光度计法定量检测植物总 DNA 浓度,并根据其浓度值将样品稀释至 50 ng/ μ L 用于 PCR 扩增.

1.2.2 PCR 扩增、产物纯化及序列测定

利用 α DNA ITS区的通用引物 P1 和 P2 进行该序列的扩增.引物序列如下:P1 为 5' - CGTAACAAG-GTTTCCGTAGGTGAAC - 3',位于 18S 上,P2 为 5' - TTATTGATATGCTTA AACTCAGCGGG - 3',位于 26S 上.PCR 扩增反应在 30 μ L 的反应体系中进行,反应液含 10 mmol/L Tris - HCl pH 8.3,50 mmol/L KCl,1.5 mmol/L MgCl₂,0.1 % Triton X - 100,Taq 酶 1U,4 种 dNTP 各 150 mmol/L,2 个引物各 10 pmol/L,DNA 模板约 100 ng 反应在 PTC - 200 型 PCR 仪上进行,循环参数为 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,然后是 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min,52 $^{\circ}$ C 退火 45 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,共 30 个循环后,72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min 补齐,以 ddH₂O 代替模板作空白对照.

PCR 产物用 Vitagene 试剂盒纯化,按试剂盒操作指南进行;PCR 产物直接送上海生工生物公司进行测序.

1.2.3 DNA 序列数据分析

所得 DNA 序列输入计算机后,用 Clustal X 软件对位排列,并辅以人工校对,并用 MEGA 3.0 软件分析各样品 DNA 序列间的差异.

1.2.4 位点特异性鉴别 PCR

根据番红花与其近缘种番紫花 (*Crocus vemus*)的 α DNA ITS区序列比对结果,在其序列保守处设计了

一对位点特异性 PCR 鉴别引物,序列如下: FHH - JB01S 为 5' - GACTCCGTT CCGTCCCGTCA - 3',位于 ITS 1 上; FHH - JB01X 为 5' - TCTTCTTATTCGGAAGCCGG - 3',位于 ITS 2 上. PCR 扩增反应的程序和体系均等同于 1.2.2 中的扩增条件.电泳后的 PCR 产物用含有 0.5 mg/L EB 的 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测.电泳结果通过凝胶成像系统 (UVP GDS - 8000) 观察并记录.

2 结果与分析

2.1 番红花及其混淆品的 rDNA ITS 区序列特征比较

番红花 rDNA ITS 区序列的起始端和终点端参考了 GenBank 中鸢尾科植物及其近缘种的 ITS 序列.番红花完整的 ITS 序列的长度范围为 650 bp,居群间无长度差异,GC 含量为 60.3%,其中 5.8S 编码区的序列长度为 164 bp, ITS1 和 ITS2 的序列长度分别为 252 bp 和 234 bp,结果详见表 2

表 2 番红花及其混淆品的 ITS 区序列长度

Table 2 Length of ITS regions of *Crocus sativus* and its adulterants

名称	ITS1 bp	ITS2 bp	ITS (including 5.8 S) bp, (G + C) / %
番红花 (<i>Crocus sativus</i> L.)	252	234	650 60.3
番红花 (<i>Crocus sativus</i> L.)	252	234	650 60.3
莲 (<i>Nelumbo nucifera</i> Gaertn.)	254	219	637 52.1
萱草 (<i>Henecallis fulva</i> L.)	222	263	635 59.5
玉米 (<i>Zea mays</i> L.)	215	260	637 46.8
红花 (<i>Carthamus tinctorius</i> L.)	254	214	628 55.2
菊花 (<i>Chrysanthemum morifolium</i> Ramat.)	252	220	638 52.5

由于 rDNA ITS 区的进化速率快,在科、属、种间的差异较大,但在种内具有一定的保守性,使得该序列被广泛用于中药材与混淆品的种间鉴别.本文通过对番红花常见混淆品莲、玉米、萱草、菊花和红花的 rDNA ITS 区序列进行测定、比对和分析,发现番红花与其混淆品在 rDNA ITS 区序列上存在着极为显著的差异.根据其序列差异,就能准确鉴别番红花的真伪.

2.2 番红花的位点特异性 PCR 鉴别

本文通过对番红花与其近缘种的 rDNA ITS 区序列比对,经 Clustal X 排序, Mega 3.0 分析,在番红花的 rDNA ITS 区序列中找到了多个鉴别番红花的特异性核苷酸位点,位点特异性 PCR 引物的设计参考了番红花与其近缘种 rDNA ITS 区的特异性核苷酸位点,上下游引物完全与番红花的 rDNA ITS 区的碱基序列互补.我们所设计的鉴别番红花的引物能扩增出约 540 bp 左右的 ITS 区 DNA 序列,包含了 5.8S 保守区 (图 1),这样无须测序仅进行一次 PCR 即可对番红花进行准确的分子鉴别.鉴别结果详见图 2, 1 - 7 泳道的编号与表 1 中样品的编号相一致.

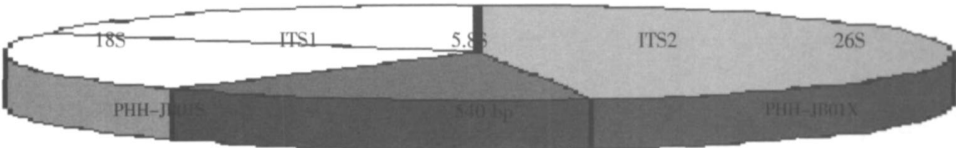
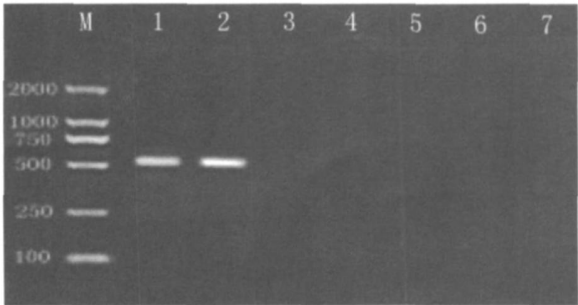


图 1 番红花 rDNA ITS 区位点特异性 PCR 引物扩增

Fig.1 Amplification by a pair of primers of allele-specific PCR (AS-PCR) designed according to rDNA ITS regions of *Crocus sativus*



泳道 1、2、3、4、5、6、7 分别对应于表 1 中的样品 F-1、F-2、F-3、F-4、F-5、F-6、F-7, M 为 DL 2 000 Marker

图 2 番红花及其混淆品的位点特异性 PCR 鉴别

Fig.2 Authentication of *Crocus sativus* and its adulterants by allele-specific PCR (AS-PCR)

3 讨论

关于番红花分子标记方面的研究, Ma等利用5 S间隔区序列成功鉴别了番红花的3个混淆品: 红花、萱草和黄花菜^[10]。黄丰等通过对印度红花、川红花及其混淆品莲须、玉米须、黄花菜的RAPD指纹图谱的研究, 得出指纹图谱的差异可准确鉴别番红花及其混淆品^[11]。到目前为止, 有关rDNA ITS区序列应用于番红花及其混淆品的鉴别尚未见报道。

在被子植物中, rDNA ITS区既具有核苷酸序列的高度变异性又有长度上的保守性, 使得该序列能反映出种间差别和物种进化程度, 也可在较低的分类阶元上解决植物系统发育问题^[12-14]; 同时由于高等植物中rRNA基因(rDNA)是高度重复的串联序列单位, 18S-rDNA ITS-26S rDNA在植物中的拷贝数可达500~40 000^[15], 所以对于加工过的药材, 尽管提取的总DNA模板有部分降解, 但一般不会影响对rDNA ITS区的扩增。由于DNA指纹图谱技术对模板的要求较高, 因此不适合于加工后的中药材的鉴别, 依靠DNA序列进行中药材鉴别显得尤为重要。

本文通过对番红花及其混淆品rDNA ITS区的序列测定, 经比对排序后发现番红花rDNA ITS区序列与混淆品存在稳定而又明显差异。因此, 根据番红花rDNA ITS区序列, 可以准确鉴别中药番红花的真伪。此外, 本文还设计出了一对位点特异性PCR鉴别引物, 无需测序即可对番红花的新鲜和干燥药材进行准确、快捷的分子鉴别。由于鉴别性扩增片段仅为540 bp左右的小片段, 同时ITS区域又为多拷贝重复区域, 因此位点特异性PCR鉴别在药材DNA降解非常严重的情况下, 仍能达到非常好的鉴别效果, 能有效地将番红花与其混淆品鉴别开来。

[参考文献]

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志: (第16卷第1分册) [M]. 北京: 科学出版社, 1985: 122
- [2] 高文运, 朱大元. 番红花的化学及药理研究概况 [J]. 中草药, 1999, 30(5): 389-391.
- [3] 陈书安, 王晓东, 赵兵, 等. 藏红花的研究进展 [J]. 中草药, 2001, 32(12): 1 137-1 139.
- [4] 饶君凤. 番红花的真伪鉴别 [J]. 时珍国医国药, 2006, 17(7): 1 252-1 253.
- [5] 吴晓春. 西红花伪品的鉴别 [J]. 中成药, 2005, 27(7): 840-842.
- [6] 徐红, 王峥涛, 胡之璧. 中药DNA分子鉴定技术的发展与应用 [J]. 世界科学技术——中医药现代化, 2003, 5(2): 24-30.
- [7] Mark E Mort, Nicholas Levens, Christopher P Randle, et al. Phylogenetics and diversification of Cotyledon (Crassulaceae) inferred from nuclear and chloroplast DNA sequence data [J]. Am J Bot, 2005, 92(7): 1 170-1 176.
- [8] Ding X Y, Wang Z T, Xu L S, et al. Authentication of stems of *Dendrobium officinale* by rDNA ITS region sequences [J]. Planta Med, 2002, 68(2): 191-192.
- [9] 沈洁, 丁小余, 张卫明, 等. 花椒及其混淆品的rDNA ITS区序列分析与鉴别 [J]. 药学报, 2005, 40(1): 80-86.
- [10] Ma X Q, Zhu D Y, Li S P. Authentic identification of *Stigma croci* (*Stigma of Crocus sativus*) from its adulterants by molecular genetic analysis [J]. Planta Med, 2001, 67(2): 183-186.
- [11] 黄丰, 王培训. 西红花的RAPD鉴别研究 [J]. 中药新药与临床药理, 1999, 10(4): 226-228.
- [12] Sanghun O H, Daniel Potter. Molecular phylogenetic systematics and biogeography of tribe Neillieae (Rosaceae) using DNA sequences of cpDNA, rDNA, and LEAFY [J]. Am J Bot, 2005, 92(1): 179-192.
- [13] Alexandra M Gottlieb, Gustavo C Giberti, Lidia Poggio. Molecular analyses of the genus *Ilex* (Aquifoliaceae) in southern South America, evidence from AFLP and ITS sequence data [J]. Am J Bot, 2005, 92(2): 352-369.
- [14] 丁小余, 徐珞珊, 王峥涛, 等. 齿瓣石斛的位点特异性PCR鉴别 [J]. 药学报, 2002, 37(11): 897-901.
- [15] Rogers SO, Bendich A J. Ribosomal RNA genes in plants: variability in copy number and in the intergenic spacer [J]. Plant Mol Biol, 1987, 9(5): 509-520.

[责任编辑: 孙德泉]