

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, Huaian 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 rDNA 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 rDNA 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 rDNA 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 rDNA 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 *Crocus sativus* 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
莲 (<i>Nelumbo nucifera</i> Gaertn.)	江苏苏州	花丝	2	F-4
萱草 (<i>Hemerocallis fulva</i> L.)	江苏靖江	花丝	3	F-4
	江苏南京	花丝	2	F-4
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 rDNA 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-GTTTCCGTAAGTGAAC-3',位于 18S 上,P2 为 5'-TTATTGATATGCTTAACTCAGCGGG-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 rDNA 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>Hemerocallis 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.

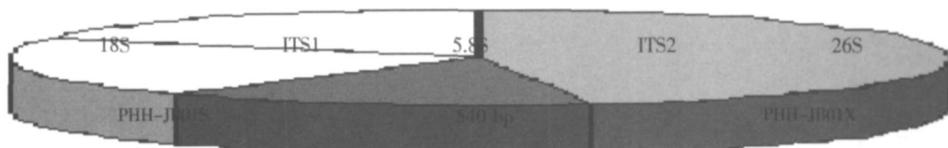
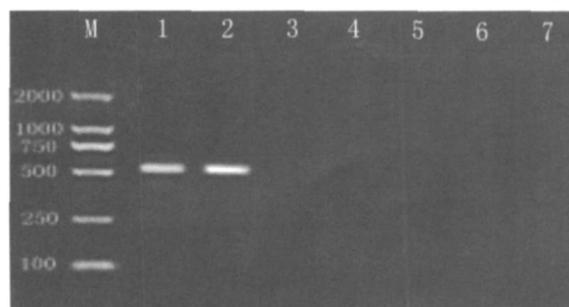


图 1 番红花 rDNA ITS 区位点特异性 PCR 引物扩增

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): 1137-1139.
- [4] 饶君凤. 番红花的真伪鉴别 [J]. 时珍国医国药, 2006, 17(7): 1252-1253.
- [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 Levensen, 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): 1170-1176.
- [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]