

# 阳春砂仁 ITS2 序列 PCR 反应体系的优化及验证

张典 王霞<sup>通讯作者</sup> 陈雪 王悦  
(吉林农业科技学院 吉林 吉林 132101)

**【摘要】**为创建阳春砂仁 ITS2 序列的 PCR 反应体系,采用正交试验对影响 PCR 反应的 Taq DNA 聚合酶、dNTPs、Mg<sup>2+</sup>、DNA 模板和引物 5 个因素进行优化,结果表明 20 μL 阳春砂仁 ITS2 序列最佳 PCR 反应体系包括 Taq DNA 聚合酶 0.80U、dNTPs 0.20 mmol·L<sup>-1</sup>、Mg<sup>2+</sup> 2.50 mmol·L<sup>-1</sup>、DNA 模板 40ng、引物 0.20 μmol·L<sup>-1</sup>,验证实验表明优化体系稳定性强,可用于后续的 DNA 条形码分析。

**【关键词】**阳春砂仁; ITS2; PCR; 优化

**【中图分类号】**R282.71 **【文献标识码】**A

DNA 条形码鉴定是利用一段特定的短 DNA 序列(即 DNA 条形码)来鉴别物种的分子生物学方法,它可以从基因水平上提供一种可靠的分类依据,不受药材本身及环境条件的影响,能够弥补形态描述的不足,操作流程规范、简单快速,鉴定结果精准、高效<sup>[1]</sup>。ITS2(internal transcribed spacer 2)作为最常见的一种 DNA 条形码,位于 5.8S 和 28S 基因间,其序列短、易扩增、进化速率快、变异程度高,2009 年,chen 等提出将 ITS2 作为植物的通用 DNA 条形码,并且得到了国际同行专家的认可<sup>[2]</sup>。

砂仁为我国著名“四大南药”之一,其正品为姜科植物阳春砂、绿壳砂或海南砂的干燥成熟果实,其中以阳春砂仁品质最佳,目前我国市售砂仁基本为阳春砂仁。阳春砂对生长环境要求苛刻,授粉困难,因此产量很低,价格高涨,导致市售砂仁混用、替用现象严重<sup>[3]</sup>,亟需建立简便快速、准确有效地阳春砂仁正伪品鉴别方法。目前对阳春砂仁的研究主要集中在药理和化学分析方面<sup>[4]</sup>,尚无阳春砂仁 DNA 条形码方面研究的报道。优化反应体系是进行 DNA 条形码鉴定的前提和基础,论文首次通过正交试验优化阳春砂仁 ITS2 序列 PCR 反应体系,并对优化体系进行了验证,为实现阳春砂仁正伪品的分子鉴定奠定基础,对后续阳春砂仁的遗传多样性分析、种质资源保存和良种繁育等研究具有重要意义。

## 1 方法

### 1.1 实验材料

#### 1.1.1 实验材料

分别从道地产区收集、购买阳春砂仁样品共计 10 份,分别为:广东蟠龙 4 份(简称为 PL1、PL2、PL3、PL4)、广东春湾 2 份(简称为 CW1、CW2)、云南马关 2 份(简称为 NG1、MG2),四川宜宾(简称为 YB1)、福建长泰(简称为 CT1),经专家鉴定后备用。

#### 1.1.2 试剂

Taq DNA 聚合酶、dNTPs、氯仿、琼脂糖等均购自 Takara Bio 公司,引物为 ITS2 通用引物 ITS2F(5' -ATGCGATACTTGGTGTGAAT-3') 和 ITS3R(5' -GACGCTTCTCCAGACTACAAT-3')<sup>[5]</sup>,由上海生工生物工程有限公司合成。

## 1.2 方法

### 1.2.1 基因组 DNA 提取

阳春砂仁种皮经 75% 乙醇擦拭后,切开种皮,去除种子,于液氮中研磨成粉末,加入适量 CTAB 提取液(含 2% PVP40),其余操作参照刘艳<sup>[6]</sup>的改良 CTAB 法,所提基因组经 1% 琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度法检测后,稀释浓度至 50ng/μL, -20℃ 贮存备用。

### 1.2.2 PCR 反应正交试验设计

以 PL1 基因组 DNA 为模板,在单因素试验的基础上,对构成 PCR 反应体系的 5 个主要组分(Taq DNA 聚合酶、dNTPs、Mg<sup>2+</sup>、DNA 模板、引物)进行 5 因素 4 水平正交试验,详见见表 1,反应体系为 20 μL。

PCR 反应程序为:94℃ 预变性 5min 后,反应 30 个循环(94℃ 变性 30s,56℃ 退火 30min,72℃ 延伸 60s),最后 72℃ 延伸 10min。PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳,分析电泳条带的清晰度和特异性,寻找最佳反应条件。实验重复 2 次。

### 1.2.3 优化体系验证

采用 1.2.2 中优化的反应体系,分别以 PL2、PL3、PL4、CW1、CW2、MG1、MG2、YB1、CT1 为基因组,进行 PCR 扩增及扩增产物的凝胶电泳检测。

## 2 结果与分析

### 2.1 基因组 DNA 的质量与检测

10 份样品的基因组 DNA 电泳条带清晰明亮,无拖尾现象,说明所提基因组 DNA 无降解,所有样品的 OD260/OD280 值在 1.74-1.91 范围内,说明基因组 DNA 纯度较高,基本无 RNA、糖类、蛋白质等杂质,可用于后续 PCR 反应。

### 2.2 PCR 反应条件正交优化

由图 1 可知,除组合 4 外,所有组合都有扩增产物,但是各个组合扩增条带的强弱不同,由弱到强依次为:组合 2、11、12、16、5、1、14、3、13、7、15、10、9、8、6,组合 6 扩增条带最强,扩增效果最好,参照何正文<sup>[7]</sup>的方法,分别对 16 个组合计分,并进行方差分析,结果如表 1 所示,可知 20 μL 阳春砂仁 ITS2 最佳 PCR 反应体系为 Taq DNA 聚合酶 0.80U、dNTPs 0.20 mmol·L<sup>-1</sup>、Mg<sup>2+</sup> 2.50 mmol·L<sup>-1</sup>、DNA 模板 40ng、引物 0.20 μmol·L<sup>-1</sup>,Taq DNA 聚合酶和引物的浓度对 PCR 反应体系影响最大,Mg<sup>2+</sup> 和 dNTPs 浓度的影响次之,DNA 模板浓度的影响最小。

表1 正交试验设计与结果

Table2 The design and results of orthogonal experiment

处理组	Taq DNA 聚合酶 /U·20 μL <sup>-1</sup>	dNTPs /mmol·L <sup>-1</sup>	Mg <sup>2+</sup> /mmol·L <sup>-1</sup>	DNA 模板 /ng·20 μL <sup>-1</sup>	引物 /μmol·L <sup>-1</sup>
1	0.60	0.15	1.50	10.00	0.2
2	0.60	0.20	2.00	20.00	0.3
3	0.60	0.25	2.50	30.00	0.4
4	0.60	0.30	3.00	40.00	0.5
5	0.80	0.15	2.00	30.00	0.5
6	0.80	0.20	1.50	40.00	0.4
7	0.80	0.25	3.00	10.00	0.3
8	0.80	0.30	2.50	20.00	0.2
9	1.00	0.15	2.50	40.00	0.3
10	1.00	0.20	3.00	30.00	0.2
11	1.00	0.25	1.50	20.00	0.5
12	1.00	0.30	2.00	10.00	0.4
13	1.20	0.15	3.00	20.00	0.4
14	1.20	0.20	2.50	10.00	0.5
15	1.20	0.25	2.00	40.00	0.2
16	1.20	0.30	1.50	30.00	0.3
k <sub>1</sub>	4.75	9.25	7.75	7.5	11.75
k <sub>2</sub>	12	9.75	6	7.5	8
k <sub>3</sub>	8.5	8.75	11.5	8.25	9.75
k <sub>4</sub>	8.75	6.25	8.75	10.75	4.5
R	7.25	3.5	5.5	3.25	7.25

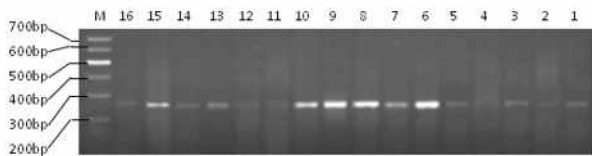


图1 正交设计PCR产物的电泳结果

注: M为100bp DNA marker, 从右到左为1-16处理组合编号

### 2.3 验证

采用上述优化的反应体系, 扩增剩余9份样品的 ITS2 序列, 结果如图2 所示, 可知, 所有样品扩增条带清晰、明亮, 无杂带、无拖尾现象, 说明优化的反应体系稳定、可靠。

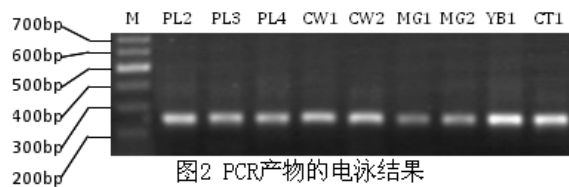


图2 PCR产物的电泳结果

注: M为100bp DNA marker

### 3 讨论

DNA 条形码分析是基于 PCR 技术进行的, 不同物种、不同基因的 PCR 反应体系不同。影响 PCR 反应的因素主要有 Taq DNA 聚合酶、dNTPs、引物、DNA 模板和 Mg<sup>2+</sup> 浓度, 其中 dNTPs、引物和 DNA 模板浓度是 PCR 反应的原材料, 其浓度过低会降低扩增速率, 浓度过高则会增加扩增错配率; Mg<sup>2+</sup> 是 Taq DNA 聚合酶维持活性所必须的, 低浓度 Mg<sup>2+</sup> 会降低 Taq DNA 聚合酶活性, 而高浓度 Mg<sup>2+</sup> 同样会增加扩增错配率。针对这 5 个主要影响因素, 实验采用正交设计优化 ITS2 序列的 PCR 反应体系, 兼顾每个因素和各因素之间的交互作用, 优化的阳春砂仁 ITS2 序列 PCR 反应体系 (Taq DNA 聚合酶 0.80U、dNTPs 0.20 mmol·L<sup>-1</sup>、Mg<sup>2+</sup> 2.50 mmol·L<sup>-1</sup>、DNA 模板 40ng、引物 0.20 μmol·L<sup>-1</sup>) 与菜薹<sup>[8]</sup> 相似; 5 个因素对 PCR 反应的影响程度 (Taq DNA 聚合酶>引物>Mg<sup>2+</sup>>dNTPs>DNA 模板) 与长柱金丝桃<sup>[9]</sup> 相似。

#### 参考文献:

- [1] 费希同, 巨苗苗, 林源, 等. ITS2 序列在植物 DNA 条形码鉴定中的应用 (综述) [J]. 亚热带植物科学 2014, 43 (4): 339-342
- [2] 陈士林, 宋经元, 姚辉, 等. 药用植物 DNA 条形码鉴定策略及关键技术分析 [J]. 中国天然药物, 2009, 7 (5): 322-327.
- [3] 刘梦楚. 基于“辨状论质”及气、味数字化的砂仁药材质量评价研究 [D]. 广州中医药大学, 2017.
- [4] 杨彩霞. 云南产阳春砂仁与进口砂仁化学成分及主要药效学的比较研究 [D]. 云南中医学院, 2017.
- [5] Chen S, Yao H, Han J, et al. Validation of the ITS2 Region as a Novel DNA Barcode for Identifying Medicinal Plant Species [J]. plos ONE, 2010, 5 (1): e8613.
- [6] 刘艳. 阳春砂组织培养与辐射诱变育种的初步研究 [D]. 广州中医药大学, 2010.
- [7] 何正文, 刘运生, 陈立华, 等. 正交设计直观分析法优化 PCR 条件 [J]. 湖南医科大学学报, 1998. 23 (4): 403-404.
- [8] 冒维维, 马金骏, 薄天岳, 等. 正交设计优化菜薹 ISSR 反应体系研究 [J]. 分子植物育种, 2006, 4 (6): 137-141.
- [9] 王丽俊, 王霞. 长柱金丝桃 ISSR-PCR 反应体系的建立与优化 [J]. 东北林业大学学报, 2017, 45 (10): 13-16.

#### 基金项目:

吉林省中医药科技项目 (2019156);  
吉林省大学生科技创新项目 (吉农院合字 [2019] 第 022 号);