

高特异性聚合酶链反应法鉴别大、小黄鱼鱼鳔及其混淆品

阎婷^{1,2*}, 李娜¹, 贾景明¹, 胡高升^{1#} (1. 沈阳药科大学中药学院, 沈阳 110016; 2. 辽宁医学院药学院, 辽宁锦州 121001)

中图分类号 R282.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)04-0491-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.04.19

摘要 目的: 建立可鉴别大、小黄鱼鱼鳔及其混淆品的高特异性聚合酶链式反应(PCR)方法。方法: 根据大、小黄鱼及6种常见混淆品线粒体12S rRNA基因序列, 设计两对专用于大、小黄鱼鱼鳔的鉴别引物Fish-F1、FishD-R1与Fish-F1、FishX-R2; 采用PCR法在不同的复性温度扩增, 确立特异性反应条件。结果: 在94℃预变性5 min; 94℃变性30 s, 60.4℃复性30 s, 72℃延伸30 s, 30个循环; 72℃延伸5 min扩增条件下, 大黄鱼鱼鳔得到约670 bp的扩增带, 而小黄鱼和混淆品鱼鳔在同样的条件下无扩增带。在94℃预变性5 min; 94℃变性30 s, 64.8℃复性30 s, 72℃延伸30 s, 30个循环; 72℃延伸5 min扩增条件下, 小黄鱼鱼鳔得到约670 bp的扩增带, 而大黄鱼和混淆品鱼鳔在同样的条件下无扩增带。结论: 设计的鉴别引物对大、小黄鱼鱼鳔有高度的特异性。本方法简单、准确、快速、重现性好、稳定性高, 能有效鉴别大、小黄鱼鱼鳔及其混淆品。

关键词 鱼鳔; 12S rRNA; 分子标记; 聚合酶链反应鉴别

Identification of Swimming Bladder of *Pseudosciaena crocea* and *Pseudosciaena polyactis* and Their Adulterants by Highly Specific PCR

YAN Ting^{1,2}, LI Na¹, JIA Jing-ming¹, HU Gao-sheng¹ (1. School of TCM, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China; 2. School of Pharmacy, Liaoning Medical University, Liaoning Jinzhou 121001, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To develop PCR method for the identification of swimming bladder of *Pseudosciaena crocea* and *Pseudosciaena polyactis* and their adulterants. METHODS: Based on the sequences of mitochondrial 12S rRNA gene of *P. crocea* and *P. polyactis* and 6 kinds of common adulterants, two pairs of highly specific primers (Fish-F1 and FishD-R1, Fish-F1 and FishX-R2) were designed for distinguishing *P. crocea* and *P. polyactis* respectively. The primers were amplified by PCR at different annealing temperatures to confirm specific reaction condition. RESULTS: 12S rRNA gene was pre-denatured for 5 min at 94℃; 12S rRNA gene was denatured for 30 s at 94℃, and then renatured for 30 s at 60.4℃, finally extended for 30 s at 72℃, the trial repeated for 30 cycles; a fragment about 670 bp was amplified only from swimming bladder of *P. crocea* but not from *P. polyactis* or adulterants when 12S rRNA gene was amplified for 5 min at 72℃. 12S rRNA gene was pre-denatured for 5 min at 94℃; 12S rRNA gene was denatured for 30 s at 94℃, and then renatured for 30 s at 64.8℃, finally extended for 30 s at 72℃, the trial repeated for 30 cycles; a fragment about 670 bp was amplified only from swimming bladder of *P. polyactis* but not from *P. polyactis* or adulterants when amplified for 5 min at 72℃. CONCLUSIONS: Designed specific primers are highly specific to swimming bladder of *P. crocea* and *P. polyactis*. Established method is stable, simple, accurate, rapid and reproducible, and can be used for the identification of *P. crocea*, *P. polyactis* and their adulterants.

KEYWORDS Swimming bladder; 12S rRNA; Molecular marker; PCR identification

鱼鳔又称鱼白、鱼胶和鱼肚,为石首鱼科黄鱼属动物大黄鱼 [*Pseudosciaena crocea* (Richardson)]、小黄鱼 (*P. polyactis* Bleeker) 或鲟科鲟鱼属动物中华鲟 (*Acipenser sinensis* Gray) 和鳊属动物鳊鱼 [*Huso dauricus* (Georgi)] 等的鱼鳔^[1]。鱼鳔作为贵重动物药材,不仅是筵席名菜,亦有很好的滋补作用和药用价值,如滋阴养血、止血补血和补肾益精等^[2-3]。由于鱼鳔商品来源复杂,市场上混淆品较多,仅仅根据形态特征来进行鉴别鱼鳔真伪已不能满足市场需求^[4]。随着分子标记技术的发展,运用DNA分子遗传标记技术鉴别中药材的真伪已被广泛认可^[5-7]。

* 讲师, 博士研究生。研究方向: 中药生物技术。E-mail: yantinglingxiao@163.com

通信作者: 讲师, 博士。研究方向: 中药生物技术和中药资源学。电话: 024-23986501。E-mail: hugsh_2006@hotmail.com

为了建立鱼鳔药材准确鉴别方法,本研究采用高特异性聚合酶链反应(PCR)技术对鱼鳔药材及其混淆品进行了DNA分子遗传标记鉴别。采用十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)法提取8种供试品鱼鳔的DNA,并对其线粒体12S rRNA基因进行特异性扩增,为经济适用、准确便捷和高稳定性地鉴别鱼鳔种属来源提供依据,同时有利于鱼鳔药材的质量控制。

1 材料

1.1 仪器

Hema 9600 型梯度基因扩增仪、TGL-16R/18R 型冷冻高速冷冻离心机(珠海黑马医学仪器有限公司); HE-120 型多功能水平电泳槽、EPS300 型电泳仪(上海天能科技有限公司)。

1.2 药材

大、小黄鱼鱼鳔来源于市场购买的大黄鱼、小黄鱼、混淆

品鱼鳔来源于市场购买的青鱼、鲮鱼、鲤鱼、草鱼、鲢鱼和鲫鱼,正品、混淆品均经沈阳药科大学中药学院贾景明教授鉴定为真品。

1.3 试剂

PCR试剂盒、DNA Marker III均购自北京康为世纪生物科技有限公司;琼脂糖(香港基因有限公司);溴化乙锭(上海生物工程技术有限公司);所用引物订购于生工生物工程(上海)有限公司。

2 方法

2.1 大、小黄鱼鱼鳔高特异性PCR鉴别引物的设计

从GenBank下载大、小黄鱼及混淆品青鱼、鲮鱼、鲤鱼、草鱼、鲢鱼、鲫鱼的线粒体12S rRNA基因序列(GenBank登录号依次为:FJ595214.1、FJ618559.1、NC_011141.1、NC_016420.1、AP009047.1、HQ891005.1、NC_010156.1、AB045144.1)。经DNAMAN软件进行多序列比对,分析正品、混淆品间DNA序列差异,在差异较大区域设计特异性引物,在保守序列处设计通用引物。大、小黄鱼鱼鳔的特异性引物为Fish-F1(5'-ATCAGGCACAACCAACCATAG-3')和FishD-R1(5'-GACATGTATTTCAGTATGTCA-3');小黄鱼鱼鳔的特异性引物为Fish-F1和FishX-R2(5'-GACATGTGTTTCAGCATGTTA-3')。通用引物及序列为:Univ-F(5'-AAACTGGGATTAGATACCCCATAT-3')和Univ-R(5'-GAGAGTGACGGGCGGTGTGT-3')。大、小黄鱼及其混淆品12S rRNA部分序列见图1(实线箭头部分为特异性引物,虚线箭头部分为通用引物)。

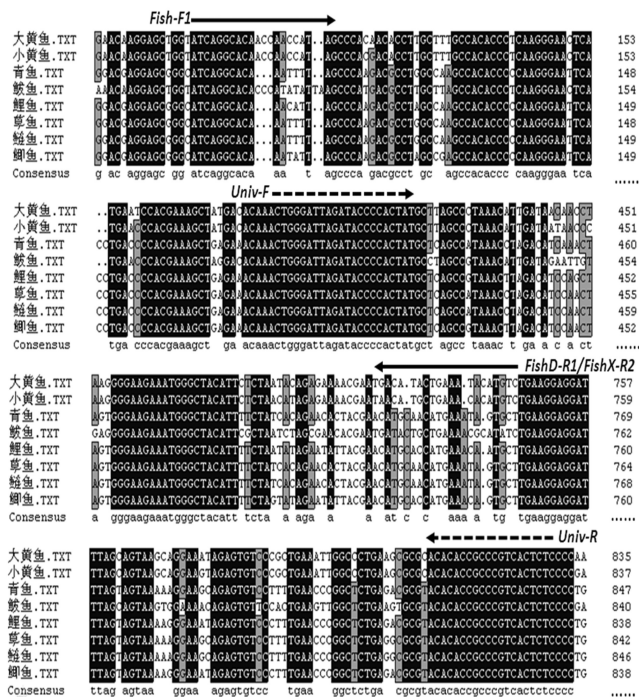


图1 大、小黄鱼及其混淆品12S rRNA部分序列

Fig 1 Multiple alignment of 12S rRNA sequences of *P. crocea*, *P. polyactis* and their adulterants

2.2 模板DNA的提取

取大、小黄鱼及混淆品青鱼、鲮鱼、鲤鱼、草鱼、鲢鱼和鲫鱼的鱼鳔组织约50 mg,采用CTAB法^[8]提取基因组总DNA,

并稍作改进。将供试品鱼鳔组织分别置于研钵中,加液氮研磨成粉末状。在1.5 ml离心管中分别加入1 ml 65 °C预热CTAB裂解液[CTAB 2%, Tris-HCl 100 mmol/L, 乙二胺四乙酸(EDTA)10 mmol/L, NaCl 1.4 mol/L, 用前加2% β-巯基乙醇],将研磨成粉的鱼鳔组织迅速加入该离心管中,充分混匀后置65 °C水浴1 h,期间每隔20 min颠倒振荡1次。水浴结束后,在离心管中加500 μl氯仿-异戊醇(24:1, V/V),振荡后以离心半径为12 cm、12 000 r/min离心15 min。取上清液,加等体积异丙醇,摇匀后室温静置5 min,以离心半径为12 cm、12 000 r/min离心5 min,弃上清液,得到DNA沉淀,加入750 μl 75%乙醇洗涤2次,沉淀风干后溶于20 μl TE缓冲液中,用琼脂糖凝胶电泳检测,-20 °C贮藏,备用。

2.3 高特异性PCR鉴别方法

PCR反应体系10 μl,其中10×PCR无Mg²⁺的缓冲液1 μl,高纯dNTP(2.5 mmol/L)0.8 μl, Taq DNA聚合酶(5 U/μl)0.1 μl, MgCl₂(25 mmol/L)0.8 μl,引物Fish-F1、FishD-R1或引物Fish-F1、FishX-R2各0.2 μl(10 μmol/L),模板1 μl,无菌水5.9 μl。PCR反应条件:94 °C预变性5 min;94 °C变性30 s,55 °C复性30 s,72 °C延伸30 s,30个循环;72 °C延伸5 min。选用不同的复性温度以寻找合适的PCR鉴别反应参数。实验中设置不含DNA模板的阴性对照。取2 μl反应液经1%琼脂糖凝胶电泳,溴化乙锭荧光(EB)染色,紫外分析检测,成像。同时用扩增约420 bp的12S rRNA基因片段的通用引物Univ-F和Univ-R在55 °C的复性温度下对上述用于PCR鉴别的模板DNA作阳性扩增对照。

3 结果

3.1 模板质量的检测

大、小黄鱼鱼鳔及混淆品提取的DNA模板用通用引物Univ-F和Univ-R扩增,得到约420 bp扩增带,与理论预测大小一致,表明样品中模板DNA质量符合PCR反应的要求。通用引物Univ-F和Univ-R扩增的PCR产物琼脂糖凝胶电泳见图2。

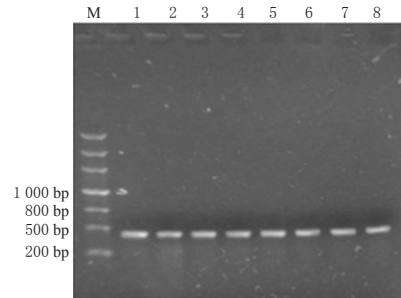


图2 通用引物Univ-F及Univ-R扩增的PCR产物琼脂糖凝胶电泳图

M. DNA marker; 1. *P. crocea*; 2. *P. polyactis*; 3. *Mylopharyngodon piceus*; 4. *Scomberomorus niphonius*; 5. *Cyprinus carpio*; 6. *Hypophthalmichthys molitrix*; 7. *Ctenopharyngodon idellus*; 8. *Ctenopharyngodon idellus*

Fig 2 Agarose gel electrophoresis of PCR product using general primer Univ-F and Univ-R

M. DNA marker; 1. *P. crocea*; 2. *P. polyactis*; 3. *Mylopharyngodon piceus*; 4. *Scomberomorus niphonius*; 5. *Cyprinus carpio*; 6. *Hypophthalmichthys molitrix*; 7. *Ctenopharyngodon idellus*; 8. *Ctenopharyngodon idellus*

3.2 高特异性PCR鉴别

3.2.1 大黄鱼鱼鳔 用大黄鱼鱼鳔特异性引物PCR扩增8种供试鱼鳔的DNA,当复性温度分别为50.7℃和55.5℃时,大黄鱼鱼鳔和小黄鱼鱼鳔均有1条带;当复性温度升至60.4℃、30个循环时,其反应具有高度特异性,仅大黄鱼鱼鳔有良好的单一扩增带,其余样品皆无扩增带出现。故特异性PCR循环参数确定为:94℃预变性5 min;94℃变性30 s,60.4℃复性30 s,72℃延伸30 s,30个循环;72℃延伸5 min。经PCR循环,得670 bp的扩增带。因此,依据鉴别引物扩增模板DNA有无扩增条带即可确定受试样品是否为大黄鱼鱼鳔。大黄鱼鱼鳔特异性引物Fish-F1及FishD-R1 PCR产物琼脂糖凝胶电泳图见图3。

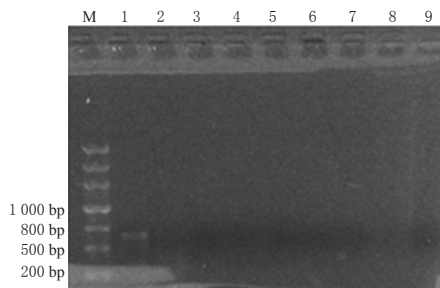


图3 大黄鱼鱼鳔特异性引物Fish-F1及FishD-R1 PCR产物琼脂糖凝胶电泳图

M. DNA marker; 1. 大黄鱼; 2. 小黄鱼; 3. 青鱼; 4. 鲛鱼; 5. 鲤鱼; 6. 鲢鱼; 7. 草鱼; 8. 鲫鱼; 9. 阴性对照

Fig 3 Agarose gel electrophoresis of PCR product using specific primers Fish-F1 and FishD-R1 of swimming bladder of *P. crocea*

M. DNA marker; 1. *P. crocea*; 2. *P. polyactis*; 3. *Mylopharyngodon piceus*; 4. *Scomberomorus niphonius*; 5. *Cyprinus carpio*; 6. *Hypophthalmichthys molitrix*; 7. *Ctenopharyngodon idellus*; 8. *Ctenopharyngodon idellus*; 9. negative control

3.2.2 小黄鱼鱼鳔 用小黄鱼鱼鳔特异性引物PCR扩增8种供试鱼鳔的DNA,当复性温度分别为61℃和62.4℃时,大黄鱼鱼鳔和小黄鱼鱼鳔均有1条带;当复性温度升至64.8℃、30个循环时,其反应具有高度特异性,仅小黄鱼鱼鳔有良好的单一扩增带,其余样品皆无扩增带出现。故特异性PCR循环参数确定为:94℃预变性5 min;94℃变性30 s,64.8℃复性30 s,72℃延伸30 s,30个循环;72℃延伸5 min。经PCR循环,得670 bp的扩增带。因此,依据鉴别引物扩增模板DNA有无扩增条带即可确定受试样品是否为小黄鱼鱼鳔。小黄鱼鱼鳔特异性引物Fish-F1及FishX-R2 PCR产物琼脂糖凝胶电泳图见图4。

4 讨论

本研究运用CTAB法提取了8种供试鱼鳔的DNA,该方法操作简便、快捷,且能够满足PCR需要。

为实现准确鉴别鱼鳔真伪的目的,本研究寻找市场上充伪频率高、价格低廉、外观形态上与大、小黄鱼相近的品种进

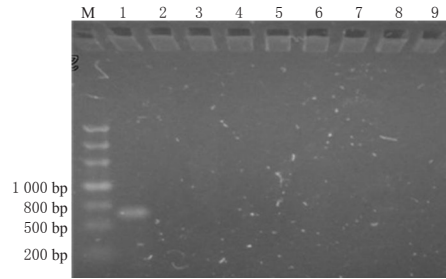


图4 小黄鱼鱼鳔特异性引物Fish-F1及FishX-R2 PCR产物琼脂糖凝胶电泳图

M. DNA Marker; 1. 小黄鱼; 2. 大黄鱼; 3. 青鱼; 4. 鲛鱼; 5. 鲤鱼; 6. 鲢鱼; 7. 草鱼; 8. 鲫鱼; 9. 阴性对照

Fig 4 Agarose gel electrophoresis of PCR product using specific primers Fish-F1 and FishX-R2 of swimming bladder of *P. polyactis*

M. DNA marker; 1. *P. polyactis*; 2. *P. crocea*; 3. *Mylopharyngodon piceus*; 4. *Scomberomorus niphonius*; 5. *Cyprinus carpio*; 6. *Hypophthalmichthys molitrix*; 7. *Ctenopharyngodon idellus*; 8. *Ctenopharyngodon idellus*; 9. negative control

行了PCR鉴别。结果表明,运用DNA分子标记技术能够准确鉴别大、小黄鱼鱼鳔和其他混淆品,为鱼鳔药材质量标准的制定提供了依据。研究还发现,若将这两对特异性引物分别配成鉴别试剂盒,PCR时只需加入模板,反应完成后即可直接电泳,使鉴别反应更加简化、便捷,可为各级药检所鉴定药材真伪提供参考。

参考文献

- [1] 南京中医药大学. 中药大辞典:上册[M]. 上海:上海科学技术出版社,2006:2 001.
- [2] 胡献国. 誉为“鱼中人参”的鱼鳔[J]. 药膳食疗,2003(2):9.
- [3] 王安甫. 自拟鱼鳔生精汤治疗少精子活力低的临床观察[J]. 新疆中医药,1999,17(1):20.
- [4] Sarah LG. Ultrastructure and innervation of the swimbladder of *Tetraodon glaber* (Tetraodontidae) [J]. *Cell Tissue Res*, 1984,237(2):277.
- [5] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 2010年版. 北京:中国医药科技出版社,2010:72.
- [6] 唐晓晶,冯成强,黄璐琦,等. 高特异性PCR方法鉴别乌梢蛇及其混淆品[J]. 中国药学杂志,2007,42(5):333.
- [7] 李恩波,孙稚颖. 艾叶及其常见混伪品的分子鉴定[J]. 中国药房,2013,24(43):4 037.
- [8] Scott OR, Arnold J. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh herbarium and mummified plant tissues [J]. *Plant Mol Biol*, 1985,5(2):69.

(收稿日期:2014-02-25 修回日期:2014-04-19)

(编辑:张 静)