

# 基于高分辨率熔解曲线分析技术鉴别 杭白菊和黄山贡菊的初步研究

陈绍宁,顾小川,姜鹏辉,李晴妍

(浙江理工大学生命科学学院,杭州 310018)

**摘 要:**杭白菊和贡菊同为药茶两用的药材,种植较多,种质相近。然而两者保健功效、药用成分各有不同,饮用或入药时需加以区分,传统鉴别方法主观性强,往往难以精确区分。文章提出一种中药材分子鉴定方法,采用高分辨率熔解曲线(High resolution melting, HRM),并结合 DNA 条形码 ITS2 序列对杭白菊和黄山贡菊进行快速鉴别。以杭白菊及黄山贡菊干燥药材为样品,ITS2 序列作为 DNA 条形码,获得 ITS2 序列的高分辨率熔解曲线;建立检测鉴定杭白菊与黄山贡菊的 HRM-荧光定量 PCR 方法和杭白菊和黄山贡菊高分辨率熔解曲线模型;在 HRM-PCR 条件下,建立杭白菊和黄山贡菊的标准化高分辨率熔解曲线图、高分辨率熔解曲线衍生差异图,并应用该方法检测市售杭白菊和黄山贡菊共 10 份样品。结果表明:利用高分辨率熔解曲线技术能够有效地区分开杭白菊和黄山贡菊,为进一步应用高分辨率熔解曲线分析技术鉴定中药材提供理论基础和技术依据。

**关键词:** 高分辨率熔解曲线;杭白菊;贡菊;DNA 条形码;ITS2 序列

**中图分类号:** R927.11

**文献标志码:** A

**文章编号:** 1673-3851(2018)05-0346-06

## 0 引 言

高分辨率熔解曲线(High resolution melting, HRM)是一种分辨率高、简单高效的 DNA 检测技术,分辨精度可以区分单个碱基差异;HRM 技术原理基于 DNA 序列因片段长度、GC 含量、GC 分布的不同,在 PCR 过程中加热变性时会产生特有的熔解曲线形状与位置<sup>[1]</sup>。HRM 利用饱和染料结合实时荧光定量 PCR,对 PCR 反应产物进行分析,实时监测核苷酸双链熔解过程荧光信号的积累,获得高分辨率熔解曲线,监测双链熔解随温度变化产生的曲线,可直观地反映 PCR 产物的差异,进行 PCR 熔解曲线分析<sup>[1]</sup>。HRM 作为一种新型的分子诊断技术,具有高通量、低成本、简单直观等优点,在中药真伪鉴定中应用广泛<sup>[2-5]</sup>。陈康等<sup>[6]</sup>利用熔解曲线分析技术扩增鹿茸药材的 DNA 条形码 CO I 序列,通过比较熔解曲线峰形和 T<sub>m</sub> 位置来鉴别马鹿、梅花鹿及其混伪品,建立正品鹿茸药材熔解曲线模型。

胡峻等<sup>[7]</sup>对木通类药材进行了基于 DNA 条形码序列的高分辨率熔解曲线分析,建立了通过比较熔解曲线和 T<sub>m</sub> 位置鉴别不同来源木通类药材的检测方法。高分辨率熔解曲线分析技术通过监控荧光定量 PCR 过程产生的熔解曲线变化进行分析,是物质分类和鉴定的新技术,在中药分子鉴定中具有广泛应用前景<sup>[8]</sup>。

菊花(*Dendranthema morifolium* (Ramat.) Tzvel.)作为药食同源的一种药材,既可入药,也可做茶<sup>[9]</sup>。中药菊花是取用菊科植物头状花序经干燥加工而成,菊花品类众多,2015 版《中华人民共和国药典》收录亳菊、滁菊、贡菊、杭菊和怀菊<sup>[10]</sup>。其中杭菊和贡菊是药茶两用、茶用为主的品类,种植生产较多,且两者种质相近<sup>[11]</sup>。杭菊又分为杭白菊和杭黄菊。杭白菊原产自浙江桐乡,为著名的“浙八味”之一,贡菊主产于安徽歙县,并覆盖黄山市。两者虽同为药茶两用菊花,但在保健功效、药用成分及药理方面各有不同,饮用或入药时需加以区分<sup>[12]</sup>。

传统鉴别菊花的方法主要包括性状鉴定、显微鉴定、理化鉴定等,但是传统方法主观性强,往往难以精确区分<sup>[13-16]</sup>。DNA 条形码技术利用可作为物种鉴定的序列标签进行生物物种分类和鉴定,广泛应用于各类物种鉴定,同时也被应用到中药材鉴定研究中<sup>[17]</sup>。DNA 条形码技术鉴定中药材不依赖于药材外观形态,该方法用于鉴定中药材与其常见混伪品,具有客观、稳定、重复性强的特点,弥补传统鉴定方法的不足<sup>[5]</sup>。用于中药材鉴定的 DNA 条形码序列主要包括 ITS2、psbA-trnH、matK 和 rbcL 等。其中,ITS2 是真核生物 rDNA 上的一段高度重复的串联结构单位,在种属水平的变异较为明显,具有更多的突变位点以便于区分鉴别不同的种属<sup>[18]</sup>。

本文选用 ITS2 序列作为 DNA 条形码标记,采用高分辨率熔解曲线分析技术,对杭白菊及黄山贡菊进行基于 ITS2 的熔解曲线分析,建立利用高分辨率熔解曲线分析技术鉴别杭白菊和黄山贡菊的方法。

1 材料与方法

1.1 药材材料

菊花对照样品,购自中国食品药品检定研究院,杭白菊和黄山贡菊市售药材样本共计 10 个,具体见表 1。

表 1 药用菊花样品及来源

序号	品种	拉丁名	产地
1	杭白菊	<i>D. morifolium</i> "Hangbaiju"	浙江桐乡
2	杭白菊	<i>D. morifolium</i> "Hangbaiju"	浙江桐乡
3	杭白菊	<i>D. morifolium</i> "Hangbaiju"	浙江桐乡
4	杭白菊	<i>D. morifolium</i> "Hangbaiju"	浙江嘉兴
5	杭白菊	<i>D. morifolium</i> "Hangbaiju"	浙江嘉兴
6	黄山贡菊	<i>D. morifolium</i> "Gongju"	安徽歙县
7	黄山贡菊	<i>D. morifolium</i> "Gongju"	安徽歙县
8	黄山贡菊	<i>D. morifolium</i> "Gongju"	安徽亳州
9	黄山贡菊	<i>D. morifolium</i> "Gongju"	安徽亳州
10	黄山贡菊	<i>D. morifolium</i> "Gongju"	安徽亳州

1.2 DNA 提取

取杭白菊和贡菊样品各 200 mg,液氮研磨成粉状,参照(磁珠法)深加工产品基因组 DNA 抽提试剂盒(生工生物工程公司)的方法提取药材样品的总基因组 DNA,取 5.0  $\mu$ L DNA 经 1%琼脂糖凝胶电泳对样本进行质量检测,并经微量紫外可见分光光度计测定 DNA 的纯度和浓度。将所提取 DNA 样品调整至 10.0 ng/ $\mu$ L 作为模板用于熔解曲线分析。

1.3 PCR 扩增与高分辨率熔解曲线分析

ITS2 序列的 PCR 扩增和高分辨率熔解曲线分析在 Light Cycler 480 II 仪器(Roche, 德国)进行。序列引物使用 ITS2 通用引物(ITS3-F: ATGCGAT ACTTGGTGTGAAT; ITS2-R: GACGCTTCTCC AGACTACAAT),由英潍捷公司合成。反应体系为:2 $\times$ Green-2-Go Master mix 5.0  $\mu$ L(BBI 公司)、引物(10  $\mu$ mol/L)各 0.4  $\mu$ L、模板 DNA 1.0  $\mu$ L、RNase free H<sub>2</sub>O 补充总体积到 10.0  $\mu$ L。PCR 及熔解曲线程序为:95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;95 $^{\circ}$ C 变性 30s, 60 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s,共 40 个循环。扩增结束后进行熔解曲线分析,反应条件为 95 $^{\circ}$ C 1 min, 40 $^{\circ}$ C 1 min,熔解曲线数据收集从 65 $^{\circ}$ C 到 95 $^{\circ}$ C,温度上升速率为 1 $^{\circ}$ C/s。

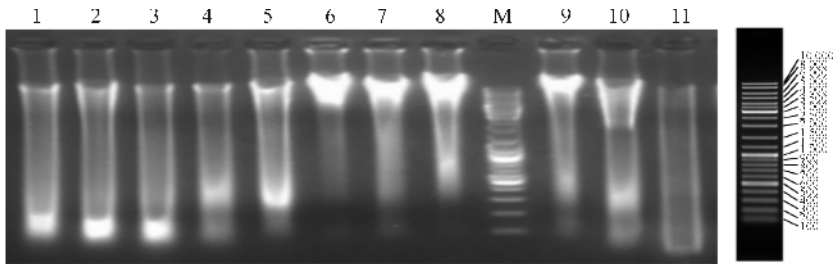
1.4 检测结果对比分析

分别取杭白菊与黄山贡菊样品的 PCR 扩增产物进行测序,并结合样品序列与高分辨率熔解曲线检测结果对比分析,验证高分辨率熔解曲线分析技术的检测结果。

2 结果与分析

2.1 提取的 DNA 质量分析

紫外分光光度计法测得所提取样品 DNA 质量浓度为 50.22~112.42 ng/ $\mu$ L,A260/A280 均在 1.8 左右。凝胶电泳检测结果(图 1 所示)显示所提取 DNA 稍有降解,基因组 DNA 条带清晰。说明样品 DNA 质量良好,可用于后续的 PCR 及 HRM 分析。



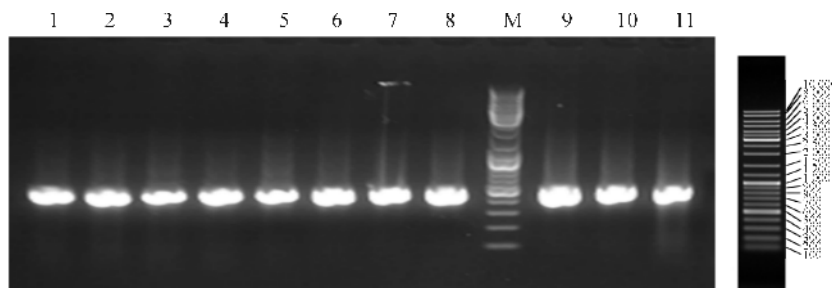
M:DNA Ladder;1—5:杭白菊样品;6—10:黄山贡菊;11:菊花对照品

图 1 杭白菊及黄山贡菊 DNA 琼脂糖凝胶电泳检测图

## 2.2 PCR 扩增与熔解曲线分析

以浓度为  $10 \text{ ng}/\mu\text{L}$  的杭白菊及贡菊 DNA 为模板,PCR 扩增 ITS2 序列。电泳检测结果如图 2。

杭白菊及黄山贡菊的 PCR 产物长度在  $400\sim 500 \text{ bp}$  之间,符合预期。

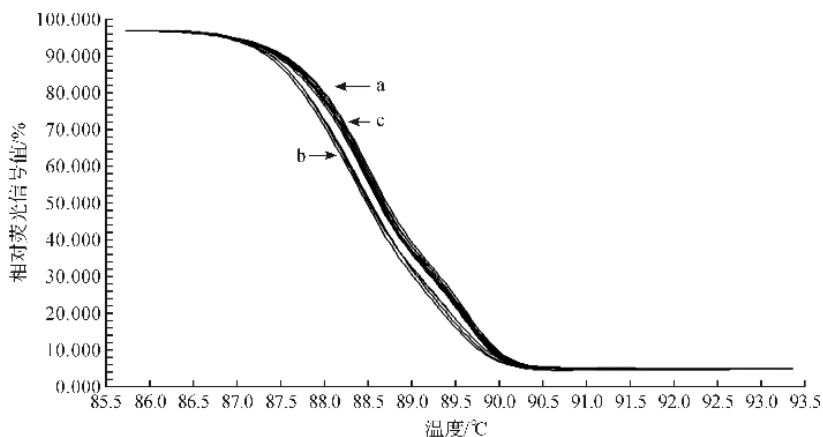


M: DNA Ladder; 1—5: 杭白菊样品; 6—10: 黄山贡菊样品; 11: 菊花对照品

图2 杭白菊及黄山贡菊 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳检测图

PCR 产物进行 HRM 分析,以  $T_m$  值为横坐标,以荧光信号值为纵坐标,获得标准化的熔解曲线,结果如图 3,可见杭白菊和黄山贡菊的熔解曲线都表现出不同的形状特点。10 份样品的标准化熔

解曲线聚类分成两束,其中菊花对照样品与 5 条杭白菊的熔解曲线聚为一束,5 条黄山贡菊的熔解曲线聚为一束。从标准化的熔解曲线图中可以明确区分杭白菊与黄山贡菊。

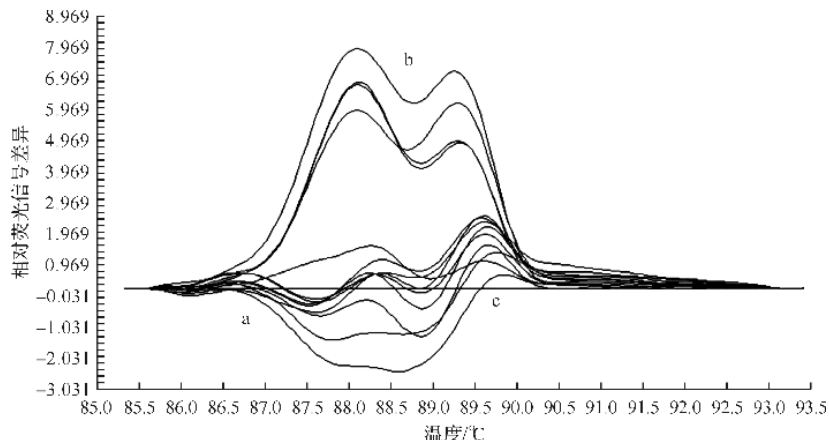


a: 杭白菊; b: 黄山贡菊; c: 菊花对照品

图3 标准化的随温度变化的高分辨率熔解曲线

以菊花对照品为参照做基线,与其他样品产生相对荧光值的差值为纵坐标生成衍生熔解曲线差异图(图 4 所示)。5 条杭白菊差异曲线成束聚与基线

附近,5 条黄山贡菊差异曲线线形一致且成束分布与基线上方。熔解曲线差异图将杭白菊与黄山贡菊熔解曲线差异放大,更有利于区分与鉴定。



a: 杭白菊; b: 黄山贡菊; c: 菊花对照品

图4 杭白菊及黄山贡菊鉴定的高分辨率熔解曲线差异图

### 2.3 扩增产物的序列分析

分别对 5 份杭白菊和 5 份黄山贡菊样品的 PCR 扩增产物进行测序分析,结果如图 5。测序结果序列分析结果显示:杭白菊第 230 位点碱基为

T,而黄山贡菊 230 位点处为 C,杭白菊与黄山贡菊 ITS2 序列仅在 230 位点出现差异。杭白菊与购自中国食品药品鉴定研究院的菊花 ITS2 序列一致。

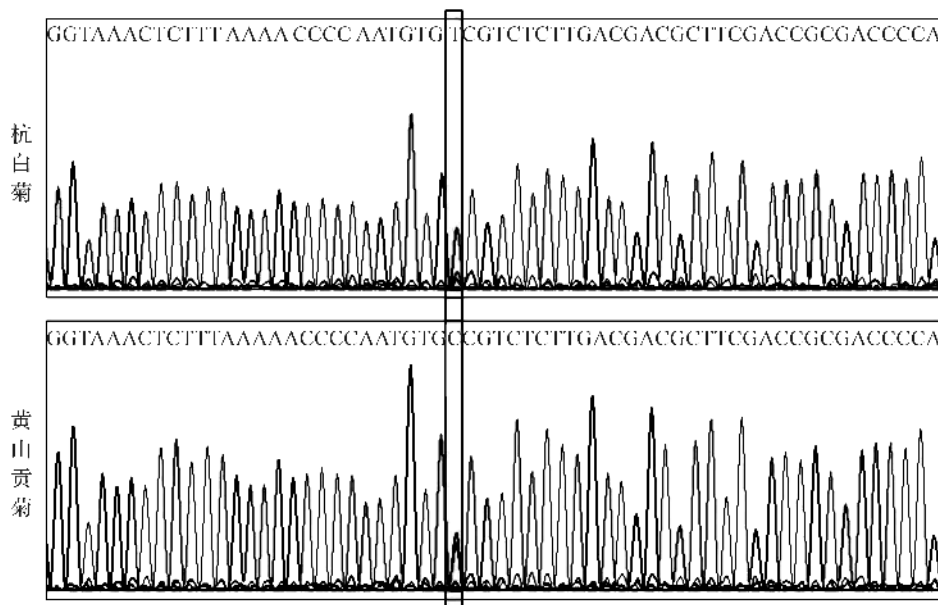


图 5 杭白菊及黄山贡菊 ITS2 序列差异位点示意图

## 3 讨论

菊花入药历史悠久,在道地产区栽培时间久远。因无性繁殖及频繁引种,导致菊花的组织形态、外部形态及理化成分产生差异,演化成“杭菊”、“贡菊”、“亳菊”、“滁菊”、“济菊”、“祁菊”、“怀菊”、“川菊”等不同栽培类型<sup>[15]</sup>。对不同种源菊花的外部形态及分子标记鉴定结果显示,杭白菊与贡菊亲缘关系最近,但两者理化成分存在显著差异,菊花的理化成分主要包括黄酮类、酚酸类和挥发油类等活性物质<sup>[14-16, 19-20]</sup>。葛永斌等<sup>[12]</sup>利用比色法、HPLC 和 GC-MS 方法分析不同产地菊花的几类成分,发现杭白菊与贡菊挥发油、黄酮成分总量种类差异较大,贡菊所含黄酮和挥发油含量均高于杭白菊。杭白菊和黄山贡菊的 Zn、Mn、Fe、Cu、Mg 和 Pb 等微量元素进行测定分析表明,杭白菊 Fe 含量高于黄山贡菊,而黄山贡菊 Mn、Ca 含量显著高于杭白菊<sup>[21]</sup>。因此二者药效及保健效果存在一定差异,入药或饮用时需加以区分。

传统鉴别菊花的方法主要采用性状鉴定、显微鉴定及理化鉴定等方法。徐娟华等<sup>[16]</sup>根据头状花序的总苞片、舌状花、管状花、花托等特征对杭白菊和贡菊等 5 种菊花进行解剖学分析,确定杭白菊和贡菊的原植物基原为 *D. morifolium* (Ramat.)

Tzvel。同样,周建理等<sup>[15]</sup>对杭白菊、贡菊、亳菊等 5 个品种的菊花进行系统的形态学比较,鉴别商品菊花的性状,发现杭白菊与贡菊在总苞片数目形状上差异明显。王勤等<sup>[22]</sup>选取杭菊、贡菊以及怀菊,严格按照相关标准进行叶长度、宽度,头状花序直径的测量,并利用统计软件进行分析,结果显示,不同的菊花在叶形、叶片大小、头状花序大小上存在极显著差异。菊花受气候、土壤环境、生长发育阶段等因素的影响,形态外观及理化特征差异较大,仅仅依靠主观性强的传统鉴别中药材的方法难以精准区分。

分子标记技术用于鉴别中药具有灵敏度高、特异性强、稳定可靠等优点。徐文斌等<sup>[20]</sup>利用分子标记技术对 22 个类型的药用菊花进行遗传多样性的 RAPD 初步分析,结果表明利用 RAPD 技术可以将杭菊、贡菊、亳菊和怀菊区分。吕琳等<sup>[14]</sup>分析不同种源药用菊花的 ISSR 分子标记,聚类分析结果表明,杭白菊和贡菊亲缘关系较近,怀菊、祁菊及小亳菊则聚为一支。利用遗传多样性关系分析可以将不同菊花聚类区分,但对菊花进行精准鉴别和鉴定尚有待于进一步研究。

ITS2 作为一种 DNA 条形码,两端较为保守,遗传稳定性高,中间差异稳定,即使在菊科这样庞大的科系中,鉴定效果也可以达到 76%,高于其他条形码序列<sup>[23]</sup>。ITS2 可以通过植物 ITS2 序列通用



引物进行扩增,其长度一般在 200~400 bp 之间,适合测序以及扩增<sup>[24-25]</sup>。

本文选取 ITS2 片段作为鉴别片段,在 DNA 模板 10 ng/ $\mu$ L、引物浓度 0.4  $\mu$ mol/L 和退火温度为 60  $^{\circ}$ C 条件下,杭白菊和黄山贡菊 DNA 分别获得稳定、一致的熔解曲线,能清晰区分杭白菊和黄山贡菊。以菊花对照样品为基线,将其他样品荧光信号值与其进行差减后求导,获得熔解曲线差异图,将样品间熔解曲线差异放大,能够更准确地地区分杭白菊和黄山贡菊。本文将高分辨率熔解曲线分析技术与 ITS2 序列分析结合,对种质极为相近的杭白菊和黄山贡菊进行鉴别,初步建立区分和鉴别两种菊花的分子技术,该方法可用于鉴别不同品种的菊花,但对同一品种与引种至其他产地形成的栽培种的鉴定效果本文并未涉及。本文结果可为探索高分辨率熔解曲线分析技术结合 DNA 条形码技术在中药材鉴定方面提供理论依据和技术参考。

## 4 结 论

利用高分辨率熔解曲线技术检测分析杭白菊和黄山贡菊的荧光定量 PCR 曲线分型。标准化随  $T_m$  值变化的熔解曲线图可以区分杭白菊和黄山贡菊。以菊花对照样品为标准参照做基线,获得派生的熔解曲线差异图将二者差异放大,能够更加精准地区分杭白菊和黄山贡菊。测序结果显示:杭白菊与黄山贡菊 ITS2 序列存在差异,与高分辨率熔解曲线分析结果一致。

## 参考文献:

- [1] Wittwer C T. High resolution DNA melting analysis: advancements and limitations [J]. Human Mutation, 2009,30(6):857-859.
- [2] Song M, Li J, Xiong C, et al. Applying high-resolution melting (HRM) technology to identify five commonly used Artemisia species[J]. Science Report, 2016,4(6): 34133.
- [3] Li J, Zhao GH, Lin R, et al. Rapid detection and identification of four major Schistosoma species by high-resolution melt (HRM) analysis [J]. Parasitology Research, 2015,114(11):4225-4232.
- [4] Sun W, Yan S, Li J, et al. Study of commercially available Lobelia chinensis products using bar-HRM technology[J/OL]. Frontiers in Plant Science, 2017,8. <http://doi: 10.3389/fpls.2017.00351>.
- [5] Shi M, Li X, Feng J. High-resolution melting analysis assay for identification of Fonsecaea species[J]. Journal of Clinical Laboratory analysis, 2017, <http://doi: 10.1002/jcla.22257>.
- [6] 陈康,蒋超,袁媛,等. 基于熔解曲线分析技术的鹿茸药材分子鉴别[J]. 中国中药杂志, 2015,40(4):619-623.
- [7] 胡峻,詹志来,袁媛,等. 基于熔解曲线分析技术的木通类药材的分子鉴别[J]. 中国中药杂志, 2015,40(2): 2304-2308.
- [8] 陈康,蒋超,袁媛,等. 高分辨率熔解曲线技术及其在中药 DNA 分子鉴定中的应用[J]. 药学报, 2015,50(12):1581-1588.
- [9] 田晓华. 不同菊花的药理作用分析[J]. 中国现代药物应用, 2015,9(4):212-213.
- [10] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社, 2015:310-311.
- [11] 李建民,李华擎,胡世霞. 菊花商品种类现状考察[J]. 中国当代医药, 2016,23(6):93-96.
- [12] 葛永斌,燕傲蕾,徐娟,等. 不同产地的 4 种药用菊花成分差异与其影响因素[J]. 黄山学院学报, 2015,17(3): 65-67.
- [13] 李冬玲,朱洪武,任全进,等. 不同来源药用菊花营养器官形态研究[J]. 中药材, 2010,33(12):1845-1849.
- [14] 吕琳,秦民坚,贺丹霞,等. 不同种源药用菊花、野菊和菊花脑的 ISSR 分子标记及遗传关系分析[J]. 植物资源与环境学报, 2008,17(1):7-12.
- [15] 周建理,袁如柏,刘翔. 各种商品菊花的性状鉴别[J]. 中国中药杂志, 2002,27(1):20-22.
- [16] 徐娟华,田中俊弘. 杭白菊的横切面组织形态及与其它 4 种菊花的比较研究[J]. 中药材, 2002,25(2):89-94.
- [17] 陈士林,孙永珍,徐江,等. 本草基因组计划研究策略[J]. 药学报, 2010,45(7):807-812.
- [18] Chen S L, Yao H, Han J P, et al. Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species[J]. Plos One, 2014,5(1): 8613.
- [19] 王亮,汪涛,郭巧生,等. 昆仑雪菊与杭菊、贡菊主要活性成分比较[J]. 中国中药杂志, 2013,38(20):3442-3445.
- [20] 徐文斌,郭巧生,王长林. 药用菊花遗传多样性的 RAPD 分析[J]. 中国中药杂志, 2006,31(1):18-21.
- [21] 卓莉,李霞,邱贵江. 杭白菊与黄山贡菊中微量元素的测定[J]. 内江师范学院学报, 2008,23(4):104-105.
- [22] 王勤. 药用菊花不同栽培类型植物学形态比较[J]. 现代园艺, 2015,20(10):6.
- [23] Gao T, Yao H, Song J Y, et al. Evaluating the feasibility of using candidate DNA barcodes in discriminating species of the large Asteraceae family [J]. BMC Evolutionary Biology, 2010,10(1):324-331.

- [24] Li D Z, Liu J Q, Chen S L, et al. Plant DNA barcoding in China [J]. Journal of Systematics and Evolution, 2011, 60(49): 165-168.
- [25] Li M, Cao H, Shaw P C, et al. Identification of herbal medicinal materials using DNA barcodes [J]. Journal of Systematics and Evolution, 2011, 49(3): 271-283.

## Preliminary study of identification of medicinal material *Dendranthema morifolium* “Hangbaiju” and *Dendranthema morifolium* “Gongju” based on the HRM technology

CHEN Shaoning, GU Xiaochuan, JIANG Penghui, LI Qingyan

(College of Life Science, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China)

**Abstract:** Medicinal materials *Dendranthema morifolium* “Hangbaiju” (*D. morifolium*, “Hangbaiju”) and *Dendranthema morifolium* “Gongju” (*D. morifolium*, “Gongju”) were identified using high resolution melting (HRM) technology and ITS2 sequences were used as authentication sequences. This research provides a new molecular technology for identification of medicinal materials. HRM were carried out using dried materials of *D. morifolium* “Hangbaiju” and *D. morifolium* “Gongju” and ITS2 sequences as DNA barcode. Methods for identification of *D. morifolium* “Hangbaiju” and *D. morifolium* “Gongju” using HRM were established. The normalized melting peak curves and different plot were characterized. Total 10 commercial *D. morifolium* samples were detected and identified by this method. As a result, *D. morifolium* “Hangbaiju” and *D. morifolium* “Gongju” can be easily distinguished by this method.

**Key words:** high resolution melting curves; *Dendranthema morifolium* “Hangbaiju”; *Dendranthema morifolium* “Gongju”; DNA barcode; ITS2 sequences

(责任编辑:唐志荣)