浙 江 林 业 科 技，2018，38（6）：29－32
J Zhejiang For Sci Technol

doi:10.3969/j.issn.1001-3776.2018.06.005

基于单核苷酸多态性位点的土沉香物种鉴定

张明哲[1]，尹文秀[1]，陈　哲[1]，吴　姗[1]，虞惠贞[1]，张晓峰[1]，许　瑾[2]，李明福[2]，吴　蓉[1]

（1. 浙江省检验检疫科学技术研究院，浙江　杭州　310016；2. 中国检验检疫科学研究院，北京　100176）

摘要：对土沉香 *Aquilaria sinensis*，云南沉香 *A. yunnanensis* 和马来沉香 *A. malaccensis* 3 种沉香属 *Aquilaria* 植物的 ITS 序列进行 PCR 扩增和测序，并通过 DNAMAN 软件筛选出单核苷酸多态性（SNP）位点，土沉香序列第 236 位上的碱基为 C，而云南沉香和马来沉香为 T，设计出土沉香特异性引物 AS-F，AS-R 和探针 AS-P。实时荧光定量 PCR 实验表明，该引物探针能特异性扩增土沉香，且检测灵敏度可以达到 0.01 ng·μL^{-1}，是一种快速、灵敏的鉴定方法。

关键词：土沉香；实时荧光 PCR；ITS；物种鉴定

中图分类号：Q949.761.1　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：1001-3776（2018）06-0029-04

Identification of *Aquilaria sinensis* by Single Nucleotide Polymorphism

ZHANG Ming-zhe[1]，YIN Wen-xiu[1]，CHEN Zhe[1]，WU Shan[1]，YU Hui-zhen[1]，ZHANG Xiao-feng[1]，XU Jin[2]，LI Ming-fu[2]，WU Rong[1]

（1. Zhejiang Academy of Science and Technology for Inspection and Quarantine, Hangzhou 310016, China; 2. Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100176, China）

Abstract: Leaves were collected and timbers of *Aquilaria sinensis*, *A. yunnanensis* and *A. malaccensis* were quarantined from March to July of 2017 from different provinces in China, and were amplified and sequenced. Screening of single nucleotide polymorphisms (SNP) by DNAMAN software, specific primers and probes were designed for. The real-time PCR test showed that the primer and probe could specifically amplify *A. sinensis*, and the sensitivity reached 0.01 ng·μL^{-1}.

Key words: *Aquilaria sinensis,* Real-time PCR; ITS; species identification

土沉香 *Aquilaria sinensis*，又称白木香，属瑞香科 Thymelaeaceae 沉香属 *Aquilaria* 植物，为我国特有的珍贵观赏药用植物[1]，也是我国生产药材沉香的唯一植物资源，于 1999 年被列为国家Ⅱ级重点保护野生植物[2]。2005 年 1 月 12 日，瑞香科白木香属的全部物种均被列入《濒危野生动植物种国际贸易公约》（CITES 公约）附录Ⅱ管制[3-4]。目前全球沉香属树种的野生资源主要分布在亚洲[4]。我国土沉香主要分布于广东、海南、广西、福建，喜生于低海拔的山地、丘陵以及路边阳处疏林中[5]。土沉香老茎受伤后所积得的树脂，俗称沉香，可作香料原料，并为治胃病特效药；树皮纤维柔韧，色白而细致可做高级纸原料及人造棉；木质部可提取芳香油，花可制浸膏[5]。沉香系传统中药、名贵香料，具有悠久利用史，其药用、精油、香料等方面市场需求量巨大[6]。近年来，其较高的社会和经济学价值，吸引了化学、生物学、病理学、材料科学等多学科研究人员的关注，且部分研究

收稿日期：2018-05-21；**修回日期**：2018-09-09
基金项目：国家重点研发计划课题（2017YFF0210304）；浙江省重点研发计划项目（2018C02041）；浙江省科技厅公益性项目（2017C32045）
作者简介：张明哲，博士，高级农艺师，从事物种鉴定和转基因检测研究；E-mail：mzzhang429@163.com。

成果已在中医药学等相关领域得到应用[4]。

我国的土沉香资源十分丰富，历史上就有“交干连枝，岗岭相接，千里不绝”的记载，而且国产沉香品质优良，有“冠绝天下”的美称[7]。但近年来土沉香生存环境遭到破坏，一方面自然繁殖率下降；另一方面为了产香、取香，人为地对土沉香树进行伤害，甚至砍倒，影响土沉香正常生长和繁殖，土沉香林面积急剧下降[7]。同时，随着中药现代化的快速发展和香客、收藏爱好者对沉香的热衷，沉香的需求日益增加，野生资源和传统的人工结香已经远远不能满足需求，市场上掺假造假的现象也日益凸显。为加强沉香属物种资源的保护和利用，规范市场秩序，本研究基于沉香属不同种间单核苷酸多态性位点的差异，设计特异性引物探针，建立了土沉香分子生物学鉴定方法，对口岸快速筛查和鉴定具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料

2017年3 – 7月，采集土沉香叶片13份（云南、海南、广东、广西），云南沉香 *A. yunnanensis* 叶片3份（云南）和马来沉香 *A. malaccensis* 木材1份（马来西亚），共17份。采集样本为任意部位的新鲜叶片，数量若干，部分放在密封袋中，以供试验，剩余样品置于 – 20℃冰箱保存。木材样本为检查截获的马来沉香样品。

1.2 方法

1.2.1 DNA样品的制备 DNA提取在无菌环境下进行，采用改良的DNeasy Plant Mini Kit（Qiagen，Hilden，Germany）[8]。DNA提取之前，先将Qiagen试剂盒中的Buffer AP1在65℃水浴锅中预热。叶片经无菌水冲洗并用已灭菌的滤纸擦干，木材用 75%的乙醇对表面进行彻底的消毒，再经无菌水冲洗并用已灭菌的滤纸擦干[9]，将植物叶片、木材研磨成粉末状，取0.1 g粉末至2 mL离心管，加入400 μL预热的Buffer AP1，4 μL RNase A，充分混合后65℃温浴10 min，然后加入130 μL的BufferP3，迅速混匀后在冰上冷却5 min。接下来的步骤，参照试剂盒说明书。

1.2.2 引物和探针 本研究筛选出沉香属通用引物（ITS2[10]），可有效扩增沉香属样本，扩增长度约为500 bp（表1）。引物、探针由TaKaRa宝生物工程（大连）有限公司合成。以通用引物扩增产物为目标序列，通过DNAMAN软件筛选出多态性位点，利用Primer Premier 5.0软件设计出土沉香特异性鉴定引物和探针（表2）。

表1 通用引物ITS2

Table 1 The universal primer of ITS2

引物	序列（5'-3'）
ITS2-S2F	ATGCGATACTTGGTGTGAAT
ITS2-BEL-3R	GACGCTTCTCCAGACTACAAT

表2 土沉香引物探针

Table 2 The primer and probe of *A. sinensis*

引物和探针	序列（5'-3'）
AS-F	GATGCGCGCTATGATTGAAC
AS-R	CGGTGTATGCCATGATGCA
AS-P	AGGGCATGATGCGCATGATGCT

注：探针5’端标记FAM报告荧光染料，3’端标记BHQ1淬灭荧光染料。

1.2.3 反应体系及条件 普通PCR反应体系：采用大连宝生物（TaKaRa Ex Taq）提供的试剂，10×Ex Taq Buffer 2.0 μL（Mg^{2+} plus），dNTPs 1.6 μL（各2.5 mM），引物各0.4 μL（20 μM），ddH_2O 13.5 μL，Taq酶0.1 μL（5 U·μL^{-1}），DNA模版2 μL（10 ~ 40 ng·μL^{-1}）。扩增程序：95℃预变性5 min；95℃变性1 min，53℃退火30 s，72℃延伸30 s，35个循环；72℃延伸10 min。使用PCR仪（S1000）扩增，扩增产物经纯化后，送至杭州擎科梓熙生物技术有限公司进行双向测序。实时荧光PCR反应体系：采用大连宝生物（TaKaRa Ex Taq）提供的试剂，实时荧光PCR预混液（2×）10 μL，正反向引物（20 μM）各0.4 μL，探针（10 μM）0. 8 μL，ROX（50×）0.4 μL，DNA模板2 μL，灭菌双蒸水6 μL。反应条件：（1）95℃，30 s；（2）95℃，15 s；（3）65.5℃，34 s。（1）~（3）循环40次。使用荧光定量PCR仪（ABI7500Fast）进行检测。

1.2.4 序列测定与数据分析 通用引物ITS2可有效扩增沉香属样本，扩增长度467 bp。以该引物扩增产物为目标序列，通过DNAMAN软件筛选多态性位点（图1）。一共有6个变异位点，经分析发现位于土沉香ITS

基因所示序列第 236 位上的碱基可区分土沉香和马来沉香、云南沉香。土沉香序列第 236 位上的碱基为 C，而云南沉香和马来沉香为 T，以此位点差异利用 Primer Premier 5.0 软件设计出土沉香特异性鉴定引物和探针（表 2）。因为土沉香 13 个样本的扩增结果相同，云南沉香 3 个样本的扩增结果也相同，故选取任意 3 条土沉香序列与 1 条云南沉香序列进行比对分析。

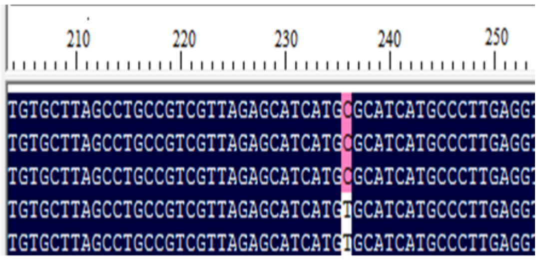


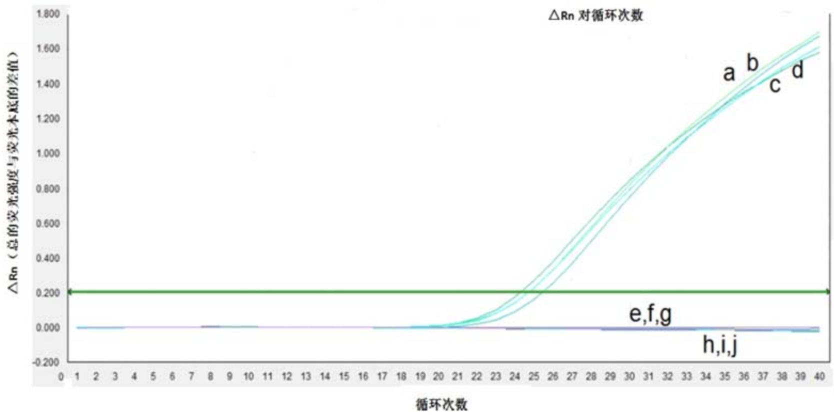
图 1　土沉香、云南沉香和马来沉香序列比对

Figure 1　Sequence comparison of *A. sinensis*, *A. yunnanensis* and *A. malaccensis*

2　结果与分析

2.1　引物探针对实时荧光 PCR 扩增的影响

本研究基于单核苷酸多态性位点，设计出土沉香特异性鉴定引物和探针，通过对反应体系和条件进行不断优化，最终确定了 1.2.3 中的实时荧光 PCR 反应体系。实时荧光 PCR 扩增结果表明，该引物探针能特异性扩增土沉香，对云南沉香、马来沉香样本和空白对照并没有扩增（图 2），故本研究中设计的引物探针可快速筛查出土沉香。同时，该特异性引物和探针具有良好的扩增效率，当模板浓度低至 0.01 ng·μL^{-1} 时，仍具有明显的扩增（图 3）。检测结果重复 3 次，均获得相同结果。



a,b,c,d – 土沉香 DNA 模板；

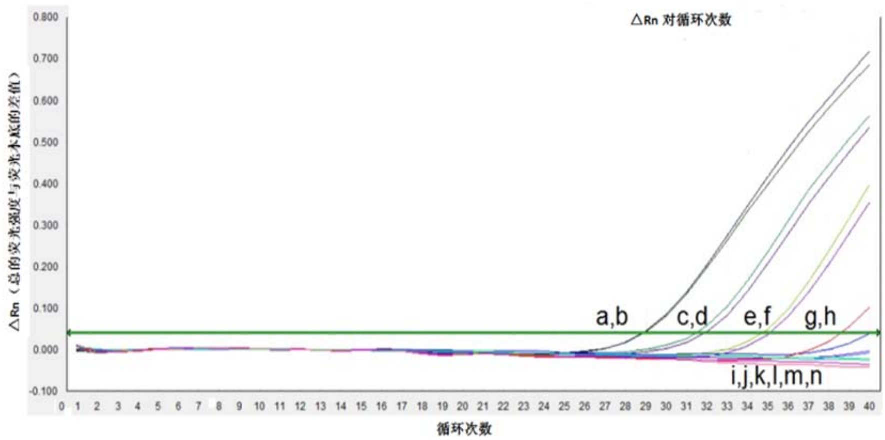
e,f – 云南沉香 DNA 模板；

g,h – 马来沉香 DNA 模板；

i,j – 空白对照。

图 2　土沉香实时荧光 PCR 特异性扩增结果

Figure 2　Real-time PCR specific amplification of *A. sinensis*



a,b – 10 ng·μL^{-1} DNA 模板；

c,d – 1 ng·μL^{-1} DNA 模板；

e,f – 0.1 ng·μL^{-1} DNA 模板；

g,h – 0.01 ng·μL^{-1} DNA 模板；

i,j – 0.001 ng·μL^{-1} DNA 模板；

k,l – 0.000 1 ng·μL^{-1}DNA 模板；

m,n – 1×10^{-5} ng·μL^{-1}DNA 模板。

图 3　土沉香不同浓度梯度实时荧光 PCR 扩增结果

Figure 3　Real-time PCR amplification of *A. sinensis* with different concentration of template

2.2 不同模板浓度梯度的荧光 PCR 扩增

以引物 AS-F 和 AS-R 以及荧光探针 AS-P 对 3 个沉香属树种进行实时荧光 PCR 扩增，结果见图 2。土沉香随机选取 2 个样本，其余沉香属样品选取 1 个样本，每个样本 2 个重复。出现扩增曲线的为土沉香样本，未出现扩增的为云南沉香、马来沉香和空白对照。以引物 AS-F 和 AS-R 以及荧光探针 AS-P 对土沉香进行不同浓度梯度的荧光 PCR 扩增，结果见图 3。扩增曲线自左至右表示土沉香 DNA 模板最大浓度为 10 ng·μL^{-1}，按 10 倍梯度稀释，共 7 个浓度梯度，最低为 1×10^{-5} ng·μL^{-1}，每一浓度 2 个重复。当模板浓度低至 0.01 ng·μL^{-1} 时，仍有扩增。检测结果重复 3 次，均获得相同结果。

3 结论与讨论

3.1 结论

本研究对土沉香、云南沉香和马来沉香的 ITS 序列进行 PCR 扩增和测序，经比较分析，筛选出了单核苷酸多态性位点，土沉香序列第 236 位上的碱基为 C，而云南沉香和马来沉香为 T，并设计出可鉴定土沉香的特异性引物 AS-F、AS-R 和探针 AS-P。实时荧光定量 PCR 实验表明，该引物探针能特异性扩增土沉香，且检测灵敏度可以达到 0.01 ng·μL^{-1}，是一种可快速、灵敏辨别土沉香与云南沉香和马来沉香的方法。

3.2 讨论

在物种鉴定过程中，虽然传统的形态学分类方法仍然占有主导地位，但是近年来，由于分子生物学技术的发展，越来越多的研究者利用分子生物学方法进行物种鉴定。这主要是 DNA 序列数据库的迅猛发展给物种鉴定提供了丰富的资源；另一方面，利用分子生物学方法进行物种鉴定不仅简单、快捷，而且准确性高，避免了形态学鉴定中存在的局限性。形态学鉴定主要依赖专业鉴定人员较高的鉴定技能和丰富的鉴定经验，但不能排除鉴定者对物种形态特征主观感受的差异。分子生物学作为一种精确地分析鉴定手段，有别于传统的形态学，能从遗传角度鉴别物种，具有鉴定过程快捷便利，适合大量样本的鉴定；稳定且重复性高；标准化实验过程，操作要求简单等独特优势[11]。由于沉香属植物的外表相似，特别是木材制品种与种之间难以区分，故利用分子生物学技术进行沉香物种的鉴定与分类势在必行。有实验表明，土沉香的新鲜材及其高温干燥样品可以通过 DNA 条形码准确识别[12]。还有实验运用 CTAB 法联合 DNA 试剂盒法，简单、快速获得高质量沉香总 DNA，透过正交试验快速获得 ITS2 目的片段，为沉香的分子鉴定和系统发育分析提供参考[13]。本研究在土沉香 DNA 条形码的基础上，筛选出单核苷酸多态性（SNP）位点并进一步设计了特异性的引物和探针，结果判定准确和快捷，避免了条形码在数据库比对中的不唯一性和条形码方法进行测序和比对等过程的低效性。通过反复实验并验证特异性引物探针，采用实时荧光定量 PCR 技术进行鉴定，有利于口岸快速筛查和准确鉴定，有效地保障了土沉香的流失，对物种资源保护具有重要意义。

参考文献：

[1] 贾文杰，李恩香，杨柏云，等. 白木香遗传多样性研究.热带亚热带植物学报[J]. 2010，18（2）：159 – 64.
[2] 国家林业部，国家农业部令（第 4 号）. 国家重点保护野生植物名录（第一批）[Z]. 1999.
[3] 中华人民共和国濒危物种进出口管理办公室. 濒危野生动植物种国际贸易公约附录Ⅰ、附录Ⅱ和附录Ⅲ[R/OL].（2008-10-18）[2015-09-10].http://www.forestry.gov.cn/main/4818/content-797732.html.
[4] 董梦妤，焦立超，姜笑梅，等. 沉香的资源分布、识别与贸易现状[J]. 木材工业，2016，30（4）：20 – 24.
[5] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志[M]. 北京：科学技术出版社，1999，52（1）：290.
[6] 张明哲，徐莉莉，陈曦，等. 应用分子生物学方法鉴定马来沉香[J]. 植物检疫，2015，29（3）：72 – 76.
[7] 王之胤. 白木香树木中脂类物质形成的激素诱导研究[D]. 南京：南京林业大学，2013：1 – 43.
[8] RACHMAYANTI Y，LEINEMANN L，GAILING O，*et al*. Extraction，amplification and characterization of wood DNA from *Dipterocarpaceae*[J]. Plant Mol Biol Rep，2006（24）：45 – 55.
[9] 余敏，张浩，周亮，等. 降香黄檀木材 DNA 提取方法的研究[J]. 安徽农业大学学报，2013，40（4）：603 – 607.
[10] 谷巍，许俊华、黎随燕，等. 芡实及其近源种药材 ITS2 条形码鉴定研究[J]. 世界科学技术-中医药现代化，2013.15（3）：404 – 409.
[11] 张浩. 基于 DNA 条形码技术的降香黄檀与多裂黄檀木材识别研究[D]. 合肥：安徽农业大学，2013：1 – 34.
[12] JIAO L，YIN Y，CHENG Y，*et al*. DNA barcoding for identification of the endangered species *Aquilaria sinensis*: comparison of data from heated or aged wood samples[J]. Holzforschung，2014，68（4）：487 – 494.
[13] 刘少烽，陈晓东，朱爽，等. 沉香 DNA 的提取及其 ITS2-PCR 体系的优化[J]. 中国实验方剂学杂志，2015，21（2）：7 – 11.