实验技术与方法

虫草胶囊菌粉的鉴定与分析

刘光全　陶水华　李　辉　程　池
(中国食品发酵工业研究院中国工业微生物菌种保藏管理中心,北京　100027)

摘　要:**目的**　探讨建立一种虫草胶囊菌粉真伪的检测方法。**方法**　以 95 %乙醇、乙酸乙酯和 Tris - HCl 对胶囊菌粉产品处理后再提取 DNA,排除虫草胶囊菌粉中杂质对 PCR 扩增的干扰,采用 PCR 扩增该菌粉 ITS1 - 5.8S - ITS2 区的序列。**结果**　鉴定分析了 3 个不同厂家虫草胶囊产品的发酵菌粉,系统发育学分析表明样品 1 胶囊生产菌为中国被毛孢(*Hirsutella sinensis*),属于国家卫生部允许的可用于保健食品的真菌菌株;样品 2 和样品 3 分别为西藏虫草(*Cordyceps gracilis*)和蛹虫草(*Cordyceps militaris*),均与产品名称"冬虫夏草"(*Cordyceps sinensis*)不符,且不属于国家卫生部允许的保健食品菌株。**结论**　该方法简单易行,可以有效的鉴定市售虫草相关产品的真伪,为该类产品的真伪鉴定开拓了新的思路。

关键词:冬虫夏草;中药鉴定;发酵;聚合酶链反应

Identification and Analysis of Cordyceps Products

LIU Guang-quan, TAO Shui-hua, LI Hui, CHENG Chi
(China National Research Institute of Food and Fermentation Industries Chinese Center of Industrial Culture Collection, Beijing 100027, China)

Abstract: **Objective**　To develop a method for true-false distinguish of *Cordyceps* capsule products. **Method**　Before extracting the genomic DNA, three samples were pretreated by 95 % alcohol, ethylacetate and Tris-HCl for removing impurities in the capsules, and then the ITS1-5.8S-ITS2 region sequence was amplified from the genomic DNA. **Results**　Three *Cordyceps* capsule products sold in the market were identified by phylogenetic analysis. The phylogenetic analysis results showed that sample 1 belonged to *Hirsutella sinensis*, which was permitted for *Cordyceps* capsule manufacture by the Ministry of Health, P. R. China. while "sample 2" and "sample 3" were *Cordyceps gracilis* and *Cordyceps militaris*. **Conclusion**　The method could be simple, credible. It is a new idea for true-false distinguish of *Cordyceps* capsule products.

Key words: *Cordyceps sinensis*; TCD Identification; Fermentation; Polymerase Chain Reaction

冬虫夏草(*Cordyceps sinensis* (Berk) Sacc.)是我国名贵的滋补中药和保健食品。由于受到生长条件的限制,天然冬虫夏草产量有限,且呈逐渐下降的趋势[1]。20 世纪 80 年代起,一些单位将其分离到的冬虫夏草无性型菌株进行深层发酵,并将发酵菌丝或发酵物制成不同产品,投放到医疗和保健品市场[2]。卫生部允许在保健食品生产中应用的虫草类真菌只有蝙蝠蛾拟青霉(*Paecilomgces hepialli*)和中国被毛孢[3,4](*H. sinensis*)两种,在利益驱动下,市场中常有伪品、混淆品和代用品出现。所以对虫草产品真伪的鉴别具有很高的应用价值。

rDNA 序列测定分析法已经广泛运用于真菌菌种的鉴定[4,5]。本实验以市售 3 个不同厂家胶囊菌粉为研究对象,对其菌粉处理后提取基因组 DNA 来扩增 ITS1 - 5.8S - ITS2 区特征序列,并对该产品基因序列与相关虫草属内种做了系统发育分析,阐述了这 3 种以"冬虫夏草"为名上市的产品与冬虫夏草无性型菌之间的关系。

基金项目:国家科技基础条件平台建设项目(2005DKA21204)
作者简介:刘光全　男　助理工程师
通讯作者:程　池　男　教授级高工

1　材料与方法

1.1　材料

胶囊产品样品 1、2、3 均购自北京某药店。

CTAB,购自 Sigma 公司;琼脂糖、Goldview、1xTAE 电泳缓冲液、10 ×PCR 缓冲液、dNTP、Taq DNA 聚合酶:购自天根生化试剂公司;EDTA、氯化钠、Tris 饱和酚、氯仿、异戊醇:国产分析纯。

1.2　方法

1.2.1　基因组 DNA 的提取　CTAB 法[6]加以改进。

(1) 将适量虫草胶囊菌粉加1 000 ml 95 %的乙醇溶于烧杯中浸泡 1h,纱布过滤,将所得滤液离心,丢弃上清,得到菌粉,重复该步骤 2 次。

(2) 将第一步得到的菌粉用乙酸乙酯浸泡 10～

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

15 min,离心后弃上清,所得沉淀用 Tris - HCl 浸泡 10～15 min,13 000 r/min离心 2 min 弃上清。

(3) 加500 ml 95 %的乙醇浸泡 10～15 min,13 000 r/min离心2 min弃上清。

(4) 加500 ml无菌水清洗 2 次,13 000 r/min离心 2 min弃上清。

(5) 所得菌粉加石英砂充分研磨,加入 2 × CTAB 和 10 % SDS 溶液,于65 ℃水浴1 h,离心吸取上清,再加入 2 ×CTAB 和 10 % SDS,重复第五步骤 1 次。

(6) 取出离心管,待其冷却后加入等体积的酚/氯仿:异戊醇,振荡混匀13 000 r/min离心10 min,重复抽提 3 次。

(7) 吸取上清加入 0.8 倍体积的异丙醇混匀,放置4 ℃30 min。

(8) 13 000 r/min离心 10 min。

(9) 将 DNA 沉淀用 70 %的乙醇清洗 3 次,干燥后加100 μl TE(pH 8.0)溶解,- 20 ℃保存 DNA。

1.2.2　引物　本实验采用下列引物进行 PCR 扩增,引物序列如下:

引物 ITS4(5′- TCC CCG CTT ATT GAT ATG C - 3′)

引物 ITS5(5′- GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G - 3′)[7]

1.2.3　TD - PCR 扩增[8]

TD - PCR 反应条件:95 ℃5 min;95 ℃1 min,55 ℃1 min,每个循环 - 0.5 ℃,72 ℃1 min,20 个循环;72 ℃ 5 min;94 ℃ 1 min,45 ℃ 1 min,72 ℃ 1 min,15 个循环;72 ℃5 min。4 ℃保存,结束。

反应体系为100.0 μl:Taq 酶(5 U/μl) 0.8 μl;10 ×PCR 缓冲液(Mg^{2+} Plus) 10 μl;dNTP 混合液(各 2.5 mmol/L) 8 μl;模板 DNA(基因组 DNA) 2.5 ng;引物 ITS4(10 μmol/L) 2 μl;引物 ITS5(10 μmol/L) 2 μl;超纯水补足到100 μl。

反应结束后,取4 μl扩增产物经 1.0 %琼脂电泳,用 Goldview 染色后紫外检测(同时设置不含模板 DNA 的阴性对照)。

1.2.4　PCR 产物测序　纯化后的 PCR 产物以 ITS4 和 ITS5 为测序引物进行测序,由上海基康生物技术有限公司完成。

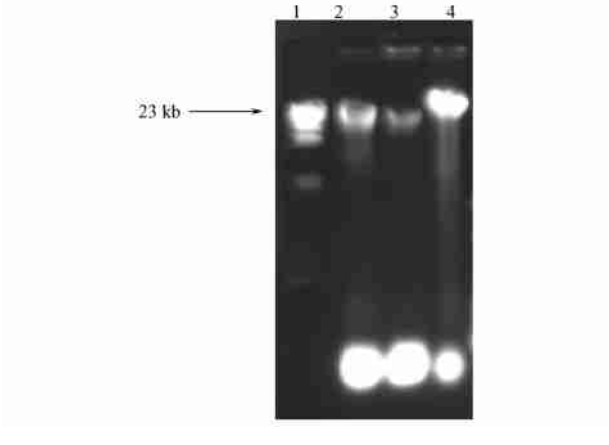
1.2.5　系统发育树的构建[9]　采用序列图谱软件 Chromas,参照正、反向序列图谱,对序列人工校对。从 GenBank 核酸序列数据库中下载虫草属相关菌株的 ITS1 - 5.8S - ITS2 序列,与所测目的序列放在一起,用 Clustal X 软件进行序列比对(alignment);然后利用 MEGA3.1 生物学软件的 Neighbor-Joining 连接法构建系统发育树,并进行1 000次 Bootstrap 检验。

2　结果与分析

2.1　基因组 DNA 提取和 PCR 扩增

为了使菌粉软化和有机杂质溶于液相,对胶囊菌粉先用 95 %乙醇浸泡1 h,然后用乙酸乙酯和 Tris - HCl 对有机质干扰成分进行萃取,再用 CTAB 法进行 DNA 提取,可以得到白色絮状 DNA。经琼脂糖凝胶电泳分析和紫外检测,提取的 DNA 大小约为 23 kb左右(见图 1)。PCR 扩增片段条带特意性强,大小约为550 bp,阴性对照无任何条带(图 2)。

2.2　序列测定与系统发育树的构建



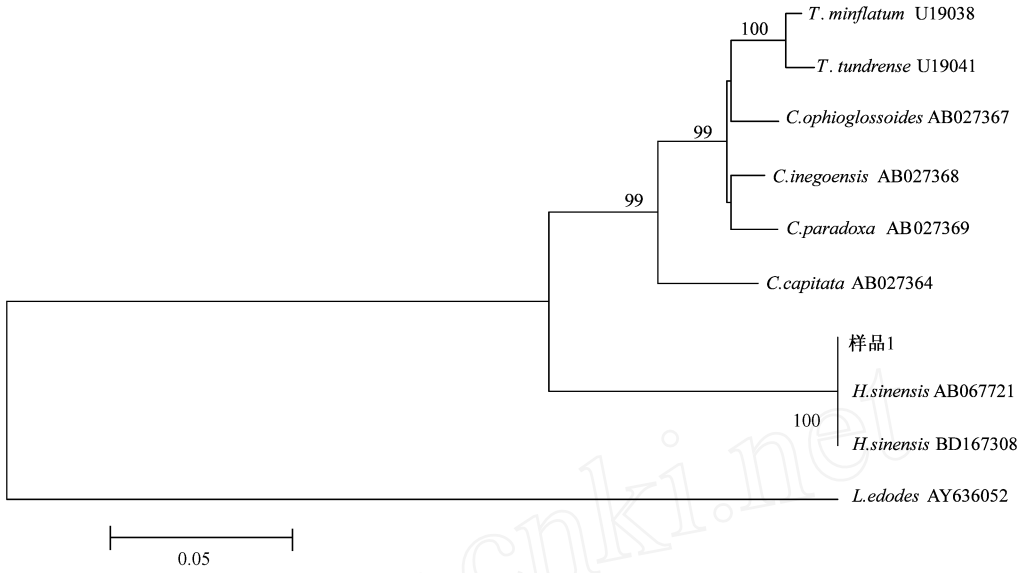
注:图 1 中 1 为 Hand Ⅲ入DNA,2、3、4 分别为样品 1、2、3,图 2 中 1 为 100 bp Marker,2、3、4、5 分别为样品 1、2、3 和超纯水

图 1　胶囊菌粉总 DNA 电泳用图片　　图 2　胶囊菌粉 PCR 扩增 ITS1 - 5.8S - ITS2 区图片

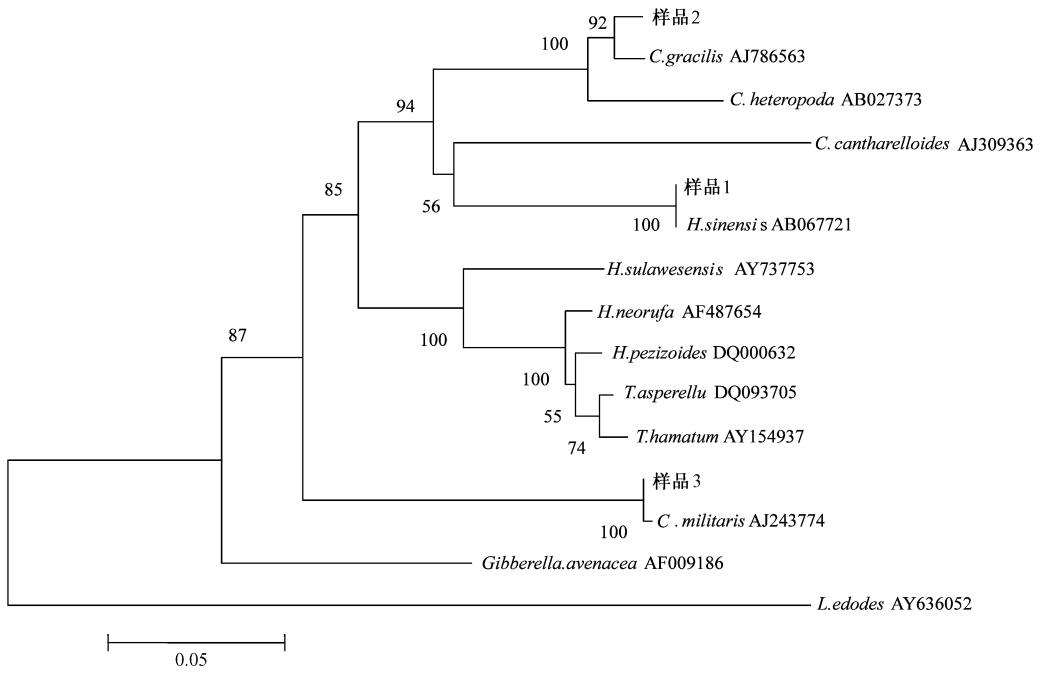
以 ITS4 和 ITS5 为引物对 PCR 产物进行测序,得到 552 bp。将 3 个序列分别与 GenBank 库中相关菌株序列进行同源性比较分析,发现"样品 1"与 *H. sinensis*(AB 067721 和 AB 167308)同源性高达

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

99.6 %,而与虫草属其他菌株的同源性在 90 %以下(图 3)。样品 2 与西藏虫草(*C. gracilis*)同源性 97.5 %,样品 3 与蛹虫草(*C. militaris*)同源性 99.8 %,样品 2 和样品 3 与 *H. sinensis* 相似性小于 80.0 %。以香菇菌(*Lentinus edodes*)为外群构建的 ITS1 - 5.8S - ITS2 区序列的系统发育树直观的显示了 3 个虫草菌粉序列与虫草属内各个种之间的系统发育关系(图 3、图 4),表明样品 1 胶囊生产菌株为中国被毛孢(*H. sinensis*);而样品 2 和样品 3 鉴定结果分别为西藏虫草和蛹虫草,其不在中华人民共和国卫生部(卫法监发[2001]84 号文)批准列入“可用于保健食品的真菌菌种名单”之列。



注:标尺参数表示进化距离,分枝上的数据表示 Bootstrap 检验的支持百分率;
图中 *T. C. H. L.* 分别表示: *Tolypocladium*; *Cordyceps*; *Hirsutella*; *Lentinula*。
图 3 依据 ITS1 - 5.8S - ITS2 区序列构建样品 1 胶囊生产菌与相关种属的系统发育树



注:标尺参数表示进化距离,分枝上的数据表示 Bootstrap 检验的支持百分率;
图中 *T. C. H. L.* 分别表示: *Tolypocladium*; *Cordyceps*; *Hirsutella*; *Lentinula*。
图 4 依据 ITS1 - 5.8S - ITS2 区序列构建样品 2 和样品 3 胶囊生产菌与相关种属的系统发育树

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

3　讨论

蝙蝠蛾被毛孢(*H. hepiali*)与中国被毛孢(*H. sinensis*)为同物异名,且为冬虫夏草无性型菌株[10-13];该菌是目前国内唯一得到学术界公认且可通过"生物还原法"验证的冬虫夏草有效菌[14-16]。同时经中华人民共和国卫生部(卫法监发[2001]84号文)批准列入"可用于保健食品的真菌菌种名单"。

虫草胶囊以发酵菌粉为主要原料,加入黄精、明胶、甘油、增塑剂、防腐剂、遮光剂、色素和其他适宜的中药材精制而成。这些成分对基因组DNA的提取及PCR扩增有很大影响。采用常规的CTAB法对胶囊菌粉进行DNA提取,所得DNA样品呈现深黄色油状,不利于下一步的PCR扩增。为了排除其他成分的干扰,本实验对CTAB法加以改进,先对胶囊菌粉用95%乙醇浸泡,再用乙酸乙酯和Tris-HCl对其进行萃取,最后用CTAB法提取DNA,所得DNA可以有效的进行PCR扩增。

本实验对市售的胶囊菌粉进行了系统发育学分析。结果表明,样品1胶囊生产菌与中国被毛孢(*H. sinensis*)位于同一分支,同源性为99.6%,证明了该产品的生产菌株为真正的冬虫夏草无性型菌株;而样品2和样品3分别为西藏虫草(*C. gracilis*)和蛹虫草(*C. militaris*),均与产品名称"冬虫夏草"(*C. sinensis*)不符。本研究所用方法简单易行,可以有效的鉴定市售虫草相关产品的真伪,为该类产品的真伪鉴定开拓了新的思路。

参考文献

[1] 蒋毅,姚一建.冬虫夏草无性型研究概况[J].菌物系统,2003,22(1):161-176.

[2] 徐锦堂.中国药用真菌学[M].北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版社,1997:357.

[3] 李增智,黄勃,李春如,等.确证冬虫夏草无性型的分子生物学证据 Ⅰ.中国被毛孢与冬虫夏草之间的关系[J].菌物系统,2000,19(1):60-64.

[4] 赵锦,王宁,陈月琴,等.冬虫夏草无性型的分子鉴别[J].中山大学学报(自然科学版),1999,38(1):121-123.

[5] 章卫民,李泰辉,陈月琴,等.西藏冬虫夏草无性型的分子生物学研究[J].微生物学通报,2002,29(3):54-57.

[6] 易润华,朱西儒,周而勋.简化CTAB法快速微量提取丝状真菌DNA[J].湛江海洋大学学报,2003,23(6):72-73.

[7] MICHAEL A I, DAVID H G, JOHN J S, et al. PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications[M]. New York: Academic Press, 1990: 1-482.

[8] 迪芬巴赫W,德维克斯勒GS.PCR技术试验指南[M].北京:科学出版社,2003:34-36.

[9] 蒋彦,王小行,曹毅,等.基础生物信息学及应用[M].北京:清华大学出版社,2003:64-74.

[10] 刘作易.虫草属及其无性型关系研究[D].武汉:华中农业大学.1999:1-180.

[11] LIU Z Y, YAO Y J, LIANG Z Q, et al. Molecular evidence for the anamorph-teleomorph connection in *Cordyceps sinensis* [J]. Mycological Research, 2001, 105: 827-832.

[12] LIU Z Y, YAO Y J, LIANG Z Q, et al. Molecular evidence for the anamorph-teleomorph connection in *Cordyceps sinensis* [J]. Mycological Research, 2001, 105: 827-832.

[13] JIANG Y, YAO Y J. Names related to *Cordyceps sinensis* anamorph [J]. Mycotaxon, 2002, 84: 245-253.

[14] 莫明和,迟胜起,张克勤.冬虫夏草的微循环产孢及其无性型的分离[J].菌物系统,2001,20:482-485.

[15] 尹定华,李黎,黄天福,等.贡嘎蝙蝠蛾各虫态生态学的研究[J].特产研究,1994,(4):5-7.

[16] 李泉森,曾纬,尹定华,等.冬虫夏草菌世代交替的初步研究[J].中国中药杂志,1998,23:210-212.

[收稿日期:2009-03-08]

中图分类号:R15;R282.710.3　　文献标识码:B　　文章编号:1004-8456(2009)05-0418-04

L-阿拉伯糖的作用

L-阿拉伯糖属于五碳糖,无热量。近年来国际、国内的生理学家和营养学家就L-阿拉伯糖在肠道内对糖类代谢的作用做了一系列深入研究,发现L-阿拉伯糖对传统糖类的吸收有竞争抑制作用,对传统糖类的代谢转化具有显著阻断作用,使得它在减肥、控制糖尿病等方面的应用前景看好。据研究,只要在普通蔗糖中添加2%的L-阿拉伯糖,就可以抑制40%蔗糖的吸收,同时也抑制了血糖的升高。

L-阿拉伯糖最显著的作用是抑制人体小肠内蔗糖酶的活性,从而调节人体对蔗糖的过量吸收,从根本上起到控制血糖、降低血脂和减少脂肪堆积的功效。

日本厚生省的特定保健用食品清单中将L-阿拉伯糖列入调节血糖的特定保健食品,美国医疗协会也将L-阿拉伯糖列入抗肥胖剂的营养补充剂或非处方药。L-阿拉伯糖作为一种无热量的甜味剂,已被美国食品药品监督局(FDA)和日本厚生省批准列入食品添加剂。2008年5月,中华人民共和国卫生部批准L-阿拉伯糖为新资源食品。

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net