



## Views &amp; Comments

## 结合基于滤纸的 DNA 提取技术和 RPA-LFD 检测技术对有毒植物钩吻进行快速鉴别

郑夏生<sup>a,b,#</sup>, 安文丽<sup>a,#</sup>, 姚晖<sup>c</sup>, 徐江<sup>b</sup>, 陈士林<sup>b</sup><sup>a</sup> National Engineering Research Center for Modernization of Traditional Chinese Medicine, Mathematical Engineering Academy of Chinese Medicine, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China<sup>b</sup> Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China<sup>c</sup> Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100193, China

许多植物和动物可供食用和药用,但有些是有毒性的。由于形态上的相似,一些有毒物种常被误认为无毒物种。因无意摄入有毒植物或动物而导致中毒甚至死亡的意外事件时有发生,尤其在野外。在这种情况下,快速而准确地鉴定有毒物种对于为中毒者提供最佳且紧急的治疗是至关重要的,可以挽救生命或至少可以将健康损害降到最低。遗憾的是,目前大多数物种鉴定方法,包括DNA条形码、环介导等温扩增技术(LAMP)和色谱技术等,都依赖于专业的设备和专门的实验室,无法在现场实时应用。因此,开发一种快速、准确、无需任何设备的有毒物种鉴定方法是非常有必要的。

重组聚合酶扩增(RPA)是Pipenburg等[1]开发的一种独特的等温DNA扩增技术。该方法可在35~40℃的恒温条件下(接近人体体表温度),在相对较短的时间内(15~25 min)快速扩增目标基因片段,不论是否借助热循环仪。由此产生的RPA反应产物可以通过多种方式进行可视化,如琼脂糖凝胶电泳、基于探针的荧光监测和侧向流检测试纸(LFD)。其中,LFD是一种便携式的免仪器诊断性分析装置,其结果可通过直接观察试纸条上的显色反应来判读。将RPA-LFD组合用于现场快速核酸检测的前提是要先实现无需任何设备即可进行DNA提取。2017年,Zou等[2]报道了一种基于滤纸

快速捕获核酸的可靠方案,该方案无需使用仪器设备。在本研究中,我们利用这种快速简单的DNA提取方法,并将其与RPA-LFD相结合,建立了一种快速鉴定剧毒植物钩吻(*Gelsemium elegans*)的方法。

钩吻也称为断肠草,是一种剧毒的开花植物,广泛分布在我国南方和东南亚。钩吻含有多种吲哚类生物碱,包括蛇根精类、钩吻子素类、胡蔓藤乙素类、钩吻素甲类和甲基钩吻乙素类生物碱[3]。这些生物碱不仅具有较强的药理作用,还具有剧烈的毒性。口服钩吻或其水提物会导致消化系统、循环系统和呼吸系统的严重中毒反应,甚至会导致心脏或呼吸衰竭而死亡。不幸的是,钩吻很容易被误认为常见的药用植物金银花(*Lonicera japonica*)。因为这两种植物在野外有时会缠绕在一起,并且具有非常相似的芽形。因此,这种混淆会导致意外中毒甚至死亡。

为建立一种快速、可行的野外鉴别钩吻的方法,我们采集了钩吻和金银花,通过聚合酶链反应(PCR)扩增和Sanger测序获得其*psbA-trnH*序列。基于这些序列,我们设计了针对钩吻的特异性引物和探针,用于RPA-LFD检测(见附录A中的表S1)。经过一系列的方法学研究,我们提出了一种针对钩吻的现场快速鉴定方案。该方案如图1(a)所示,并在附录A的第1节中简要描述。

<sup>#</sup> These authors contributed equally.

首先，将测试样品的新鲜叶片切成小块，按Zou等[2]所述方法，使用滤纸进行快速DNA提取。接着，将携带样本DNA的滤纸条浸入含有RPA反应液、物种特异性引物和探针的反应管中，然后加入乙酸镁。接着将反应管置于人的手掌中孵育至少20 min。最后将LFD试纸条

的底端浸入少量稀释的RPA反应产物中，再放入含有运行缓冲液（running buffer）的PCR管中并静置。1~2 min后，在LFD试纸条上可观察到一条或两条色带。对于钩吻样品，LFD试纸条上应该出现两个条带，而对于非钩吻样品，LFD试纸条上仅观察到对照条带[图1（b）]。

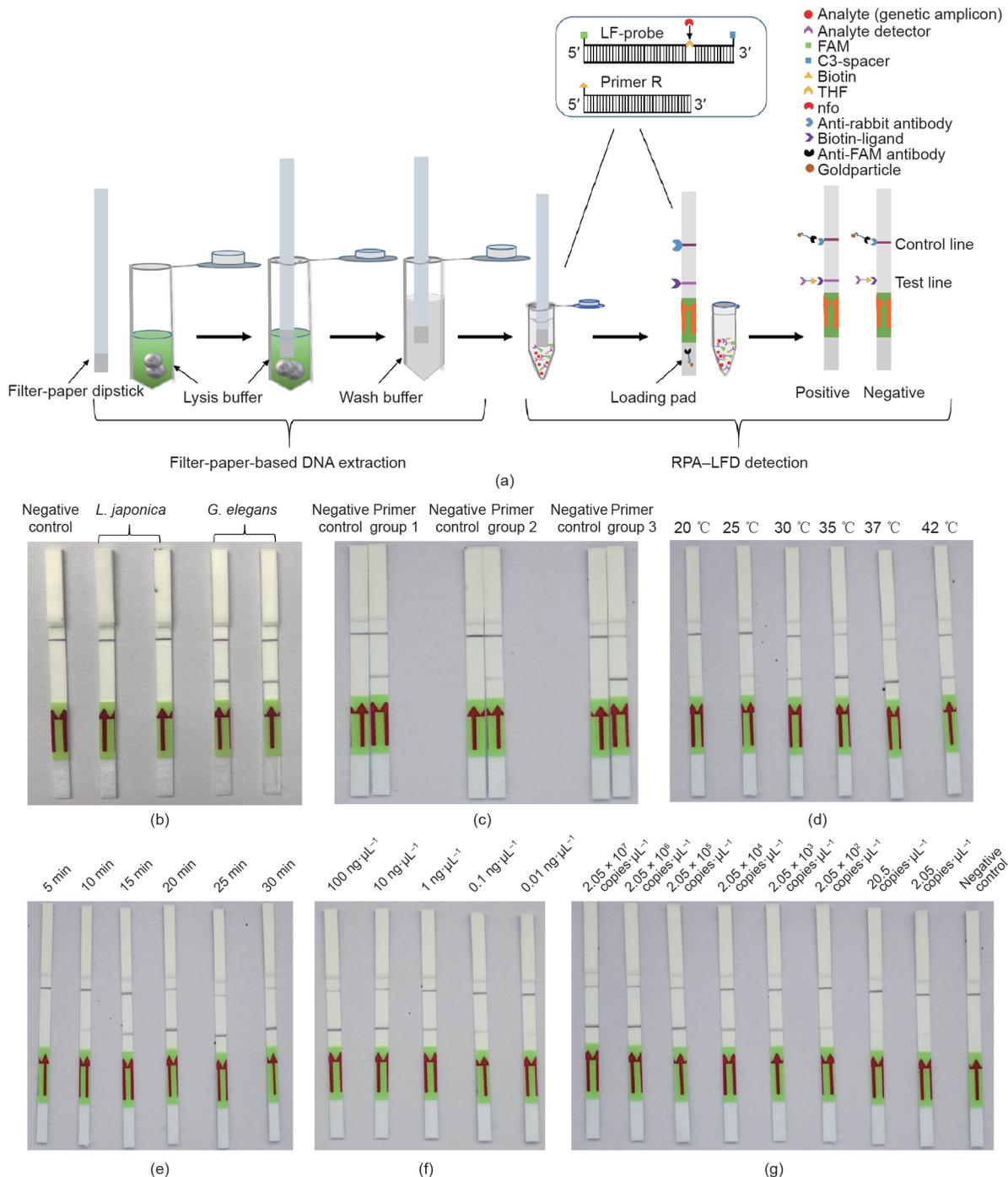


图1. 快速鉴定的方案流程及其方法学考察结果。(a) 现场快速鉴定方案流程；(b) 利用该方案对钩吻和金银花进行物种鉴定；(c) 三组引物和探针的特异性及扩增效率考察，LFD试纸条顶部的数字表示组号；(d) RPA孵育温度考察；(e) 用手孵育时间考察；(f) 基于梯度稀释钩吻gDNA的灵敏度考察；(g) 基于梯度稀释钩吻pEasy-psbA-trnH质粒的灵敏度考察。LF：侧流；FAM：荧光素；THF：四氢吡喃。

在方法学考察中，我们进行了几项相关的考察（详见附录A中的第2节），包括引物和探针的特异性、扩增效率[图1（c）]、RPA反应温度[图1（d）]、反应时间[图1（e）]和反应灵敏度的测试。反应温度试验表明，适合RPA反应的合理温度范围为30 ~ 42 °C，且在37 °C时观察到最优结果，这个温度非常接近人体表面的温度。在反应灵敏度试验中，最低检出限分别为0.01 ng·g<sup>-1</sup> DNA [图1（f）]和20.5拷贝*psbA-trnH*片段[图1（g）]。

综上所述，我们将基于滤纸的DNA提取和RPA-LFD检测相结合，提供了一种快速鉴别剧毒植物钩吻和药用植物金银花的方法。该方案至少需要0.01 ng·g<sup>-1</sup> DNA或20.5拷贝*psbA-trnH*片段，可在30 min内产生可靠的结果。更重要的是，该方案易于执行且不需要专业设备，因此适用于钩吻的现场快速鉴定。基于本方案可以开发出商用试剂盒。另外，本研究为其他物种（包括

植物和动物，无论是否有毒）的快速现场鉴定提供了新的思路。

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.eng.2020.02.012>.

## References

- [1] Piepenburg O, Williams CH, Stemple DL, Armes NA. DNA detection using recombination proteins. *PLoS Biol* 2006;4(7):e204.
- [2] Zou Y, Mason MG, Wang Y, Wee E, Turni C, Blackall PJ, et al. Nucleic acid purification from plants, animals and microbes in under 30 seconds. *PLoS Biol* 2017;15(11):e2003916.
- [3] Liu YC, Lin L, Cheng P, Sun ZL, Wu Y, Liu ZY. Fingerprint analysis of *Gelsemium elegans* by HPLC followed by the targeted identification of chemical constituents using HPLC coupled with quadrupole-time-of-flight mass spectrometry. *Fitoterapia* 2017;121:94–105.