

两种北方药材的 RAPD 分析

张爱华, 雷锋杰, 陈长宝, 张连学*

(1. 吉林农业大学中药材学院, 吉林长春130118; 2. 吉林省现代中药及生物制药基地建设办公室, 吉林长春130041)

摘要 [目的] 为中药材的分子水平鉴定提供依据。[方法] 从汉城细辛、北细辛、蒙古黄芪和荚膜黄芪中提取基因组 DNA, 使用 200 个随机引物进行 RAPD 扩增, 并通过聚类分析研究药材间的亲缘关系。[结果] 129 条引物有扩增产物, 占总引物数的 64.5%, 其扩增片段大小为 250 ~ 2 000 bp。筛选出 19 条扩增出清晰条带、重复性好的引物。聚类分析结果表明种内相似性大于种间相似性, 汉城细辛和北细辛有较近的亲缘关系, 蒙古黄芪和荚膜黄芪有较近的亲缘关系。[结论] 该研究在 DNA 水平上证明了汉城细辛和北细辛与蒙古黄芪和荚膜黄芪是不同品种的药材, 而细辛和黄芪存在种间差异。

关键词 分子生物学鉴定; RAPD; 聚类分析

中图分类号 S567 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)07-02672-02

RAPD Analysis on 2 Species of Northern Medicinal Materials

ZHANG Ai-hua et al (College of Traditional Chinese Medicinal Materials, Jilin Agricultural University, Changchun, Jilin 130118)

Abstract [Objective] The aim of the research was to provide the basis for the identification of Chinese medicinal materials at molecular level. [Method] Genomic DNA was extracted from *A. sieboldii* Mq. var. *seoulense* Nakai, *Asarum heterotropoides* Fr. Schmidt var. *mandshuricum* (Maxim.) Kitag., *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao and *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. 200 random primers were used to make RAPD amplification and the genetic relationships between the medicinal materials were analyzed through clustering analysis. [Result] 129 primers had amplified products, occupying 64.5% of total primer number and their sizes of amplified fragments were 250 ~ 2 000 bp. 19 primers that amplified clear bands and had good repeatability were screened out. The results of clustering analysis showed that the intraspecific comparability was greater than the interspecific comparability. *A. sieboldii* and *A. heterotropoides* had closer genetic relationship, while *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao and *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. had closer genetic relationship. [Conclusion] This research proved that *A. sieboldii* and *A. heterotropoides*, *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao and *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. were different species of medicinal materials and there was the interspecific difference between *asarum* and *Hangqi*.

Key words Molecular biological identification; RAPD; Clustering analysis

由于历史原因, 同种中药材可能来源于几个种^[1]。随着科学的发展, 已发现许多药材间药效成分含量存在明显差异^[2]。目前, 药材种间鉴别方法主要有性状鉴别、显微鉴别和理化鉴别。20 世纪 90 年代在 PCR 基础上发展起来的随机扩增产物的 DNA 多态性分析 (Random Amplified Polymorphic DNA, 简称 RAPD) 已经较为广泛地应用于遗传多样性的检测、基因定位和育种等研究领域^[3]。RAPD 分析是基于生物种间存在明显的差异, 在生物材料十分相像的情况下通过 DNA 分析加以区别。笔者利用 RAPD 技术对细辛与黄芪药材进行了种间分子水平鉴别, 为中药材的分子水平鉴别提供依据。

1 材料与方 法

1.1 材料 汉城细辛 (*Asarum sieboldii* Mq. var. *seoulense* Nakai)、北细辛 [*Asarum heterotropoides* Fr. Schmidt var. *mandshuricum* (Maxim.) Kitag.]、蒙古黄芪 [*Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao]、荚膜黄芪 [*Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge.] , 均取自吉林农业大学和龙县中药材规范化栽培基地。RAPD 随机引物购自美国 Operon 公司; Taq 酶、dNTP、PCR buffer (含 Mg^{2+})、基因组 DNA 提取试剂盒购自北京鼎国生物技术发展中心; 琼脂糖为 Promega 公司产品。

1.2 基因组 DNA 的提取 采用 DNA 提取试剂盒 (北京鼎国生物技术发展中心产品), 按说明书提取样品基因组 DNA。用 0.7% 琼脂糖凝胶电泳检测提取的基因组 DNA。紫外灯下观察电泳结果, 并拍照。

1.3 PCR 反应 25 μ l 的 PCR 反应体系包括: 10 \times PCR buffer

(含 Mg^{2+}) 2.5 μ l; 10 mmol/L 4 \times dNTP 0.25 μ l, 8 pmol/ μ l 引物 1 μ l, 5 U μ l Taq 酶 0.25 μ l, 10 ng/ μ l 模板 DNA 2 μ l 和灭菌双蒸水 19 μ l。PCR 反应程序为: 94 $^{\circ}$ C 加热 4 min, 使模板 DNA 变性; 然后进入下列温度循环, 即 94 $^{\circ}$ C 变性 50 s, 37 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 进行 40 个循环; 循环结束后, 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物于 1.5% 琼脂糖凝胶 (含 0.5 μ g/ml EB) 电泳。

1.4 数据分析 电泳扩增图谱的每个条带 (DNA 片段) 均为 1 个分子标记, 并且代表在模板上有 1 个引物结合位点。根据分子标记在相同的电泳迁移率下 (相同分子量片段) 的有无统计所有位点的二元数据: 有 DNA 扩增带 (显性) 为 1, 无带记 0, 强带和可分辨的弱带均赋值为 1^[4]。应用 MVSP 软件进行聚类分析, 采用 UPGMA 法做聚类图。

2 结果与分析

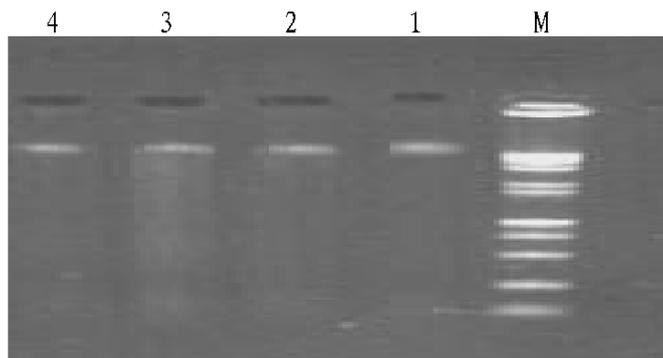
2.1 样品基因组 DNA 提取结果 所提取的基因组 DNA 分子量在 50 kb 以上, 且有较好的一致性。 $A_{260/280}$ 为 1.89 ~ 1.91, 表明蛋白等杂质去除比较干净, 可用于以后的试验; 根据测定结果, 将各模板基因组 DNA 浓度配制成 10 ng/ μ l, 备用。电泳图见图 1。

2.2 RAPD 反应的稳定性 RAPD 标记是目前应用较广的一种分子标记, 但所用引物的 T_m 值较低, 从而影响试验的稳定性。优化反应条件, 确定最佳反应条件, 是 RAPD 分析准确、可靠的关键。通过对模板浓度、引物、dNTP、buffer、酶量等条件的一系列预试验, 确定 PCR 反应的最佳组合条件。其中, 引物的选择对试验的重复性非常重要。笔者选择扩增产物条带清晰且稳定、背景干净且重复性好的引物对未知样品的 DNA 进行扩增。部分有效引物序列号见表 1。

2.3 多态性分析 用 200 条随机引物对样品进行 RAPD 分析。经过统计, 共有 129 条引物有扩增产物, 片段大小为 250

作者简介 张爱华 (1978 -), 女, 山东泰安人, 讲师, 从事药用植物学方面的研究。* 通讯作者。

收稿日期 2008-02-18



注:1. 汉城细辛,2. 北细辛,3. 蒙古黄芪,4. 荚膜黄芪;M 为 DNA Hnd 标准分子量。下同。

Note: 1. *Asarum sieboldii* Miq. var. *seoulense* Nakai; 2. *Asarum heterotropoides* Fr. Schmidt var. *mandshuricum* (Maxim.) Ktag.; 3. *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *nongholicus* (Bge.) Hiao; 4. *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. M stands for DNA Hnd Standard marker. The same as below.

图1 样品基因组DNA 电泳图谱

Fig. 1 Retrophoretogram of genomic DNA from samples

表1 RAPD 多态性有效引物

Table 1 Effective primers with RAPD polymorphism

引物名称 Primer name	碱基序列 Base sequence(5'-3')	引物名称 Primer name	碱基序列 Base sequence(5'-3')
OPG ₅	CTGAGACGGA	OPH ₅	AGTCGICCCC
OPG ₁₀	AGGGCCGICT	OPY ₁₂	ACAGGIGCGT
OPK ₄	CCGCCCAAAC	OPJ ₁₈	TGGTCGCAGA
OPK ₁₄	CCCGCTACAC		

~2 000 bp, 占总引物数的64.5%, 从中筛选出19 条扩增条带清晰、重复性好的引物, 分别对2 组样品 DNA 进行扩增。图2、图3 分别为引物 OPK₁₄ 和 OPJ₁₈ 的电泳图谱。

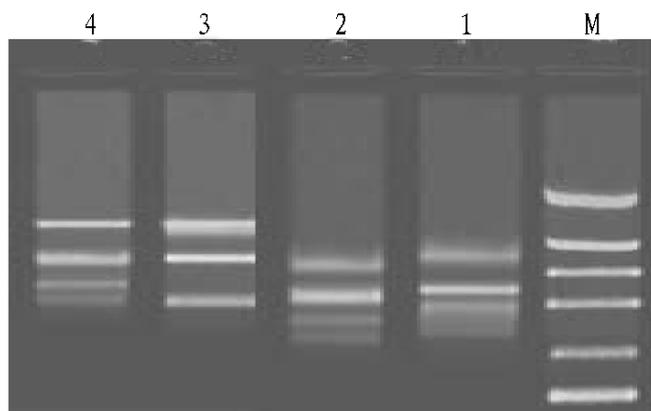


图2 引物 OPK₁₄ 扩增产物电泳图谱

Fig. 2 Retrophoretogram of amplification products for primer OPK₁₄

2.4 亲缘关系分析 根据扩增结果, 应用 M/SP 软件进行聚类分析, 生成亲缘关系树状图。由图4 可知, 进一步确定汉城细辛和北细辛有较近的亲缘关系, 蒙古黄芪和荚膜黄芪有较近的亲缘关系。

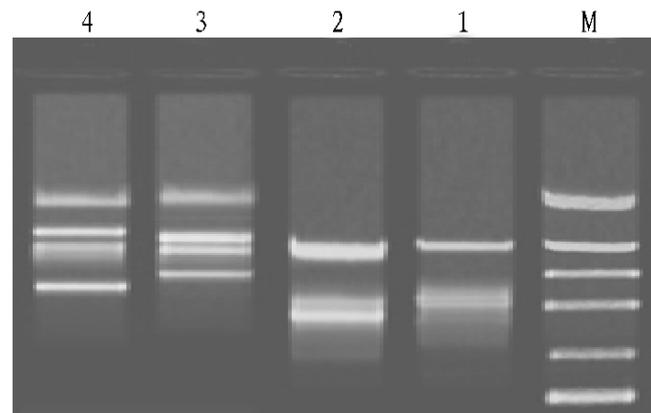


图3 引物 OPJ₁₈ 扩增产物电泳图谱

Fig. 3 Retrophoretogram of amplification products for primer OPJ₁₈

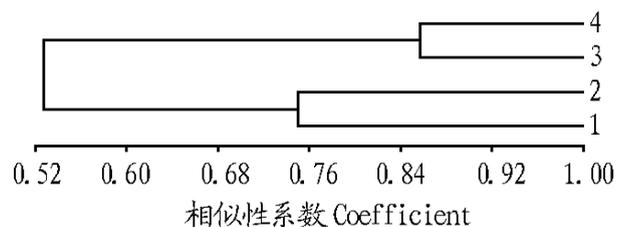


图4 样品的亲缘关系聚类分析

Fig. 4 Clustering analysis on genetic relationship among samples

3 结论

利用 RAPD 技术对细辛、黄芪药材进行种间 DNA 指纹图谱分析, 从扩增产物的电泳图谱上可以明显看出汉城细辛与北细辛、蒙古黄芪与荚膜黄芪之间的区别, 并将带谱转化为数据, 然后从相似性或遗传距离上分析亲缘关系, 从而在 DNA 水平上证明汉城细辛、北细辛和蒙古黄芪、荚膜黄芪是不同的物种, 而且药材细辛、黄芪的种间存在差异, 从而为同种来源的中药材种间分子水平鉴定提供一定的依据。

参考文献

[1] 国家药典委员会编制. 中华人民共和国药典 M. 北京: 化学工业出版社, 2000.
 [2] 黄泰康. 常用中药成分与药理手册 M. 北京: 中国医药科技出版社, 1994.
 [3] 舒艳群, 白守梅, 陈毓亨. RAPD 技术在药用植物学研究中的应用[J]. 中草药, 1999, 30(2): 147-151.
 [4] YANG X, QUIROS C. Identification and classification of celery cultivars with RAPD markers[J]. Theor Appl Genet, 1993, 86: 205-212.