

## 中药材分子鉴别新方法:锚定引物扩增多态性 DNA 的研究

崔光红, 黄璐琦\*, 李欣, 唐晓晶, 何希荣, 王敏

(中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700)

**摘要:** 为了寻找稳定性好、可操作性强的分子鉴定新方法,在充分吸取 RAPD 优势的基础上,对其引物和退火温度进行了改进。本文以人参、西洋参为例进行了方法的探索和各种验证,并推广应用到天花粉以及白芷类药材的鉴别。结果显示引物 Pg-q36F 得到人参、西洋参及其 9 种伪品的多态性条带。对于人参、西洋参的鉴别结果与文献鉴别方法结果一致,并且具有更高的稳定性。引物 TkSI-64F 得到了天花粉及其 11 种伪品的多态性条带,引物 AfSI-100F 得到白芷及其 3 种伪品的多态性条带,均能准确鉴别各种药材。实验结果证明本方法具有简单易行、稳定性和重复性好、提供的信息量大等优点,是一种极具前途的中药材分子鉴定新方法,被命名为锚定引物扩增多态性 DNA (anchored primer amplification polymorphism DNA, APAPD)。

**关键词:** 锚定引物扩增多态性 DNA; 分子鉴别; 人参; 西洋参; 天花粉; 白芷

中图分类号: R931.5 文献标识码: A 文章编号: 0513 - 4870(2007)03 - 0329 - 07

### A new molecular identification method: anchored primer amplification polymorphism DNA

CUI Guang-hong, HUANG Lu-qí\*, LI Xin, TANG Xiao-jing, HE Xi-rong, WANG Min

(Institute of Chinese Materia Medica, Academy of Traditional Chinese Medicine Sciences, Beijing 100700, China)

**Abstract:** To build up a stable and easy doing method for molecular identification in traditional Chinese medicine, on basis of RAPD, the new method mainly changed the primer length and PCR annealing temperature. *Panax ginseng*, *Panax quinquefolius* and its nine adulterants were used to establish the method and test it using MARMS primers published in 2004. The new method also used to authenticate Chinese Materia Medica of Tian-hua-fen (Radix Trichosanthes) and Bai-zhi (Radix Angelica). Primer Pg-q36F obtained polymorphic bands of *P. Ginseng*, *P. quinquefolius* and its adulterants. The identification result is identical to that published before and more stable. Primer TkSI-64F obtained polymorphic bands of Tian-hua-fen and its nine adulterants. Primer AfSI-100F obtained polymorphic bands of Bai-zhi and its three adulterants. The method has good stability and reproducibility and can easily identify authentic medicines from their adulterants. It was a potential molecular method to identify other Chinese Materia Medica. The method was named as anchored primer amplification polymorphism DNA (APAPD).

**Key words:** APAPD; molecular identification; *Panax ginseng*; *Panax quinquefolius*; Tian-hua-fen; Bai-zhi

自从 PCR 技术诞生以来,人参 *Panax ginseng*、西洋参 *Panax quinquefolius* 的分子标识研究就受到特别的关注,1994 年,AP-PCR 首次用于人参、西洋参的鉴别<sup>[1]</sup>,现已有 24 篇相关的报道,包括 RAPD<sup>[2-10]</sup>,DNA 序列分析<sup>[11-14]</sup>,PCR-RFLP<sup>[14,15]</sup>,

AFLP<sup>[16-18]</sup>, SCAR<sup>[19]</sup>, MARMS<sup>[20]</sup> 以及重复序列、DALP、小卫星等其他方法<sup>[21-23]</sup>。方法的不断创新在于对人参、西洋参基因组信息的逐步了解,其中 MARMS 具有高度的特异性,准确快捷,但其引物设计须建立在大量已知序列的基础上。而 RAPD 以其不需预知基因组序列、操作简单快捷等优点得到了最广泛的应用,但 RAPD 存在着结果重复性欠佳、易受到药材产地及储存时间影响的缺陷,限制了其在分子鉴别领域的应用<sup>[24]</sup>。因此,探索简单易行、稳

收稿日期: 2006-09-13.

\* 通讯作者 Tel: 86 - 10 - 64014411,

E-mail: huangluqi@263.net

定性好、可操作性强的分子标记方法是中药材分子鉴别研究的重点和难点。本文报道的新方法以 RAPD 方法为基本原理,对其引物和退火温度两个主要因素进行了创新,该方法简称为锚定引物扩增多态性 DNA (anchored primer amplification polymorphism DNA, APAPD)。首先以人参、西洋参建立了 APAPD 方法,随后对其反应体系稳定性、不同材料扩增结果稳定性进行了广泛的考察,并结合文献报道 MARMS 方法进行了验证和比较。在此基础上,将 APAPD 方法推广应用到天花粉类、白芷类药材的鉴别中,均取得了理想的结果,表明 APAPD 方法是一种极具前途的中药材分子鉴定新方法。

材料和方法

材料 人参、西洋参及其伪品来源见表 1。天花粉类、白芷类药材来源见表 2、表 3。所有样品经

中国中医科学院中药研究所黄璐琦研究员鉴定后,存放于中国中医科学院中药研究所标本室。

DNA 提取方法 采用改进的 CTAB 法提取药材总 DNA<sup>[25]</sup>。

引物设计 根据已有的人参、西洋参 ITS 序列 (GenBank 登录号: AJ786235, AY548192, U41680, U41689, U41688, U41687)、天花粉<sup>[26]</sup>、白芷 ITS 序列<sup>[27]</sup>设计引物(表 4)。引物长度为 20 bp 左右,遵循一般引物的设计原则,宜选择与需鉴别的伪品序列差异大的区域。人参、西洋参验证引物采用 Shu Zhu 等<sup>[21]</sup>用于人参鉴别的 MARMS 引物。引物由上海生工生物工程有限公司合成。

PCR 扩增条件及优化 PCR 反应体系为 25 μL, 其中 10 mmol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl (pH 9.0), 50 mmol·L<sup>-1</sup> KCl, Mg<sup>2+</sup> 1.5 mmol·L<sup>-1</sup>, dNTP 0.15

表 1 人参、西洋参及其伪品来源

| 编号 | 名称                    | 学名                           | 状态 | 来源              | 时间     | 收集人 |
|----|-----------------------|------------------------------|----|-----------------|--------|-----|
| 1  | 人参                    | <i>Panax ginseng</i>         | 鲜品 | 吉林集安            | 2003 年 | 李欣  |
| 2  | 人参(大马牙) <sup>1)</sup> | <i>P. ginseng</i>            | 鲜品 | 吉林集安            | 2003 年 | 李欣  |
| 3  | 人参(二马牙) <sup>1)</sup> | <i>P. ginseng</i>            | 鲜品 | 吉林集安            | 2003 年 | 李欣  |
| 4  | 人参(黄果) <sup>1)</sup>  | <i>P. ginseng</i>            | 鲜品 | 吉林集安            | 2003 年 | 李欣  |
| 5  | 人参(长脖) <sup>1)</sup>  | <i>P. ginseng</i>            | 鲜品 | 吉林集安            | 2003 年 | 李欣  |
| 6  | 人参                    | <i>P. ginseng</i>            | 药材 | 北京同仁堂           | 2002 年 | 崔光红 |
| 7  | 人参(参须)                | <i>P. ginseng</i>            | 药材 | 北京永安堂           | 2002 年 | 崔光红 |
| 8  | 人参                    | <i>P. ginseng</i>            | 药材 | 河北安国药市          | 1995 年 | 何希荣 |
| 9  | 人参                    | <i>P. ginseng</i>            | 标本 | 中药所标本室          | 2003 年 | 何希荣 |
| 10 | 人参                    | <i>P. ginseng</i>            | 粉末 | 自制              | 2001 年 | 郭兰萍 |
| 11 | 西洋参                   | <i>P. quinquefolius</i>      | 鲜品 | 北京怀柔            | 2003 年 | 黄璐琦 |
| 12 | 西洋参                   | <i>P. quinquefolius</i>      | 药材 | 北京同仁堂, 3.80 元/g | 2002 年 | 崔光红 |
| 13 | 西洋参                   | <i>P. quinquefolius</i>      | 药材 | 北京同仁堂, 1.80 元/g | 2002 年 | 崔光红 |
| 14 | 西洋参                   | <i>P. quinquefolius</i>      | 药材 | 北京同仁堂, 0.98 元/g | 2002 年 | 崔光红 |
| 15 | 西洋参                   | <i>P. quinquefolius</i>      | 药材 | 美国              | 2002 年 | 陈敏  |
| 16 | 西洋参                   | <i>P. quinquefolius</i>      | 药材 | 加拿大             | 2002 年 | 陈敏  |
| 17 | 西洋参                   | <i>P. quinquefolius</i>      | 药材 | 北京永安堂           | 2002 年 | 崔光红 |
| 18 | 西洋参                   | <i>P. quinquefolius</i>      | 标本 | 中药所标本室          | 1996 年 | 何希荣 |
| 19 | 西洋参                   | <i>P. quinquefolius</i>      | 饮片 | 北京华颐中药制药厂       | 2001 年 | 黄璐琦 |
| 20 | 西洋参                   | <i>P. quinquefolius</i>      | 饮片 | 江西樟树中药饮片厂       | 2001 年 | 黄璐琦 |
| 21 | 野豇豆                   | <i>Vigna vexillata</i>       | 标本 | 江西中医学院标本室       | 2000 年 | 葛菲  |
| 22 | 栝兰                    | <i>Talinum paniculatum</i>   | 鲜品 | 湖北              | 2003 年 | 崔光红 |
| 23 | 山莴苣                   | <i>Lactuca indica</i>        | 标本 | 江西中医学院标本室       | 2001 年 | 葛菲  |
| 24 | 桔梗                    | <i>Platycodon mndiflorum</i> | 鲜品 | 江西              | 2003 年 | 葛菲  |
| 25 | 金钱豹                   | <i>Campanumoea javanica</i>  | 标本 | 江西中医学院标本室       | 1995 年 | 葛菲  |
| 26 | 轮叶沙参                  | <i>Adenophom tertmphylla</i> | 鲜品 | 江西              | 2003 年 | 葛菲  |
| 27 | 四叶参                   | <i>Codonopsis lanceolata</i> | 标本 | 江西中医学院标本室       | 1990 年 | 葛菲  |
| 28 | 商陆                    | <i>Phytolacca acinosa</i>    | 标本 | 江西中医学院标本室       | 1990 年 | 葛菲  |
| 29 | 莨菪                    | <i>Hyoscyamus niger</i>      | 标本 | 江西中医学院标本室       | 1995 年 | 葛菲  |
| 30 | 鸦葱                    | <i>Scorzonem glabm</i>       | 标本 | 江西中医学院标本室       | 2000 年 | 葛菲  |
| 31 | 紫茉莉                   | <i>Mimibills jlapa</i>       | 鲜品 | 北京              | 2003 年 | 崔光红 |

注: 1) 人参农家品种<sup>[28]</sup>

表 2 天花粉类药材来源

| 编号 | 类别         | 名称                     | 学名   | 来源      | 时间    | 收集人 |
|----|------------|------------------------|--|---------|-------|-----|
| 1  | 大宗商品       | 栝楼                     | <i>Trichosanthes kirilowii</i> Maxim                           | 河南郑州    | 1983年 | 标本室 |
| 2  |            | 栝楼                     | <i>T. kirilowii</i> Maxim                                      | 河北鄂州    | 1998年 | 黄璐琦 |
| 3  |            | 栝楼                     | <i>T. kirilowii</i> Maxim                                      | 湖北蒲圻    | 1998年 | 黄璐琦 |
| 4  |            | 栝楼(仁栝楼) <sup>1)</sup>  | <i>T. kirilowii</i> Maxim                                      | 山东长清伏牛镇 | 1998年 | 王敏  |
| 5  |            | 栝楼(糖栝楼) <sup>1)</sup>  | <i>T. kirilowii</i> Maxim                                      | 山东长清伏牛镇 | 1998年 | 王敏  |
| 6  |            | 栝楼(牛心栝楼) <sup>1)</sup> | <i>T. kirilowii</i> Maxim                                      | 山东宁阳伏山镇 | 1998年 | 王敏  |
| 7  |            | 栝楼                     | <i>T. kirilowii</i> Maxim                                      | 河南安阳    | 2003年 | 冯成强 |
| 8  |            | 栝楼                     | <i>T. kirilowii</i> Maxim                                      | 北京药植所   | 2003年 | 冯成强 |
| 9  |            | 栝楼                     | <i>T. kirilowii</i> Maxim                                      | 北京同仁堂   | 2003年 | 冯成强 |
| 10 |            | 栝楼                     | <i>T. kirilowii</i> Maxim                                      | 河北安国药市  | 2003年 | 冯成强 |
| 11 |            | 双边栝楼                   | <i>T. nosthonii</i> Hams                                       | 四川南川    | 1975年 | 标本室 |
| 12 |            | 双边栝楼                   | <i>T. nosthonii</i> Hams                                       | 四川南川    | 1998年 | 黄璐琦 |
| 13 | 小宗商品       | 多卷须栝楼                  | <i>T. multieirata</i> C. Y. Cheng et Yueh                      | 贵州罗甸    | 1982年 | 标本室 |
| 14 |            | 黄山栝楼                   | <i>T. nosthonii</i> Hams var <i>huangshannensis</i> S. K. Chen | 产地不详    | 1980年 | 标本室 |
| 15 |            | 黄山栝楼                   | <i>T. nosthonii</i> Hams var <i>huangshannensis</i> S. K. Chen | 江西婺源    | 1999年 | 黄璐琦 |
| 16 |            | 尖果栝楼                   | <i>T. nosthonii</i> var. <i>stylopodifera</i>                  | 贵州雷山    | 1982年 | 标本室 |
| 17 |            | 尖果栝楼                   | <i>T. nosthonii</i> var. <i>stylopodifera</i>                  | 贵州锦屏    | 1982年 | 标本室 |
| 18 |            | 井冈山栝楼                  | <i>T. jingangshanica</i> Yueh.                                 | 江西井冈山   | 1998年 | 黄璐琦 |
| 19 |            | 井冈山栝楼                  | <i>T. jingangshanica</i> Yueh.                                 | 江西井冈山   | 1998年 | 黄璐琦 |
| 20 | 混淆品或地区习惯用品 | 湖北栝楼                   | <i>T. hupehensis</i> C. Y. Cheng et Yueh                       | 江西婺源    | 2003年 | 黄璐琦 |
| 21 |            | 长萼栝楼                   | <i>T. laueribmtea</i> Hayata                                   | 四川南川    | 1998年 | 黄璐琦 |
| 22 |            | 大方油栝楼                  | <i>T. Dapingensis</i> NG Ye et SJL                             | 贵州大方    | 2003年 | 周涛  |
| 23 |            | 趾叶栝楼                   | <i>T. peuta</i> Merr.  | 云南勐腊    | 1983年 | 标本室 |
| 24 |            | 大子栝楼                   | <i>T. truncata</i> C. B. Clarke                                | 广西      | 1983年 | 标本室 |
| 25 |            | 木鳖子                    | <i>Momordica cochinchinensis</i>                               | 广西      | 2003年 | 黄璐琦 |
| 26 |            | 异叶马兜儿                  | <i>Melothria heterophylla</i> (Lour.) Cogn.                    | 福建      | 2003年 | 黄璐琦 |
| 27 |            | 王瓜                     | <i>T. cucumeroides</i> Maxim                                   | 江西婺源    | 2003年 | 黄璐琦 |
| 28 |            | 马干铃栝楼                  | <i>T. lepiniana</i> (Naud.) Cogn                               | 云南勐海    | 1983年 | 标本室 |

注: 1) 天花粉农家品种<sup>[12]</sup>

表 3 白芷类药材来源

| 编号 | 名称   | 植物学名  | 来源      | 时间    | 收集人 |
|----|------|---|---------|-------|-----|
| 1  | 台湾白芷 | <i>Angelica formosana</i> de Bross                                | 台湾台中    | 2001年 | 黄璐琦 |
| 2  | 川白芷  | <i>A. dahurica</i>  | 四川遂宁    | 2001年 | 黄璐琦 |
| 3  | 杭白芷  | <i>A. dahurica</i>  | 浙江杭州    | 2001年 | 黄璐琦 |
| 4  | 祁白芷  | <i>A. dahurica</i>  | 河北安国    | 2001年 | 黄璐琦 |
| 5  | 禹白芷  | <i>A. dahurica</i>  | 河南禹县    | 2001年 | 黄璐琦 |
| 6  | 雾灵白芷 | <i>A. polyneuralis</i> Nakai et Kitagawa                          | 河北兴隆雾灵山 | 2001年 | 黄璐琦 |
| 7  | 兴安白芷 | <i>A. dahurica</i> (Fisch. ex. Hoffm.) Benth. ex. Franch. dt. Sav | 黑龙江佳木斯  | 2001年 | 黄璐琦 |
| 8  | 黑水当归 | <i>A. amurensis</i> Schischk                                      | 黑龙江佳木斯  | 2001年 | 黄璐琦 |

表 4 引物及 PCR 条件

| 类别     | Primer         | Sequence (5' to 3')         | PCR programs                                      |
|--------|----------------|-----------------------------|---|
| 参类     | Pg-q36 F       | TTACAATACCGGGTGAGGGA*       | 94 °C 45 s, 40 °C 1 min, 72 °C 1.5 min, 40 cycles |
|        | Pg-q26 F       | CGCGAACACGTTACAATACC        |   |
|        | Pg-q548 R      | CCGCACGACATGAGAAGAG         |   |
| 栝楼类    | TkS1-64 F      | TTCGTTTGAGTTCCCTTGCG*       | 94 °C 30 s, 50 °C 45 s, 72 °C 1 min, 40 cycles    |
|        | TkS2-112 F     | CAACCACCGTAGTGTCGC          |   |
|        | TkS2-130 R     | GCGACACTACGGTGGTTG          |   |
| 白芷类    | AS1-100 F      | AGTCGTAACAAGGTTTCCGTAG*     | 94 °C 30 s, 40 °C 45 s, 72 °C 1 min, 40 cycles    |
|        | AS1-120 R      | TACGGAAACCTTGTACGAC         |   |
| 人参验证引物 | Pgjq tk1 341 F | GCCGGTTCTTCTTTTCAAAAAGAAAT  | 94 °C 30 s, 66 °C 1 min, 40 cycles                |
|        | Pgjq tk1 966 R | GATTCTGCATATACGCCCAAATT     |   |
|        | PgS481 F       | GGAAAATGCGGGTTATGACAAA      |   |
|        | P-S712 R       | GCTCGAATGTATCAACAGAATCATTTT |   |

注: \* 各种药材的鉴别引物

mmol·L<sup>-1</sup>, Taq E 1U(Invitrogen, Promega等), Primer 0.15 μmol·L<sup>-1</sup>, 模板 DNA 50 ~ 200 ng。扩增在 ABI9700扩增仪上进行,所有 APAPD引物均先用待鉴定的典型药材(一般 4个样品)进行引物筛选和 PCR条件的优化。按 RAPD通用程序进行初筛: 94 °C预变性 5 min,然后进行 40个循环: 94 °C变性 45 s, 37 °C退火 1 min, 72 °C延伸 1 min 30 s,循环结束后 72 °C延伸 5 min。将能对正、伪品产生多态性条带的引物逐渐提高退火温度,消除非特异性条带,确定最佳反应 PCR参数。扩增产物用 2.0%的琼脂糖凝胶(含 EB)在 1 × TAE 缓冲液中电泳, SYNGENE型凝胶成像系统下观察、拍照。

**结果**

**1 人参、西洋参 APAPD方法的建立**

当 PCR退火温度为 37 °C时,引物 Pg-q36F对人参、西洋参的扩增效果好,表现为条带清晰,多态性条带明显。逐步升高 PCR退火温度显示,引物在 37 ~ 60 °C的范围均能进行扩增,但 40 ~ 50 °C时,PCR扩增结果稳定,对人参扩增 849 bp的单一一条带,对西洋参扩增 864 bp和 792 bp两条带; 55 ~ 60 °C时条带逐渐模糊(图 1)。为确保各种来源药材以及伪品均能有效扩增,PCR条件确定为: 94 °C预变性 5 min,然后进行 40个循环: 94 °C 45 s, 40 °C 1 min, 72 °C 1.5 min,循环结束后 72 °C延伸 5 min。

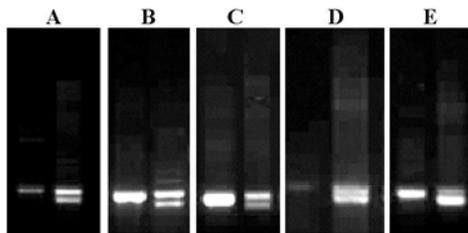


图 1 不同退火温度人参(前)、西洋参(后)电泳图谱。A: 37 °C; B: 40 °C; C: 50 °C; D: 55 °C; E: 60 °C

**2 APAPD方法准确性研究**

为检验引物 Pg-q36F鉴别人参、西洋参的准确性,分别对其市场上曾经出现过的 11种伪品用引物 Pg-q36F进行扩增;同时将所有人参、西洋参样品均用 MARMS引物 Pgjqtk1966R, PqtK896F, PgS481F, P-S712R进行验证。结果引物 Pg-q36F中,只有人参扩增 849 bp条带,西洋参扩增 864 bp和 792 bp两条带,而所有的伪品均没有相应的条带(图 2)。MARMS引物中,所有人参均出现 649 bp和 249 bp条带,所有西洋参均出现 649 bp条带(图 3)。可

见,引物 Pg-q36F鉴别结果与文献引物鉴别结果一致,而且与各种混伪品均能明显的区分,表明引物 Pg-q36F可以作为人参、西洋参的鉴别引物。

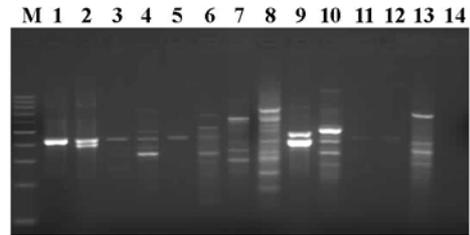


图 2 人参、西洋参与其伪品电泳图谱。1: 人参; 2: 西洋参; 3: 野豇豆; 4: 枳椇; 5: 山莴苣; 6: 桔梗; 7: 金钱豹; 8: 轮叶沙参; 9: 四叶参; 10: 商陆; 11: 莨菪; 12: 鸦葱; 13: 紫茉莉; 14: 空白。M: 200 bp DNA marker

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20

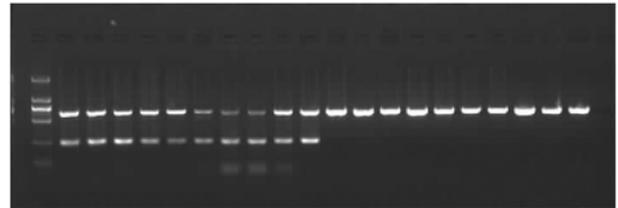


图 3 人参、西洋参特异引物电泳图谱。1 - 10: 西洋参; 11 - 20: 人参,顺序同表 1。M: DL 2000 DNA marker

**3 APAPD方法稳定性研究**

**3.1 PCR反应体系的稳定性** PCR反应体系中, Taq酶质量是影响鉴别结果的主要因素。在人参、西洋参 MARMS鉴别中,普通 Taq酶对人参、西洋参均扩增 249 bp条带,无法进行鉴别,只有高保真 Taq酶才能得到正确的结果(图 4)。而对于引物 Pg-q36F,分别选用 Invitrogen, Promega和国内多达 5家公司的普通 Taq酶进行扩增,结果所有的 Taq酶均得到一致的结果(图 5)。表明该引物对 PCR反应体系要求不高,普通 Taq酶均能满足要求,便于在各个实验室内重复。

**3.2 不同材料扩增结果的稳定性** 人参在长期的栽培过程中,产生了不同的农家品种,如大马牙、二马牙、黄果和长脖<sup>[26]</sup>。西洋参原产地在美国、加拿

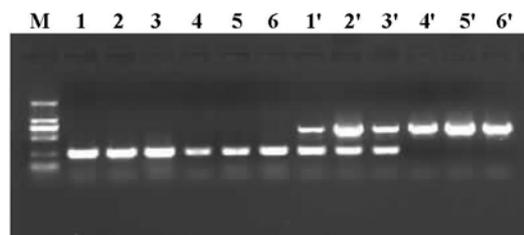


图 4 不同 Taq酶对人参西洋参特异引物扩增结果。1 - 6: Taq 1; 1' - 6': Taq 2; 1 - 3, 1' - 3': 人参; 4 - 6, 4' - 6': 西洋参。M: DL 2000 DNA marker

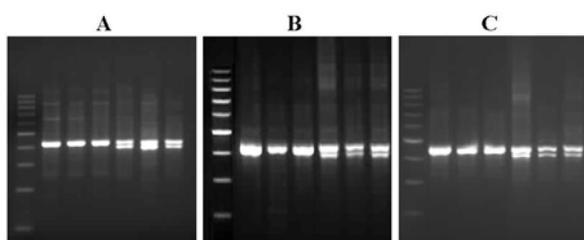


图 5 3种 Taq酶对引物 Pg-q36F的扩增结果. A: Invitrogen Taq; B: Promega Taq; C: Sangon Taq. 每组前 3个样品为人参,后 3个为西洋参

大,自从成功引种到我国后,已有不少地区开始大规模栽培。根据西洋参品质的不同,其价格表现出极大的差异,如同仁堂药店就有 3.80 元/g、1.80 元/g以及 0.98 元/g不等的西洋参出售。同时西洋参还被大量的加工成饮片,从而加大了人参、西洋参鉴别的难度。因此,对不同药材来源,如不同产地、不同价格、不同加工方式以及不同储藏时间的药材进行正确鉴别,是保证临床用药安全的第一步。为此,本文选用人参的 4个农家品种、不同药店出售药材标本以及粉末和西洋参的不同产地、不同价格药材、饮片以及标本作为实验材料,具有广泛的代表性。所有样品均用引物 Pg-q36F进行 PCR扩增,结果不同来源的人参均稳定扩增 849 bp条带,不同来源西洋参均稳定扩增 864 bp和 792 bp条带(图 6)。表明该引物能稳定地对人参、西洋参进行鉴别。

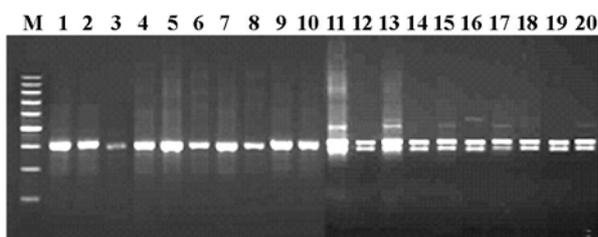


图 6 引物 Pg-q36F鉴别人参、西洋参电泳图谱. 1 - 10: 人参; 11 - 20: 西洋参. 顺序同表 1. M: 200 bp DNA marker

#### 4 APAPD方法在天花粉、白芷类药材中的适用性研究

天花粉引物 TkS1-64F, TkS2-112F, TkS2-130R 中 TkS1-64F扩增效果好,表现为天花粉正品、伪品的多态性明显,能对正、伪品进行准确的鉴别(图 7)。PCR循环确定为:94℃预变性 5 min,然后进行 40个循环:94℃ 30 s,50℃ 45 s,72℃ 1 min,循环结束后 72℃延伸 5 min。通过对 19批不同来源天花粉药材的检测(图 8),确定 560 bp,960 bp条带为天花粉的特征鉴别带,其他条带如 1 930 bp,1 400 bp,839 bp,715 bp由于在不同 PCR反应体系或不

同产地药材间不能稳定重现,可作为辅助鉴别条带。各伪品的特征鉴别条带分别为:湖北栝楼 686 bp, 800 bp, 938 bp, 1 260 bp;长萼栝楼 686 bp, 800 bp, 938 bp, 1 260 bp;贵州栝楼 760 bp, 1 259 bp;趾叶栝楼 900 bp;大子栝楼 760 bp;木鳖子 770 bp, 1 373 bp;异叶马兜儿 673 bp, 786 bp, 919 bp, 1 189 bp;王瓜 865 bp, 1 296 bp, 2 118 bp, 2 669 bp;马干铃栝楼没有扩增条带。

白芷引物 AFS1-100F, AFS1-120R 中 AFS1-100F 扩增多态性明显,白芷与雾灵白芷、兴安白芷、黑水当归能明显区分(图 9)。PCR循环确定为:94℃预变性 5 min,然后进行 40个循环:94℃ 30 s,40℃ 45 s,72℃ 1 min,循环结束后 72℃延伸 5 min。通过对 17批不同来源白芷药材的检测(图 10),确定白芷的特征鉴别条带为 740 bp;雾灵白芷的为 740

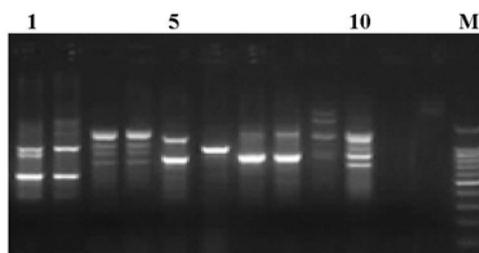


图 7 天花粉及其伪品电泳图谱. 1: 栝楼; 2: 双边栝楼; 3: 湖北栝楼; 4: 长萼栝楼; 5: 大方油栝楼; 6: 趾叶栝楼; 7: 大子栝楼; 8: 木鳖子; 9: 异叶马兜儿; 10: 王瓜; 11: 马干铃栝楼; 12: 空白; M: DNA marker

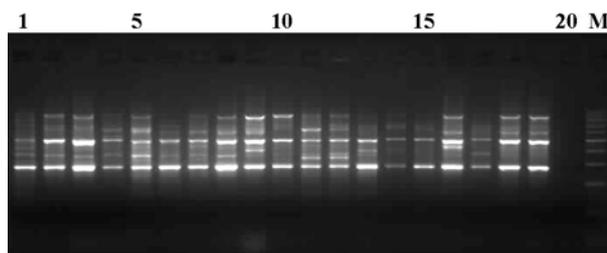


图 8 不同批次的天花粉电泳图谱. 1 - 19: 19个不同批次的天花粉样品; 20: 空白; M: 200 bp DNA marker

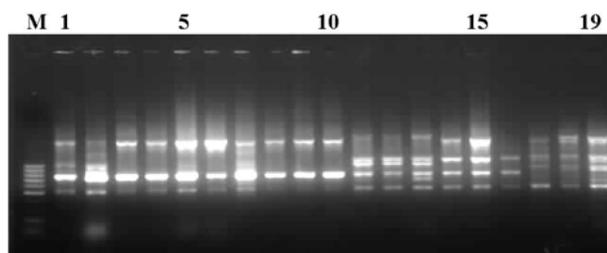


图 9 白芷及其伪品电泳图谱. 1, 2: 川白芷; 3, 4: 杭白芷; 5, 6: 祁白芷; 7, 8: 禹白芷; 9, 10: 台湾白芷; 11 - 13: 雾灵白芷; 14 - 16: 兴安白芷; 17 - 19: 黑水当归; M: 100 bp DNA marker

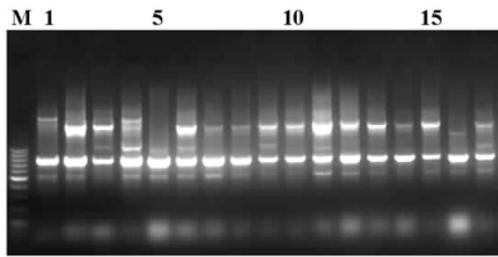


图 10 不同批次白芷电泳结果. 1 - 17: 不同批次白芷样品; M: 100 bp DNA marker

bp, 917 bp, 1 032 bp; 兴安白芷的为 740 bp, 1 032 bp; 黑水当归的为 500 bp和 1 032 bp. 与人参、西洋参、天花粉多态性条带不同的是: 白芷类正品的特征条带在雾灵白芷和兴安白芷中也存在, 但雾灵白芷比白芷多了 740 bp和 917 bp两条带; 兴安白芷比白芷多了 740 bp条带, 由各自条带的组合便形成了特征指纹图谱, 可以准确的用于鉴别。

### 讨论

天花粉为一类重要的中药材, 具有止孕和抗爱滋病活性的天花粉蛋白 (trichosanthin) 就是从本属植物栝楼 *Trichosanthes kirilowii* Maxim 的块根中提取的。栝楼作为一复合种的研究被称为“the most intractable taxonomic problem in eastern Asia Cucurbitaceae center”。天花粉商品药材多达 28 种, 其中来源同属近缘植物有 19 种, 有些具有很高的毒性<sup>[26]</sup>。本研究组曾应用 RAPD 技术以及蛋白免疫检测技术<sup>[29]</sup>对天花粉及湖北栝楼、木鳖子等进行过鉴别, 但 RAPD 方法的结果受储存时间的影响, 应用于天花粉药材鉴别存在一定难度<sup>[24]</sup>, 而引物 TkSI-64F 能对不同来源的样品进行扩增, 仅一个引物就能得到天花粉正品及其 8 种混伪品的 DNA 指纹图谱, 为保证天花粉类药材的应用提供了保障。

现用商品白芷药材为栽培品, 分为川(杭)白芷和祁(禹)白芷两大类。由于对其原野生植物来源未能真正搞清楚, 因此中药白芷的种名鉴定曾有过多次变化, 一直没有统一的定论。本研究组从形态、化学成分、ITS 序列分析、RAPD 等方面对白芷的种质资源进行过详尽的研究, 证明中药白芷 (包括川白芷、杭白芷、祁白芷和禹白芷) 的野生种质来源为目前仅分布于我国东南地区 (以台湾省为主) 的台湾白芷, 而台湾白芷、兴安白芷、雾灵当归三者具有密切的亲缘关系, 黑水当归是研究的外缘类群<sup>[27]</sup>。本文所用引物 AfsI-100F 的多态性结果也支持上述结论, 台湾白芷及 4 种商品白芷的特征鉴别带一致,

兴安白芷和雾灵当归均含有白芷的鉴别条带, 但又多出 1~2 条带, 而黑水当归没有白芷。兴安白芷和雾灵当归所共有的特征带, 提示 APAPD 方法也可以用于植物亲缘关系的研究。

通过人参、西洋参、天花粉以及白芷类药材的鉴别表明, APAPD 方法具有如下优点: ①简单易行。虽然在引物设计上增加了难度, 但设计 2~3 个引物即可得到理想的鉴别引物, 避免了大量筛选随机引物的烦恼; ②稳定性和重复性好。由于提高了引物长度和特异性, 扩增条带一般只有 1~5 条, 药材产地、储藏时间等均对 PCR 结果没有影响; 同时, APAPD 引物对 PCR 反应条件要求不高, 便于推广和在各个实验室间重复; ③提供的信息量大。能对正品及大部分伪品同时进行扩增, 从而可以分别建立正品及伪品的标准电泳鉴别图谱以实现正、伪品的准确鉴别。随着 APAPD 引物的不断增加, 将为更多药材提供标准 DNA 鉴别指纹图谱, 为中药材的质量控制提供强大的工具。

### References

- [ 1 ] Cheung KS, Kwan HS, But PP, et al. Pharmacognostical identification of American and Oriental ginseng roots by genomic fingerprinting using arbitrarily primed polymerase chain reaction (AP-PCR) [ J ]. *J Ethnopharmacol*, 1994, 42: 67 - 69.
- [ 2 ] Shaw PC, But PP. Authentication of *Panax* species and their adulterants by random-primed polymerase chain reaction [ J ]. *Planta Med*, 1995, 61: 466 - 469.
- [ 3 ] Artiukova EV, Kozyrenko MM, Reunova GD, et al. Analysis of genomic variability of planted *Panax ginseng* by RAPD [ J ]. *Mol Biol (Mosk)*, 2000, 34: 339 - 344.
- [ 4 ] Wen J, Zimmer EA. Phylogeny and biogeography of *Panax* L. (the ginseng genus, araliaceae): inferences from ITS sequences of nuclear ribosomal DNA [ J ]. *Mol Phylogenet Evol*, 1996, 6: 167 - 177.
- [ 5 ] Fushimi H, Komatsu K, Isoe M, et al. 18S ribosomal RNA gene sequences of three *Panax* species and the corresponding ginseng drugs [ J ]. *Biol Pharm Bull*, 1996, 19: 1530 - 1532.
- [ 6 ] Mihalov JJ, Marderosian AD, Pierce JC. DNA identification of commercial ginseng samples [ J ]. *J Agric Food Chem*, 2000, 48: 3744 - 3752.
- [ 7 ] Um JY, Chung HK, Kim MS, et al. Molecular authentication of *Panax ginseng* species by RAPD analysis and PCR-RFLP [ J ]. *Biol Pharm Bull*, 2001, 24: 872 - 875.
- [ 8 ] Yukiko TK, Isao A, Ichio I. A random amplified polymorphic DNA (RAPD) primer to assist the identification of a selected strain, aizu K-111 of *Panax*

- ginseng* and the sequence amplified [ J ]. Biol Pharm Bull, 2001, 24: 1210 - 1213.
- [ 9 ] Cui XM, Lo CK, Yip KL, et al. Authentication of *Panax notoginseng* by 5S-rRNA spacer domain and random amplified polymorphic DNA ( RAPD ) analysis [ J ]. Planta Med, 2003, 69: 584 - 586.
- [ 10 ] Shim YH, Choi JH, Park CD, et al. Molecular differentiation of *Panax* species by RAPD analysis [ J ]. Arch Pharm Res, 2003, 26: 601 - 605.
- [ 11 ] Hong GK, Yong S, Jae EC. The physical map of the chloroplast DNA from Korean ginseng ( *Panax ginseng* C. A. Meyer ) [ J ]. Mol Cells, 1997, 7: 136 - 139.
- [ 12 ] Ma XJ, Wang XQ, Xiao PG, et al. Comparison of ITS sequences between wild ginseng DNA and garden ginseng DNA [ J ]. Chin J Chin Mat Med ( 中国中药杂志 ), 2000, 25: 206 - 209.
- [ 13 ] Andrew CC, Michael KB, Patricia AM, et al. Phylogeny of *Panax* using chloroplast tmC-tmD intergenic region and the utility of tmC-tmD in interspecific studies of plants [ J ]. Mol Phylogenet Evol, 2004, 31: 894 - 903.
- [ 14 ] Fushimi H, Komatsu K, Isobe M, et al. Application of PCR-RFLP and MASA analyses on 18S ribosomal RNA gene sequence for the identification of three Ginseng drugs [ J ]. Biol Pharm Bull, 1997, 20: 765 - 769.
- [ 15 ] Ngan F, Shaw IC, But PPH. Molecular authentication of *Panax* species [ J ]. Phytochemistry, 1999, 50: 787 - 791.
- [ 16 ] Ma XJ, Wang XQ, Xiao PG, et al. A study on AFLP fingerprinting of landraces of *Panax ginseng* L. [ J ]. China J Chin Mater Med ( 中国中药杂志 ), 2000, 25: 707 - 710.
- [ 17 ] Luo ZY, Zhou G, Zhou SQ, et al. Construction of genomic DNA fingerprinting in *Panax ginseng* and *P. quinquefolium* by AFLP [ J ]. Acta Pharm Sin ( 药学学报 ), 2000, 35: 626 - 629.
- [ 18 ] Ha WY, Shaw PC, Liu J, et al. Authentication of *Panax ginseng* and *Panax quinquefolium* using amplified fragment length polymorphism ( AFLP ) and directed amplification of minisatellite region DNA ( DAMD ) [ J ]. J Agric Food Chem, 2002, 50: 1871 - 1875.
- [ 19 ] Wang J, Ha WY, Ngan FN, et al. Application of sequence characterized amplified region ( SCAR ) analysis to authenticate *Panax* species and their adulterants [ J ]. Planta Med, 2001, 67: 781 - 783.
- [ 20 ] Zhu S, Fushimi H, Cai SQ, et al. Species identification from Ginseng drugs by multiplex amplification refractory mutation system ( MARMS ) [ J ]. Planta Med, 2004, 70: 189 - 192.
- [ 21 ] Leung OC, Ho ISH, Leung FCC. Isolation and characterization of repetitive DNA sequences from *Panax ginseng* [ J ]. Mol Genet Genomics, 2002, 266: 951 - 961.
- [ 22 ] Shim YH, Park CD, Kimdo H, et al. Identification of *Panax* species in the herbal medicine preparations using gradient PCR [ J ]. Method Biol Pharm Bull, 2005, 28: 671 - 676.
- [ 23 ] Ha WY, Yau FC, But PP, et al. Direct amplification of length polymorphism analysis differentiates *Panax ginseng* from *P. quinquefolium* [ J ]. Planta Med, 2001, 67: 587 - 589.
- [ 24 ] Huang LQ, Wang M, Yang B, et al. Authentication of the Chinese drug tian—hua—fen ( Radix Trichosanthes ) and its adulterants and substitutes using random amplified polymorphic DNA ( RAPD ) [ J ]. Chin J Pharm Anal ( 药物分析杂志 ), 1999, 19: 233 - 238.
- [ 25 ] Cui GH, Tang XJ, Huang LQ. DNA isolation from starch and polysaccharide-rich plants [ J ]. Chin J Chin Mater Med ( 中国中药杂志 ), 2006, 31: 1365 - 1367.
- [ 26 ] Huang LQ, Yue ZX, Yang B, et al. Systematic study of *Trichosanthes* L. [ J ]. J Jiangxi Univ TCM ( 江西中医学院学报 ), 1999, 11: 75 - 78.
- [ 27 ] Huang LQ. Systemic study on the germplasm resources of *Dahurian Angelica* [ J ]. J Jiangxi Univ TCM ( 江西中医学院学报 ), 2004, 16: 5 - 7.
- [ 28 ] Ma XJ, Wang XQ, Xiao PG, et al. Progression of germplasm resources of *Panax ginseng* in China [ J ]. Chin Pharm J ( 中国药学杂志 ), 2000, 35: 289 - 292.
- [ 29 ] Feng CQ, Huang LQ, Liu C, et al. Study on Radax Trichosanthis identification using protein immunization detection technology [ J ]. Chin Pharm J ( 中国药学杂志 ), 2005, 8: 574 - 577.