

RAPD 方法在细辛类药材鉴别研究中的问题及其对策

黄璐琦 王 敏 周长征* 李念华** 何希荣 杨 滨

(中国中医研究院中药研究所生药室, 北京 100700; *北京中医药大学中药学院
药用植物教研室, 北京 100029; **中国科学院植物研究所, 北京 100044)

摘要 以细辛类药材的鉴别为例, 对 RAPD 方法在药材鉴别中所存在的问题进行了探讨, 结果表明药材 DNA 模板浓度, 降解程度及药材的产地均对 RAPD 产物有不同程度的影响, 从而提出选择适宜的药材 DNA 模板浓度, 筛选合适的引物和采用对照组聚类分析等方法来消除上述因素的影响, 进而讨论了 RAPD 方法在药材鉴别上的适用范围。

关键词 多态性分析; 细辛类药材

90 年代在 polymerase chain reaction (PCR) 技术基础上发展起来的随机扩增的 DNA 多态性分析 (random amplified polymorphic DNAs, 简称 RAPD) 已成功地应用于遗传多样性的检测、基因定位和品系鉴定等诸多领域, 并已开始用于人参、西洋参、蛇类、地胆草等中药材的鉴定^[1]。这一方法快速、简便且灵敏度高, 但其应用于遗传多样性和系统学研究中所存在的问题, 如 DNA 模板纯度、浓度及 RNA 对扩增产物的影响, 已引起关注和研究^[2]。在药材鉴别方面, 还存在如何克服 DNA 模板降解程度不对扩增产物的影响, 1~2 个引物鉴别药材的可靠性, 以及 RAPD 的适用范围、合适引物的筛选等诸多特殊问题。本文以细辛类药材的鉴别为例, 针对这些问题, 设计了一组实验来进行探讨。

材 料 和 方 法

仪器和试剂 1169 型电脑全自动基因扩增仪 (北京市新技术应用研究所); Micro-MB

3616 型高速离心机 (IEC 公司, 美国); UV-I 型多功能紫外透射仪 (北京市新技术应用研究所)。

Taq 酶 (U-P Biotech, Inc. USA); 琼脂糖 (Promega 公司); dNTPs (Promega 公司); CTAB (Sigma 公司); 溴化乙锭 (Fluka 公司); 其余试剂为北京化工厂产的分析纯。

材料 细辛类药材和艾叶药材取自中国中医研究院中药研究所标本室; 原植物取自中国科学院香山植物园。除艾叶药材由李燕立鉴定外, 其余都经杨春澍教授鉴定。材料情况见表 1。

DNA 模板的提取和浓度测定 干药材 0.10 g 或新鲜叶片少许, 置 1.5 ml Ep 管中, 加入液氮用镊子研碎, 立即加入 500 μ l 保温 60 $^{\circ}$ C 的 2 \times CTAB 提取液 [CTAB 2%, Tris-HCl (pH 8.0) 100 mmol \cdot L $^{-1}$, EDTA 20 mmol \cdot L $^{-1}$, NaCl 1.4 mol \cdot L $^{-1}$, 巯基乙醇 2%] 及 20 μ l 巯基乙醇混匀, 60 $^{\circ}$ C 保温 40 min; 加入等体积的氯仿-异丙醇 (24:1) 抽提, 轻轻颠倒混匀, 10000 r \cdot min $^{-1}$ 离心 10 min, 吸取上清液, 加入 1/10 体积的 10% CTAB 溶液, 再加入等体积氯仿-异丙醇 (24:1) 重复抽提一次, 吸取上清液加入等体积的沉淀缓冲液 [CTAB 1%, Tris-HCl (pH 8.0) 50 mmol \cdot L $^{-1}$, EDTA 10 mmol \cdot L $^{-1}$, 巯基

收稿日期 1997-10-23

本文为国家科委博士创新项目 960411420 与国家自然科学基金课题 No. 39670054。

乙醇 1%], 室温下放置 30 min 以上, 10000 $r \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 小心去上清液, 分别用 70% 乙醇和无水乙醇各洗涤一次, 弃掉洗液、挥

干。用分光光度计测定 DNA 浓度后进行 PCR 扩增。

Tab 1 The sources, collecting time and conditions of the crude drugs studied

No.	Name	Source	Collecting time	Conditions
1	<i>Asarum heterotropoides</i> var. <i>mandshuricum</i> Kitag.	Shanxi	1978.5	dried
2	<i>Asarum heterotropoides</i> var. <i>mandshuricum</i> Kitag.	Shenyang, Liaoning	1982.6	dried
3	<i>Asarum heterotropoides</i> var. <i>mandshuricum</i> Kitag.	Quanyang, Jilin	1988.4	dried
4	<i>Asarum heterotropoides</i> var. <i>mandshuricum</i> Kitag.	Changchun, Jilin	1991.10	dried
5	<i>Asarum heterotropoides</i> var. <i>mandshuricum</i> Kitag.	Northeast of China	1994.11	dried
6	<i>Asarum</i> spp.	Institute of Acupuncture, CATCM	1997.7	dried
7	<i>A. heterotropoides</i> var. <i>mandshuricum</i> Kitag.	Northeast of China	1997.7	fresh
8	<i>A. sieboldii</i> f. <i>seouleuse</i> C. Y. Cheng et C. S. Yang	Northeast of China	1994.11	dried
9	<i>A. sieboldii</i> f. <i>seouleuse</i> C. Y. Cheng et C. S. Yang	Benxi, Liaoning	1997.7	fresh
10	<i>A. sieboldii</i> Miq.	Shennongjia, Hubei	1996.7	dried
11	<i>A. sieboldii</i> Miq.	Luonan, Shanxi	1997.7	fresh
12	<i>A. caulescens</i> Maxim.	Chengkou, Sichuan	1996.5	dried
13	<i>A. caudigerum</i> Hance	Emei, Sichuan	1997.7	fresh
14	<i>A. splendens</i> (maekawa) C. Y. Cheng et C. S. Yang	Emei, Sichuan	1997.7	fresh
15	<i>A. forbesii</i> Maxim.	Jiangpu, Jiangsu	1988.6	dried
16	<i>A. forbesii</i> Maxim.	Jiangsu	1997.7	fresh
17	<i>A. caudigerellum</i> C. Y. Cheng et C. S. Yang	Emei, Sichuan	1992	dried
18	<i>A. caudigerellum</i> C. Y. Cheng et C. S. Yang	Emei, Sichuan	1997.7	fresh
19	<i>A. dabieshanense</i> D. Q. Wang et S. H. Huang	Huoshan, Anhui	1996	dried
20	<i>A. dabieshanense</i> D. Q. Wang et S. H. Huang	Huoshan, Anhui	1997.7	fresh
21	<i>Artemisia argyi</i> Levl. et Vant.	Shenyang, Liaoning	1991.2	dried

PCR 反应 反应体系总体积 50 μl , 其中引物为 1 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 核 DNA 约 150 ng, Taq 酶 3U, dNTPs 各 0.05 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。扩增程序为预变性 5 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 40 s, 38 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 45 s 40 个循环, 后延伸 72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min。取 10 μl 扩增产物于 1.0% 琼脂糖凝胶上用 1 \times TAE 电泳缓冲液电泳, 紫外检测拍照。

结 果 与 讨 论

1 DNA 模板浓度对 RAPD 结果的影响 对此问题的研究结果并不一致, Devos 和 Gale^[3] 认为在 200~400 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 间获得一致的扩增产物, Ellsworth^[4] 等认为模板的最适浓度为 12~40 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 汪小全等^[2] 认为 0.4~10 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$

为适宜浓度。这些结果虽是从不同的研究对象上获得, 但都是来自完整的 DNA 模板, 而药材中的 DNA 模板都有不同程度的降解, 其最适浓度应是多少? 为此, 我们选择了降解程度具有一定代表性的 4 号样品, 以 7 号引物研究模板浓度 10~2968 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 变化范围内对 RAPD 结果的影响, 结果(图 1, 表 2)表明, 随着 DNA 模板浓度的增大, 有些带呈现从微弱到显著的变化过程, 在 1855 和 2968 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的高模板浓度时, 非专一产物还形成背景, 说明在比较多态性时选择适当的模板浓度范围非常重要: 首先在这个浓度范围内要有稳定的特征性条带, 其次这个浓度范围要比较宽, 以便于不同样品之间在模板浓度上的统一。根据这两个原则, 细辛类药材的 DNA 模板浓度以 148~742 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 之间为宜。

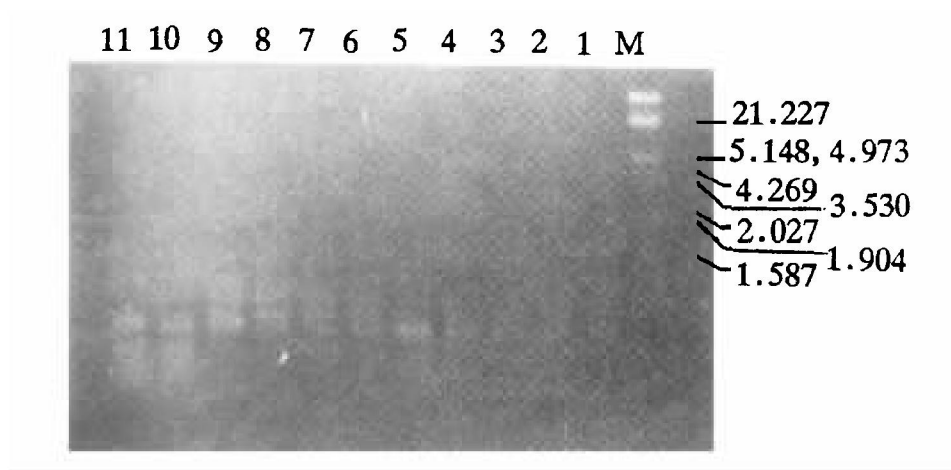


Fig 1 Agarose gel electrophoresis of RAPD products of different concentration of DNA template (Letter codes refer to Tab 1) from No. 4 crude drug sample amplified by primer 7 Lane M: Lambda DNA/EcoR I + Hind III markers.

Tab 2 RAPD products of different concentrations of No. 4 sample amplified by primer 7

No.	Concentration /mg·L ⁻¹	Efficiency	
		Characteristic band number	+(-)*
1	10	1	+
2	26	1	+
3	52	1	++
4	104	1	++
5	123	2	+,-
6	148	2	+,+
7	223	2	+,+
8	371	2	+,+
9	742	2	+,+
10	1855	2	+,-
11	2968	2	+,-

* +(-) indicating one band is strong (weak).

2 合适引物的筛选 RAPD 方法用于药材鉴

别中除要求引物能使扩增结果具多态性之外, 扩增条带的大小(分子量)尚要适中。对于新鲜材料扩增条带过大的引物不适合药材鉴定, 因为药材降解后的 DNA 片段的大小虽比化石的 100~400 bp^[5]要大得多, 但绝大多数集中在 200 bp~2 kb 之间(图 2), 这使得其扩增产物的大小不可能超过模板 DNA 片段的大小; 最近报道^[6,7]药材扩增产物大小在 450 bp~1.5 kb 之间, 而一般 RAPD 产物的分子量基本上均在 200 bp~2.6 kb 范围内^[8,9]。据此, 我们在要求扩增结果具多态性的基础上, 制定了选择引物的两个原则, 首先是扩增产物具 3 条以上清晰稳定的条带, 其次扩增产物片段均比 1.5 kb 小。我们筛选了 10 个引物(引物序列见表 3), 从中选出 1 号, 2 号, 6 号, 7 号等 4 个引物(结果见图 3 和表 3)。

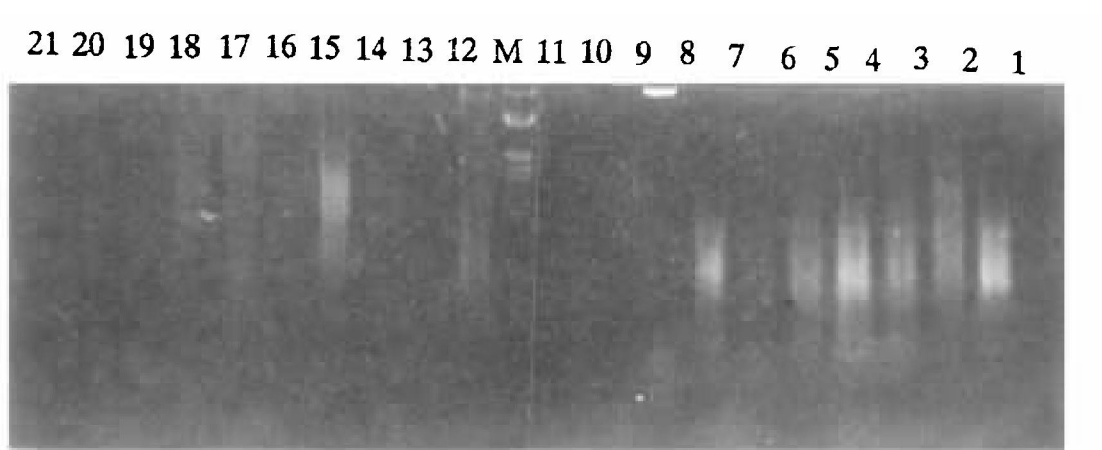


Fig 2 Agarose gel electrophoresis of DNA template extracted from No. 1 to No. 21 crude drug sample (Letter codes refer to Tab 1) Lane M: Lambda DNA/EcoR I + Hind III markers.

Tab 3 The sequences of the primers and RAPD products of No. 4 sample

Primer No.	Sequence 5'→3'	Efficiency	
		Band number	Size
1	TCGGCGATAG	3	<1.5 Kb
2	CAAACGTCGG	3	<1.5 Kb
3	AGGGGTCTTG	2	<1.5 Kb
4	GTGACGTAGG	5	>1.5 Kb
5	AATCGGGCTG	2	<1.5 Kb
6	GGGTAACGCC	3	<1.5 Kb
7	CAGGCCCTTC	6	<1.5 Kb
8	CAGCACCCAC	3	<1.5 Kb
9	ACTCAGCCAC	3	<1.5 Kb
10	TGCCGAGCTG	3	<1.5 Kb



Fig 3 Agarose gel electrophoresis of RAPD products of No. 4 crude drug sample amplified by No. 1 to No. 10 primer (Letter codes refer to Tab 1) Lane M: 100 bp DNA ladder.

3 DNA 模板的降解和不同产地药材对 RAPD 结果的影响 模板的一般程度降解(绝大部分大于 10 kb)不影响扩增结果,若模板严重降解(大部分分子均小于 10 kb),高分子量产物的差异可能为假象^[2]。药材 DNA 模板的降解程度是非常严重的,我们随机选择了采自不同时间和产地的辽细辛药材,最早为 1978 年采,距今有 19 年,它们的贮藏条件是室温放置,药材颜色为灰黄色,深浅不一,从图 2 中也可看出不同采集时间的药材 DNA 模板的降解程度不仅严重,而且也非常不一致,其中 78 年采的 1 号样品没有可见的 DNA 存在,扩增结果表明这些药材的 DNA 图谱并不完全相同,如同为辽细辛的 1~5 号样品的 1 号、2 号、7 号样品 DNA 图谱就有明显的不同,这表明用 1~2 个引物来鉴别药材是不可靠的;再如用 1 号引物扩增时,12 号样品就出现了与正品细辛 2~4 号样品相

同的 DNA 图谱,而 6 号待鉴定药材的图谱与其它样品却有 1 条明显不同的条带。但综合 4 个引物的扩增结果(图 4),采用聚类分析的方法,其鉴别就显得非常有意义,这从另一个角度说明,这些 DNA 模板降解程度不一和不同产地的样品能起到对照组的作用,从而解决药材鉴定中因 DNA 模板降解和不同产地对 RAPD 结果造成影响这一难点。

4 RAPD 方法在药材鉴别中的适用范围

RAPD 方法在系统学中的适用范围,在早期有着不同的看法,为此不少学者进行了研究,如 Thormam^[10]和 Smith^[11]等人。目前一般都认为 RAPD 方法主要用于种内不同居群间亲缘关系的研究,也可以应用于种间乃至近缘属之间的亲缘关系的研究,但有一定的局限性。因为不同种或属的扩增产物即使有相同的迁移率,但其碱基组成(序列)不一定一致,亲缘关系越远,其碱基组成(序列)差异也就越大。药材的伪品很多是来自亲缘关系很远的属甚至不同科,因此,我们在实验中特地选取了与细辛(马兜铃科)亲缘关系非常远的菊科艾叶作对照。1 号、6 号引物的结果表明,如只通过表征分析,就会得出错误的判断,也再一次说明仅用 1~2 个引物进行鉴别是不可靠的。因此,RAPD 用于药材鉴别的适用范围是值得注意的,一般用于同属真伪(混淆品)药材的鉴别比较可靠。

5 RAPD 方法鉴别细辛类药材及研究中存在的一些问题

5.1 药材真伪问题 《中国药典》规定细辛的来源为华细辛、辽细辛和汉城细辛的干燥全草,但本属不少种类都能药用,混乱现象严重,很多学者对此从药材性状和显微鉴定等方面做了深入细致的研究,但对破碎或粉末药材仍不能很好解决。为此,我们采用了 RAPD 方法,并针对上述问题,设计了用干、鲜药材等一系列样品作对照组,结果共检测到 36 个位点,将迁移率相同的带作为同源位点处理,得到 1/0 数据(有计为 1,无计为 0)矩阵,按刘晓民等^[12]方法计算任意 2 个样品间的相似系数(s)并得相似关系矩阵。将该矩阵取不同的 λ 值($\lambda \in [0, 1]$)作

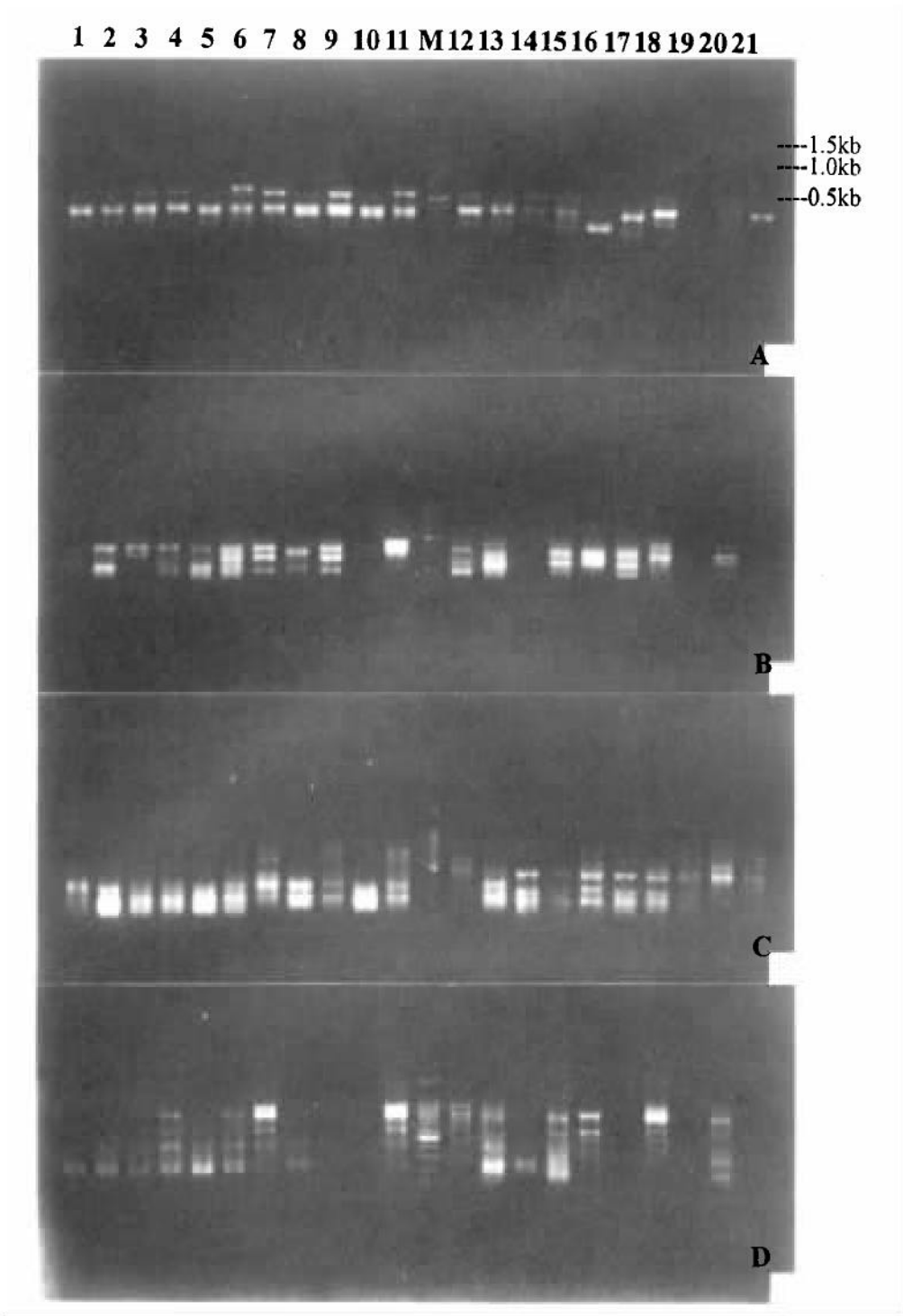


Fig 4 Agarose gel electrophoresis of No. 1 to No. 21 crude drug sample (Letter codes refer to Tab 1) amplified by primer 1,2,6,7 (A. primer 1, B. primer 2, C. primer 6, D. primer 7) Lane M: 100 bp DNA ladder.

不同的 λ -截矩阵,采用编网法聚类^[13],得树系图(图 5)。结果表明辽细辛、华细辛、汉城细辛等正品细辛的干、鲜药材的相似系数明显高于同属非正品药材,把购自针灸所药房待鉴定的细辛类药材归为正品,这与杨春澍教授鉴定为

大部分为辽细辛,混有少量华细辛的结果一致。
5.2 干、鲜药材的问题 由于药材中的 DNA 模板有不同程度的降解,正如前面在引物筛选中所分析的,使得一些 DNA 大分子量的片段不能扩增出来,从而有可能影响了干、鲜药材在

分析时的相似系数,如辽细辛、华细辛、汉城细辛的干、鲜药材的关系。虽然如此,但干、鲜正品药材的相似系数还是明显高于同属干、鲜混淆品的相似系数。

5.3 重复和污染问题 对上述实验进行重复实验,结果稳定,空白对照表明本实验条件无明显污染。

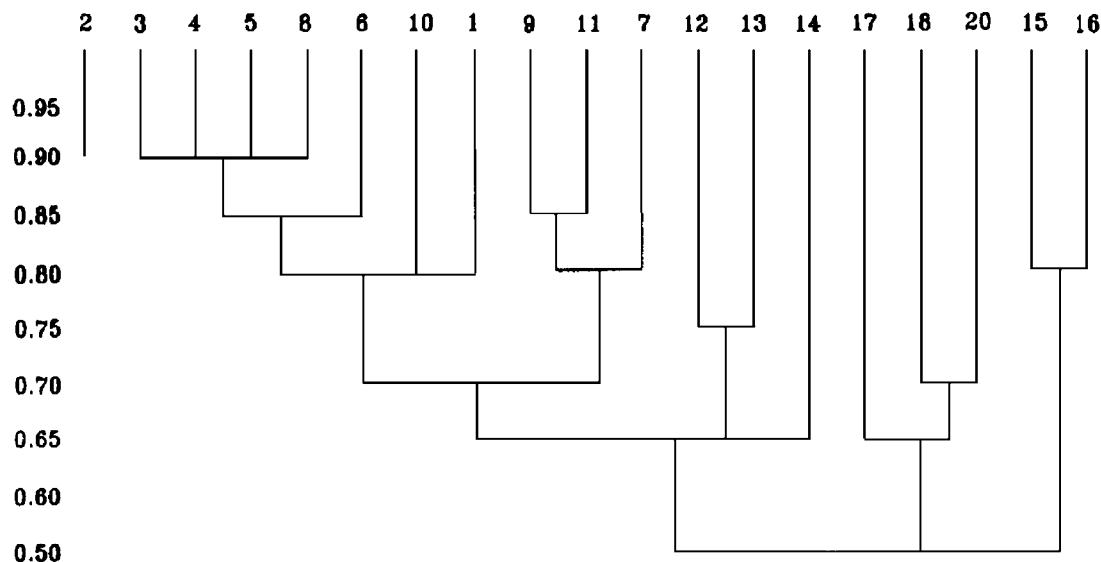


Fig 5 Cluster analysis tree of the samples.

参 考 文 献

- 1 李萍,徐国钧,徐珞珊. 21世纪生药学的研究展望. 中国药学杂志, 1997, **32**:513
- 2 汪小全,邹喻莘,张大明,等. RAPD应用于遗传多样性和系统学研究中的问题. 植物学报, 1996, **38**:954
- 3 Doves KM, Gale MD. The use of random amplified polymorphic DNA markers in wheat. *Theor Appl Genet*, 1992, **84**:567
- 4 Ellsworth DL, Rittenhouse KD, Honeycutt RL. Artifactual variation in randomly amplified polymorphic DNA banding patterns. *Biotechniques*, 1993, **14**:214
- 5 Hillis DM, Moritz C, Mable BK. *Molecular Systematics* (Second Edition). Sunderland, Massachusetts USA Sinauer Associates, Inc. 1996:220
- 6 张荣,张步振,叶浩. 用 RAPD 分析法鉴定木蓝属生药. 中国中药杂志, 1997, **22**:72
- 7 王义全,周开亚. 蛇类药材分子遗传标记鉴别的初步研究. 药学学报, 1997, **32**:384
- 8 Wilkie SE, Isaac PG, Slater RJ. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers for genetic analysis in *Allium*. *Theor Appl Genet*, 1993, **86**:497
- 9 卢江. 随机放大多态性 DNA(RAPD)——一种新的分子遗传标记技术. 植物学报, 1993, **35**:119
- 10 Thormann CE, Ferreira ME, Camargo LEA, *et al.* Comparison of RFLP and RAPD markers to estimating genetic relationships within and among cruciferous species. *Theor Appl Genet*, 1994, **88**:973
- 11 Smith JJ, Scott Craig JS, Leadbetter JR, *et al.* Characterization of random amplified polymorphic DNA (RAPD) products from *Xanthomonas Campestris* and some comments on the use of RAPD products in phylogenetic analysis. *Mol Phylogen Evol*, 1994, **3**:135
- 12 刘晓民,孙红祥,曾宪武. 聚类分析法在麦冬类药材化学分类中的应用. 中国中药杂志, 1993, **18**:585
- 13 张福良. 聚类分析与中药质量研究. 北京:人民卫生出版社, 1994:112

PROBLEMS AND SOLUTIONS IN THE USE OF RAPD TO THE IDENTIFICATION OF THE CHINESE DRUGS “XI-XIN” (HERBA ASARI) AND ITS SUBSTITUTES

Huang Luqi(Huang LQ), Wang Min(Wang M), Zhou Changzheng(Zhou CZ)*,
Li Nianhua(Li NH)** , He Xirong(He XR) and Yang Bin(Yang B)

*(Institute of Chinese Material Medica, Academy of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100700; * Beijing University of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100029; ** Institute of Botany, Academia Sinica, Beijing 100044)*

ABSTRACT The use of random amplified polymorphic DNAs (RAPD) on the identification of crude drugs has a few special problems, e. g., the influence of the degree of degradation of DNA templates on the amplified products, the reliability of results by one or two primers and the application range of RAPD, etc., so the problems were discussed through researches on Herba Asari.

In this experiment, the DNA of twenty-one samples from different locations and collected at different time were extracted. The suitable concentrations of DNA templates and the suitable primers were selected. After this, the DNA of these samples were amplified by RAPD. The results showed that the concentration and the degree of degradation of DNA templates, and the different sources of crude drugs affected the result of RAPD assay. Some suggestions were made to solve these problems, such as the selection of DNA templates concentration, the screening of suitable primers, and the use of contrast groups and cluster analysis. Furthermore, the application range of RAPD to the identification of crude drugs was discussed. All of these will provide the guide to the use of RAPD for the identification of crude drugs.

KEY WORDS Random amplified polymorphic DNAs; Herba asari