



药用淫羊藿品种的分子鉴定研究 ——朝鲜淫羊藿的位点特异性 PCR 鉴定

王川易¹, 梁云², 郭宝林^{1*}, 肖培根¹

(1. 中国医学科学院北京协和医学院药用植物研究所, 北京 100193;

2. 大连市药品检验所, 辽宁大连 116021)

[摘要] 目的:建立朝鲜淫羊藿的位点特异性 PCR 鉴定方法,用于朝鲜淫羊藿来源鉴定和药材质量控制。方法:依据自己测得和来自于 GenBank 主要药用淫羊藿种的核糖体基因组 ITS 序列,比对分析寻找朝鲜淫羊藿区别于其他种的变异位点,并根据这些变异位点设计专属性的 PCR 鉴定引物对植物样本进行扩增,并用药材饮片进行验证。结果:本研究获得了 2 对朝鲜淫羊藿特异性鉴定引物,能够区别朝鲜淫羊藿与其他药用品种,本方法适用于淫羊藿药材和饮片。

[关键词] 鉴定;朝鲜淫羊藿;位点特异性 PCR

淫羊藿是药典中规定来源最多的药材之一,来源于淫羊藿 *Epimedium brevipornu* Maxim.、箭叶淫羊藿 *E. sagittatum* (Sieb. et Zucc.) Maxim.、柔毛淫羊藿 *E. pubescens* Maxim.、朝鲜淫羊藿 *E. koreanum* Nakai 和巫山淫羊藿 *E. wushanense* T. S. Ying 等 5 个种;《贵州省中药材、民族药材标准》收录了黔产淫羊藿中资源较大的几个种:粗毛淫羊藿 *E. acuminatum* Franch.、天平山淫羊藿 *E. myrianthum* Stearn 和黔岭淫羊藿 *E. leptorrhizum* Stearn 等,这 8 个种构成了中药淫羊藿使用的主要资源种类^[1]。本课题组新近对药材和饮片市场的调查也证实了这一点^[2],但是来源不同的淫羊藿物种中主要有效成分的含量存在较大的差异^[1,3]。这是淫羊藿药材质量控制的主要问题所在,因此确定药材的来源植物显得尤为重要。传统鉴定方法可以依据的特征有限,或者非常依赖于一定的知识和经验,或者不能将这些物种有效鉴定,新的鉴定方法一直被关注和研发。

Sun Yue^[4]等测定了淫羊藿 5S rDNA 间隔区序列,并建议用于淫羊藿药典品种的鉴定,但是序列的直接比对受到碱基错配的影响,而且在没有考察足够样本的情况下,方法的价值和可用性尚待评估。早期 Rie Nakai^[5]等曾用 RAPD 分子标记的方法区

别淫羊藿物种,但是这类分子标记方法对实验条件敏感,结果的重现性差,因此也不是一种可靠的鉴定方法。

位点特异性 PCR 鉴定的方法被成功用于兰科多种药材^[6-9]、紫苏属药用品种^[10]、白花蛇舌草^[11]等多种药材的来源植物鉴定。该方法是通过寻找被鉴定药材的特异性位点,设计出只扩增该药材(物种)特定片段的高度特异性鉴别引物,经 PCR 扩增和电泳检测就可以达到准确鉴定的目的,被认为在中药材鉴定中有广泛的应用前景^[12]。

淫羊藿药材的掺伪情况比较少见,药材鉴定的重点在于确认其同属来源植物,因此本实验的研究对象集中在最常药用的 8 个种上,通过比较 GenBank 收录的,以及本课题组自己测序得到的药用淫羊藿各个种的 ITS 序列,找到了朝鲜淫羊藿区别于其他种的变异位点,设计了位点特异性的 PCR 扩增的引物,并建立了 PCR 扩增鉴定朝鲜淫羊藿的方法。

1 材料

MyGene™ Series Peltier Thermal Cycler (杭州朗基科技有限公司)、TG16-W 微量高速离心机(长沙湘仪离心机仪器有限公司)、JY300 型电泳仪(北京君意东方电泳设备有限公司)、Bio-Rad 凝胶紫外成像系统(美国伯乐公司)、植物基因组 DNA 提取试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司]、Easy Taq (北京全式金生物技术有限公司)、dNTPs (北京全式金生物技术有限公司)、引物(北京奥科生物技术

[稿件编号] 20100117002

[通信作者] *郭宝林,研究员,主要从事药用植物资源的分类、鉴定和药材质量控制研究, Tel/Fax: (010) 62895049, E-mail: guobaolin010@yahoo.com.cn



有限公司)。

所有材料均由郭宝林研究员收集和鉴定,植物材料为采集新鲜叶片硅胶快速干燥固定,凭证标本保存于中国医学科学院药用植物研究所标本馆(IMD)(表 1)。表 1 之外的其他植物样品还包括:粗毛淫羊藿 0601,0615;黔岭淫羊藿 0511;箭叶淫羊藿 0501,0502,0507,0508,0509,0510,0514;柔毛淫羊藿 0535,0538,0605,0606;淫羊藿 0552,0553;天平山淫羊藿 0317,0323,0324,0334;药材样品为从河北、安徽、天津、山西、内蒙古、浙江和贵州等地购买的淫羊藿生饮片和羊油炙饮片,共 8 份,编号为 2008A-1,2008A-6,2008A-7,2008A-8,2008BZ-1,2008T-1,2008Y-31,2008Y-41。

表 1 淫羊藿样品信息

种名	样品编号	凭证标本号	采集地
朝鲜淫羊藿	0565	B. L. GUO 0565	吉林吉安
	0703	B. L. GUO 0703	吉林通化
粗毛淫羊藿	0305	B. L. GUO 0305	贵州安龙
	0617	B. L. GUO 0617	四川屏山
黔岭淫羊藿	0321	B. L. GUO 0321	贵州贵阳
	0427	B. L. GUO 0427	湖北利川
箭叶淫羊藿	0403	B. L. GUO 0403	湖南新宁
	0516	B. L. GUO 0516	广东连州
柔毛淫羊藿	0456	B. L. GUO 0456	陕西南郑
	0616	B. L. GUO 0616	四川洪雅
巫山淫羊藿	0434	B. L. GUO 0434	湖北巴东
	0524	B. L. GUO 0524	四川巴中
淫羊藿	0555	B. L. GUO 0555	河南灵宝
	0557	B. L. GUO 0557	陕西太白
天平山淫羊藿	0421	B. L. GUO 0421	湖南桑植
	0517	B. L. GUO 0517	广西柳江

2 方法

2.1 寻找种内稳定的变异位点 从 GenBank 上获得 8 个种核基因组的 ITS 序列,并用 MEGA4 软件对序列进行比对分析,寻找变异位点。ITS 序列比对是基于多个样本进行,变异位点比较稳定可靠。朝鲜淫羊藿一共有 3 条序列,3 个序列在 412,426,599 bp 处分别为 T,C 和 C,区别于其他物种(表 2)。

2.2 特异性鉴定引物的设计 基于比对得到的变异碱基位点,使用 Oligo 6.0 设计鉴定引物(表 3)。上游引物(kor-aF 和 kor-bF)为 8 个种都共有的一段序列,位于比对后序列的 25~45 bp,2 个引物序列长度有 3 bp 的差异,因此在 T_m 值上有差别;根据

表 2 用于比对的 ITS 序列

种名	GenBank 登录号
朝鲜淫羊藿	DQ851476,L75875,EU525855 ¹⁾
黔岭淫羊藿	DQ851472,AY362419,EU525856 ¹⁾
巫山淫羊藿	DQ851471,AY362421
淫羊藿	DQ851466,AY362429,EU525858 ¹⁾
箭叶淫羊藿	DQ851460,AY362427,EU525860 ¹⁾
粗毛淫羊藿	AY362423,EU525862 ¹⁾
柔毛淫羊藿	DQ851449,AY362416,EU525865 ¹⁾ ,AF328970
天平山淫羊藿	DQ851455

注:¹⁾表示该序列为本实验室测序上传。

412,426 bp 朝鲜淫羊藿特异位点 T 和 C 设计下游引物(kor-aR,kor-bR 和 kor-cR),3 条下游引物序列的 3'端为特异性碱基 A,同时在 3'端第 3 个碱基位置引入错配碱基 C,其中 kor-aR 同时还在 3'端第 4 个碱基位置引入错配碱基,kor-cR 则较另外 2 个引物少 3 个碱基,其 T_m 值相应较低。

表 3 鉴定引物信息

引物名称	引物序列	T_m
kor-aF	CAGCGAAGTTGTGAAAAACAC	55.9
kor-bF	CGAAGTTGTGAAAAACAC	50
kor-aR	CGATAAGAGAACAAAGGCCTA	55.9
kor-bR	CGATAAGAGAACAAAGGGCTA	55.9
kor-cR	TAAGAGAACAAAGGCCTA	50

注:F 表示上游引物,R 表示下游引物。

2.3 基因组 DNA 的提取 用天根生化科技(北京)有限公司的植物基因组 DNA 提取试剂盒提取硅胶干燥的叶片材料的基因组 DNA,操作方法参照试剂盒说明书。

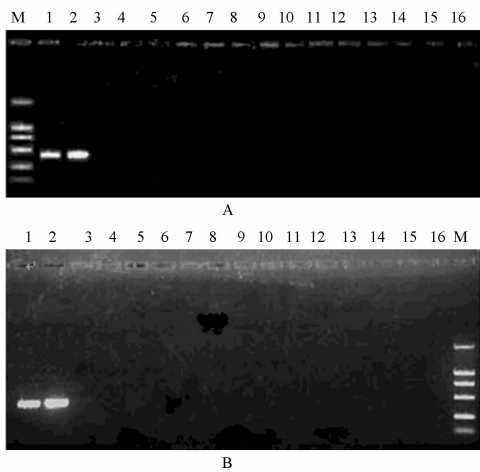
2.4 鉴定引物的筛选 将上下游引物随机组合,用于 PCR 扩增。反应体积 25 μ L,其中模版 DNA 约 30 ng,Easy Taq 1.5 U,浓度为 2.5 mmol \cdot L⁻¹的 dNTPs 0.8 μ L,2 mmol \cdot L⁻¹的上下游引物各 2 μ L。扩增程序为:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,50 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,共 30 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。首先用被鉴定种的 1 个样本,初步筛选出能够扩增的引物组合,再扩大样本量和其他种的样本,以检测所挑选出的引物组合是否能特异性扩增。并通过梯度 PCR 和递减 PCR 等方式对扩增程序进行调整,以得到最佳的扩增程序。

2.5 鉴定引物的检测 用筛选出来的鉴定引物,对大量植物样本及市场上购买饮片在优化后的反应程

序和扩增程序下进行鉴定性扩增。

3 结果

最终筛选出 2 对引物 kor-bF / kor-bR 和 kor-aF/kor-bR 能用于朝鲜淫羊藿的位点特异性 PCR 鉴定,得到长度约为 400 bp 的扩增产物,而其他种淫羊藿不能被扩增(图 1)。优化后的 PCR 反应体系为 25 μ L: 10 \times Easy Taq buffer 2.5 μ L, dNTP (各 2.5 mmol \cdot L⁻¹) 1.6 μ L, Easy Taq polymerase 1.5 U, 引物 (2 μ mol \cdot L⁻¹) 各 2 μ L, 模版 DNA 1 μ L (约 30 ng)。PCR 反应程序为: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 每个循环降 2 $^{\circ}$ C, 从 62 $^{\circ}$ C 到 50 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 共 7 个循环; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 50 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 共 23 个循环; 72 $^{\circ}$ C 5 min。并用市场上购买到的朝鲜淫羊藿药材对该鉴定条件进行验证(图 2), 最终结果表明用这 2 对鉴定引物能够有效的将朝鲜淫羊藿与其他 7 种药用淫羊藿品种区分开。



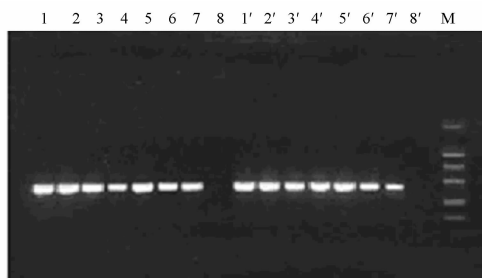
A. Kor-bF / Kor-bR; B. Kor-aF / Kor-bR; 1 ~ 16. 0565, 0703, 0305, 0617, 0321, 0427, 0403, 0516, 0456, 0616, 0434, 0524, 0555, 0557, 0421, 0517; M. DL2 000 DNA marker.

图 1 2 对朝鲜淫羊藿位点特异性 PCR 扩增引物的部分样品扩增

4 讨论

本研究中参考的 ITS 序列来自于不同研究人员的结果,变异位点稳定存在,排除了扩增和测序过程中因碱基错配带来的误差,以及种下的变异,因此设计鉴定性引物所依据的变异位点是可靠的。

根据 Stearn 建立的淫羊藿属下分类系统中^[15], 朝鲜淫羊藿在 Sect. Macroceras 下,而中国境内分布



1 和 1'. 2008A-2; 2 和 2'. 2008A-6; 3 和 3'. 2008A-7; 4 和 4'. 2008A-8; 5 和 5'. 2008BZ-1; 6 和 6'. 2008T-1; 7 和 7'. 2008Y-31; 8 和 8'. 2008Y-41; M. DL2000 DNA marker; 1 ~ 8. kor-bF / kor-bR; 1' ~ 8'. kor-aF / kor-bR.

图 2 2 对朝鲜淫羊藿鉴定引物在 8 份市售淫羊藿药材中 PCR 扩增

的其他淫羊藿种则组成了 Sect. Diphyllon, 相对于中国的其他种之间比较复杂的关系,朝鲜淫羊藿能够比较容易地和其他种区别开来^[13], 本实验中设计并筛选出 2 对引物组合可以有效地扩增朝鲜淫羊藿, 得到 1 个长度为 400 bp 的产物, 而其他 7 个种的样品都不能被扩增。

从市场上购买的 8 份淫羊藿药材, 经过形态和显微鉴定有 7 个为朝鲜淫羊藿, 样品 2008Y-41 则是容易与朝鲜淫羊藿混同的淫羊藿 *E. brevicornu*, 用引物进行鉴别, 除 2008Y-41 外, 其他 7 份能扩增得到长度为 400 bp 的条带。为确定 2008Y-41 的来源植物不是朝鲜淫羊藿, 用引物 ITS-5afwd (5'-CCTTAT-CATTTAGAGGAAGGAG-3') 和 ITS-4rev (5'-TCCTC-CGCTTATTGATATGC-3')^[16] 对 2008Y-41 样本的 ITS 序列进行扩增, 并用引物 ITS-4rev 对 PCR 产物进行测序, 测得序列与淫羊藿 *E. brevicornu* 的一致 (GenBank 登录号 DQ851466, AY362429, EU525858), 并提交 GenBank (登录号 GU644352), 序列比对显示 2008Y-41 的 ITS 序列上没有朝鲜淫羊藿的特异性变异位点, 表明 2008Y-41 的来源植物不是朝鲜淫羊藿。证实本研究建立的方法适合于淫羊藿药材和饮片。

淫羊藿属中国分布种之间的亲源关系很混乱, 杂交是物种起源的主要方式, 从而导致了分类上的困难。而且大多数物种形成时间较近, 序列变异较小, 目前依据已经研究过的核基因组的 ITS, 5S rDNA 间隔区, 叶绿体基因组的 atpB-rbcL, trnL-F 间隔区序列, 线粒体的 nad1 第 2 内含子序列来看, 还不



能将中国的种间关系梳理清楚,也难以找到种内稳定的序列位点。

[参考文献]

[1] 郭宝林,肖培根. 中药淫羊藿主要品种评述[J]. 中国中药杂志,2003,28(4):303.
[2] 郭宝林,黄文华,孙娥,等. 淫羊藿药材和饮片市场调查报告[J]. 中国中药杂志,2010,35(13):1682.
[3] 裴利宽,黄文华,何天谷,等. 中药淫羊藿主要资源种类药材质量的系统研究[J]. 中国中药杂志,2007,32(21):2217.
[4] Sun Y, Fung K P, Leung P C, et al. Characterization of medicinal *Epimedium species* by 5S rRNA gene spacer sequencing[J]. *Planta Med*,2004,70:287.
[5] Nakai R, Shoyama Y, Shiraiishi S. Genetic characterization of *Epimedium species* using random amplified polymorphic DNA (RAPD) and PCR-restriction fragment length polymorphism (RFLP) diagnosis[J]. *Biol Pharm Bull*, 1996,19:67.
[6] 丁小余,徐璐珊,常俊,等. 兜唇石斛的位点特异性 PCR 鉴别[J]. 南京师大学报:自然科学版,2002,25(4):71.
[7] 丁小余,徐璐珊,王峥涛,等. 齿瓣石斛的位点特异性 PCR 鉴定[J]. 药学报,2002,37(11):897.
[8] 应依,徐红,王峥涛. 球花石斛的位点特异性 PCR 鉴别研究[J]. 药学报,2007,42(1):98.
[9] Ding X Y, Wang Z T, Zhou K Y, et al. Allele-specific primers

for diagnostic PCR authentication of *Dendrobium officinale* [J]. *Planta Med*,2003,69:587.
[10] 罗玉明,张卫明,丁小余,等. 紫苏属药用植物的 rDNA ITS 区 SNP 分子标记与位点特异性 PCR 鉴别[J]. 药学报,2006,41(9):840.
[11] 刘忠权,郝明干,王加连. 应用位点特异性引物鉴定白花蛇舌草[J]. 中药材,2004,27(7):484.
[12] 刘忠权,周材权,王义权,等. 分子遗传标记技术在中药材鉴定中的应用[J]. 世界科学技术——中药现代化,2001,3(5):26.
[13] Sun Y, Fung K P, Leung P C, et al. A phylogenetic analysis of *Epimedium* (Berberidaceae) based on nuclear ribosomal DNA sequences [J]. *Mol Phylogenet Evol*, 2005,35:287.
[14] 徐艳琴,李作洲,张学军,等. 三种药用淫羊藿的地理分布与资源调查[J]. 武汉植物学研究,2008,26(1):91.
[15] Stearn W T. The Genus *Epimedium* and other herbaceous *Berberidaceae* including the genus *Podophyllum* [M]. Oregon: Timber Press, 2002.
[16] Sass C, Little D P, Stevenson D W, et al. DNA barcoding in the Cycadales: testing the potential of proposed barcoding markers for species identification of cycads[J]. *PLoS ONE*, 2007,2(11):e1154. S.

Molecular authentication of medicinal *Epimedium species*——A case of diagnostic PCR authentication of *Epimedium koreanum*

WANG Chuanyi¹, LIANG Yun², GUO Baolin^{1*}, XIAO Peigen¹

(1. Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College Institute of Medicinal Plant Development, Beijing 100094, China;

2. Dalian Institute for Drug Control, Dalian 116021, China)

[Abstract] **Objective:** To establish the allele-specific diagnostic PCR methods for *Epimedium koreanum*. **Method:** ITS of eight medicinal *Epimedium species* were sequenced and downloaded from GenBank, and aligned to find the specific sites in *E. koreanum*. The diagnostic primers were designed based on the sites, and used to amplify all the samples, then verified with the crude drugs and decoction pieces from market. **Result and Conclusion:** Two pairs of allele-specific diagnostic primers were successfully used to identify *E. koreanum* from other medicinal species, and also can be used to identify the crude drugs and decoction pieces.

[Key words] authentication; *Epimedium koreanum*; allele-specific diagnostic PCR

doi: 10.4268/cjcm20101404

[责任编辑 吕冬梅]