

# 基于 RAPD 标记的 SCAR 分子标记技术 鉴定川牛膝及其混淆品

田孟良<sup>1</sup>, 官宇<sup>1</sup>, 刘帆<sup>1</sup>, 袁继超<sup>1</sup>, 杨华<sup>2\*</sup>

(1. 四川农业大学 农学院, 四川 雅安 625014; 2. 四川农业大学 科技管理处, 四川 雅安 625014)

**[摘要]** 目的: 基于 RAPD 标记开发 SCAR 标记, 为川牛膝及其混淆品鉴定提供有效方法。方法: 建立了收集于四川天全、宝兴、会理、金口河等地的 19 个牛膝种群(包括川牛膝及其混淆品红牛膝、怀牛膝)的 RAPD 指纹图谱, 从中找到能有效区分上述材料的多态性谱带 F300, F500 进行克隆与测序; 根据测序结果设计 2 对特异引物对 19 份材料进行 PCR 扩增。结果: 引物 SC-320 能稳定地区分川牛膝与怀牛膝, 引物 SC-495 则能稳定地区分川牛膝与红牛膝, 2 对引物结合能快速准确地鉴定川牛膝、红牛膝和怀牛膝。结论: 建立了鉴定川牛膝及其混淆品的 SCAR 标记技术体系。

**[关键词]** 川牛膝; 混淆品; RAPD 标记; SCAR 标记

川牛膝 *Radix Cyathule* 为苋科 *Amaranthaceae* 植物川牛膝 *Cyathula officinalis* Kuan. 的干燥根, 微苦, 性平, 具逐瘀通经, 通利关节, 利尿通淋的功效, 是著名川产道地药材之一, 以四川天全、宝兴和乐山金口河产量最大, 天全产者品质最佳<sup>[1]</sup>。目前产区以头花怀苋 *C. capitata* 的根作为商品川牛膝, 俗称红牛膝, 实为川牛膝伪品<sup>[2]</sup>。此外, 在临床中药处方中医务人员及患者常将川牛膝与怀牛膝(基原植物为 *A. bidentata* Bl.) 混用。川牛膝、红牛膝和怀牛膝在药材外观上非常相似, 准确鉴定川牛膝、红牛膝和怀牛膝有利于在生产中对品种正本清源、在医疗上准确用药。

RAPD 技术近年来在中药材种质资源遗传多样性研究、中药混淆品代用品鉴定、多来源中药鉴定、名贵中药鉴定、道地中药鉴定等方面得到了广泛应用。但由于 RAPD 标记技术假阳性高、稳定性和重复性差等缺陷, 常常使得研究结果无法作为有效的标记保存下来并用于中草药分类鉴定、筛选育种与质量检验。将原 RAPD 片段转化为 SCAR 标记, 就能有效地克服 RAPD 重复性欠佳的弱点。目前 SCAR 标记技术已在人参、卡瓦胡椒、甘草、黄芪等

药用植物中得到应用<sup>[3-6]</sup>, 但川牛膝及其混淆品鉴别的相关研究尚未见报道。

本研究拟采用 RAPD 标记技术对来源不同的川牛膝及其混淆品红牛膝和怀牛膝进行多态性分析, 将获得的特异 RAPD 标记转化为 SCAR 标记, 为快速准确地鉴定川牛膝提供稳定高效的新方法。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 2006 年 11 月—2007 年 2 月分别从四川天全、西昌、宝兴、乐山等地收集牛膝种群 19 个, 其中川牛膝种群 12 个, 红牛膝种群 5 个, 怀牛膝种群 2 个, 各种群采集地见表 1。每个种群分别收集三年生种子, 集中种植于四川省雅安市二郎山牛膝 GAP 基地。2008 年 5 月从每个二年生种群中随机选择 10 株新发幼苗植株, 取适量叶片混合后加液氮研磨至粉末, 采用改良 CTAB 法提取基因组 DNA。

**1.2 RAPD 标记扩增** 用随机引物对供试材料基因组 DNA 进行 PCR 扩增。反应体系为 DNA (50 mg · L<sup>-1</sup>) 0.9 μL, *Taq* Buffer (10 ×; Mg<sup>2+</sup>-free) 2 μL, MgCl<sub>2</sub> (25 mmol · L<sup>-1</sup>) 1.2 μL, dNTPMix (10 mmol · L<sup>-1</sup> each) 1 μL, 引物 (10 pmol · L<sup>-1</sup>) 0.5 μL, *Taq* 酶 (5 U · μL<sup>-1</sup>) 0.3 μL, 加入 ddH<sub>2</sub>O 补齐到 20 μL。PCR 扩增程序为: 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 1 min, 37 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 2 min, 共 5 个循环; 94 °C 变性 10 s, 37 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 2 min, 共 40 个循环; 72 °C 延伸 10 min。反应结束后 PCR 产物在 1.5% 琼脂糖凝胶 5 V · cm<sup>-1</sup> 的电压下电泳 3 h 左右, 然后在凝胶成像系统中观察照相。

**[收稿日期]** 2009-09-11

**[基金项目]** 国家科技支撑计划项目(2006BAI06A12-02)

**[通信作者]** \* 杨华, 主要从事作物遗传育种研究, E-mail: yanghua-001@sohu.com

**[作者简介]** 田孟良, 博士, 副教授, 主要从事中药材育种和生物技术研究, E-mail: secondat@qq.com

表 1 供试种群及来源

No.	类型	采集地点	海拔/m
1	川牛膝	天全	1 200
2	川牛膝	天全	1 400
3	川牛膝	天全	1 000
4	川牛膝	天全	1 500
5	川牛膝	宝兴	1 500
6	川牛膝	天全	1 500
7	红牛膝	乐山	1 700
8	川牛膝	西昌	1 700
9	川牛膝	天全	1 300
10	川牛膝	天全	1 300
11	川牛膝	天全	1 000
12	红牛膝	天全	1 300
13	川牛膝	乐山	1 700
14	红牛膝	宝兴	1 600
15	红牛膝	宝兴	1 600
16	川牛膝	宝兴	1 600
17	怀牛膝	汉源	1 400
18	怀牛膝	会理	1 200
19	红牛膝	会理	1 300

到 23 个条带清晰、多态性好的随机引物对 19 份材料基因组 DNA 进行 PCR 扩增,并基于扩增结果进行聚类分析,将 19 份材料聚为 3 类:第 I 类为川牛膝,第 II 类为红牛膝,第 III 类为怀牛膝,见图 1,表明 RAPD 标记能有效区分不同类型材料。进一步筛选发现,引物 s99 能在相对分子质量 300 bp 左右处扩增出特异性条带,将 I, II 和 III 区分开来,其扩增条带命名为 F300;引物 s278 则能在 500 bp 左右处扩增出特异性条带,将 I, II 区分开来,其扩增条带命名 F500,见图 2。

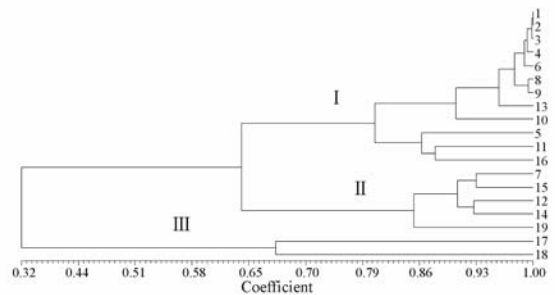


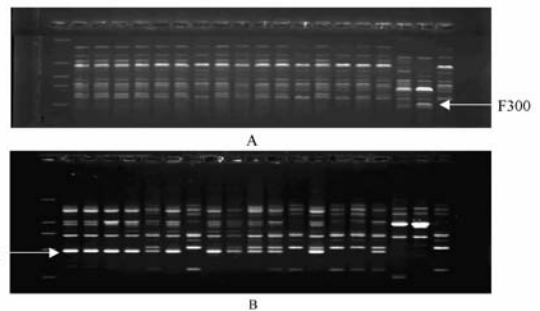
图 1 19 份材料 UPGMA 聚类图

用 100 个 10 bp 的随机引物进行扩增,根据扩增条带的有无将标记结果转化为“0,1”型数据,并用 NTSYS 3.0 进行聚类分析。根据扩增图谱筛选能有效区分川牛膝、红牛膝和怀牛膝的特异性片段。特异性条带的回收参照 UNIQkit(上海生工)说明书;感受态细胞的制备、转化、阳性克隆的筛选鉴定参照 Sambrook 等<sup>[7]</sup>的方法。样品送上海英骏生物技术有限公司测序。

**1.3 SCAR 引物的设计及扩增** 根据测序结果,参照 RAPD 随机引物序列,在原有引物序列的基础上向内延伸 8 ~ 12 bp,设计并合成 2 对特异引物,对 19 份基因组 DNA 进行扩增,反应体系为 DNA (50 mg · L<sup>-1</sup>) 2 μL, Taq Buffer (10 × ; Mg<sup>2+</sup>-free) 2 μL, MgCl<sub>2</sub> (25 mmol · L<sup>-1</sup>) 1.2 μL, dNTPMix (10 mmol · L<sup>-1</sup> each) 1 μL, 引物 (10 pmol · L<sup>-1</sup>) 0.5 μL, Taq 酶 (5 U · μL<sup>-1</sup>) 0.3 μL, 加入 ddH<sub>2</sub>O 补齐至 20 μL。混匀并离心后,按 94 °C 预变性 4 min; 94 °C 变性 1 min, 55 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 2 min, 共 30 个循环;72 °C 延伸 7 min。1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增结果。

## 2 结果与分析

**2.1 RAPD 标记分析** 从 100 个随机引物中筛选



A. 引物 s99; B. 引物 s278; 从左至右分别为 DNA marker, 1 ~ 19 号材料。

图 2 随机引物对 19 份材料基因组 DNA 的扩增结果

**2.2 RAPD 特异片段回收、克隆及测序** 对 F300, F500 片段进行回收、克隆、测序, F300 片段的实际碱基数为 320 bp, F500 片段的实际碱基数为 495 bp。在 NCBI 上对 2 条序列进行 blastn 搜索,未发现同源序列,见图 3。

**2.3 SCAR 标记的建立** 根据测序结果设计 2 对 PCR 特异引物,见表 2。分别用合成的引物对 19 个材料的基因组 DNA 进行扩增。引物 SC-320F, SC-320R 在第 III 类中有唯一的 1 条扩增带,约 300 bp,而在其他供试材料中均无相应的扩增带,这对引物

```
TTCAGGGCAC AATGGGCTTG ATATATACCA GTTCAACATC AAGTCTTGT ACACITTTTG
ACAGCTATCT GTTACTATC TTCAGGGAAT GCGACCATGG AAAGACTCAA GCAAGCATTG
ACATTTTCAG GTCAGAAATA TGGGGATTGG GTGTTAGATC TGCAGCTGCAA TTTGTTGGGA
CCAAGTACTT TATTTAGGTT AACCTTTCTT TAATATTAAT TCTTTTCTAG ATTTTGTITG
GTAAAGTTCT CTGTTTGCCT ATTTCTGCTT TTGATATTGG AATGAGGTAT AGTCGTAAGT
ATTTGTTTCA TTCTGAARCA CTGAATGATT TTTCTCATGC TGTCAAATTAT CAAGTGCCTT
CAGATGATTT ATGTGATTT GTGAAAAGCTG GTGGAGCCCTT CTGGCCGTTT TGGGAAATGT
TCTTAAGTAT TCAATGCACA AGCATTAAAT TTTTCTGTTT CTCTTTTGGG TTTCCAGATT
TGTGAGTGGC CTGAA
```

A

```
GTCAGGGCAA AATCTTCTGT CGGGGATATC TAAATCAAGG TTTGTACCAA ATCCATGACT
TGTCTCTCA ACCCACCATT CTCTCTGCTG AACGTGTTTC CTTTCAAAGT TGGCACAATC
GTCTCGGTCA TCCTCATGCT CAAGTCCCTT AACCACTAGT GTCTCTTTT AATCTTCCAG
TTTCTCAAAG SCATTTGGCT TCTGTTTGTG GTTCATGCCA AITGAGAAJA AGTCATAGGC
TTCTCTGCTG TCTAGTGCAT AITTTAGTIT CTACTTCTCT TGAATTAGIT TAITTCGATG
TATGGGGTCC TTGCCCTGAC
```

B

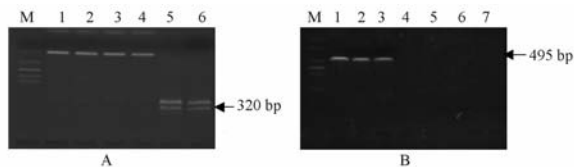
A. 引物 s99 扩增片段 F300; B. 引物 s278 扩增片段 F500。

图 3 随机引物扩增片段的测序结果

可将怀牛膝从 19 份材料中区分出来;引物 SC-495F, SC-495R 在 I 大类中有唯一的 1 条扩增带,约 500 bp,而在其他材料中均无相应的扩增带,这对引物可将川牛膝从 19 份材料中区分出来。这一结果表明 RAPD 标记已被成功转化为 SCAR 标记,可快速、准确地鉴定川牛膝、红牛膝和怀牛膝,见图 4。

表 2 川牛膝 SCAR 标记的构建

RAPD 引物	SCAR 引物	SCAR 引物序列(5'-3')	退火温度 /°C
s99	SC-320 F	CCATGACTTGTCTCTCAAC	56
	SC-320 R	AGAAGACAGAGGAAGCCTATG	
s278	SC-495 F	TTCAGGGCACAATGGGCTTG	59
	SC-495 R	TTCAGGGCACTCACAATCTGG	



A. 引物 SC-320; 1~4. 川牛膝; 5~6. 怀牛膝;  
B. 引物 SC-495; 1~3. 川牛膝; 4~5. 红牛膝;  
6~7. 怀牛膝; M. DNA Marker。

图 4 川牛膝 SCAR 分子标记

### 3 讨论

对川牛膝道地产区品种和生产情况进行调查的结果表明,目前在道地产区作为川牛膝种植的品种类型主要有传统地道品种川牛膝 *C. officinalis*、混淆品种头花杯苋 *C. capitata* (红牛膝)。二者均作为商

品牛膝在市场上流通,而且红牛膝因其产量较高种植面积日益扩大。由于长期栽种忽视良种选育和提纯,川牛膝品种退化严重,根条越来越小,纤维化程度越来越高,原来的“油润、味甜、化渣”等特征几乎丧失殆尽。进行川牛膝品种选育势在必行,弄清道地产区川牛膝种质资源的遗传基础是重要的基础工作。本研究用筛选到的 23 个 RAPD 随机引物对 19 份不同地理来源的川牛膝、红牛膝及怀牛膝材料进行扩增,建立了川牛膝及其混淆品的 RAPD 指纹图谱,共扩增出 419 个谱带分子量在 140~2 500 bp 的 RAPD 位点,其中多态位点 377 个,多态性位点百分率为 90%,与乌头、白芍、百合、野生人参等的 RAPD 多态位点百分率相比,19 份材料的多态位点百分率明显偏高<sup>[8]</sup>。从数据中去除 5 份红牛膝和 2 份怀牛膝材料后,多态性位点百分率下降为 36.8%。从地理分布来看,川牛膝仅在四川西南部小范围内种植,产地间的生态条件和海拔高度差异不大,遗传基础较为狭窄。多态性的降低与川牛膝药材分布和生产是相符合的。这一结果表明,川牛膝的遗传基础是比较狭窄的,在育种中应当更多考虑现有川牛膝种质资源的收集与提纯。

聚类分析将 19 份材料分为 3 个类群,川牛膝、红牛膝和怀牛膝各自聚为 1 类,表明 RAPD 标记是区分 3 类材料的有效分子标记。从 RAPD 图谱中找到能有效区分川牛膝、红牛膝和怀牛膝的多态性谱带 F300, F500 进行测序,并根据序列设计出特异性引物进行 PCR 扩增,将 RAPD 标记转化为 SCAR 标记。其中,SC-320 标记可以较快地稳定地在川牛膝与怀牛膝中鉴定出怀牛膝,另一个 SC-495 标记则能稳定有效地在区分川牛膝与红牛膝。2 个 SCAR 标记的 PCR 结果表明所筛选的 SCAR 标记特异性好,稳定可靠,操作简单,是川牛膝鉴别中非常有效的分子标记。

一般说来,能作为 SCAR 标记区分不同类型材料的 DNA 序列往往有较重要的生物学意义<sup>[4-6]</sup>。为明确 F300 及 F500 这 2 条序列的功能,并进一步了解其在川牛膝和红牛膝种群进化过程中的作用,在 NCBI 上对这 2 个标记所扩增的 DNA 序列进行了 Blast 搜索,但未发现同源序列。还需要进行更深入的工作以阐明这一问题。

#### [参考文献]

[1] 万德光,彭成,赵军宇. 四川道地中药材志[M]. 成都:四川科



- 学技术出版社,2005:44.
- [2] 谢宗万. 中药材品种论述[M]. 上海:上海卫生出版社,1994:408.
- [3] 邵鹏柱,曹晖. 中药分子鉴定[M]. 上海:复旦大学出版社,2004:109.
- [4] 施江,辛莉,谭琳,等. 一条卡瓦胡椒特异 RAPD 带转化成 SCAR 标记的研究[J]. 云南植物研究,2007,29(4):457.
- [5] 祁建军,李先恩,李学禹,等. 甘草种子 SCAR 标记的建立[J]. 中国农业科技导报,2007,9(5):101.
- [6] 吴松权,祖元刚,吴基日. 膜荚黄芪 SCAR 标记的建立[J]. 植物研究,2008,28(5):560.
- [7] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning: A laboratory manual[M]. USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989:55.
- [8] 田孟良,田迎春,刘帆,等. 乌头种质资源遗传多样性的 RAPD 分析[J]. 四川农业大学学报,2007,25(1):63.

## Authentication of Radix Cyathule and its adulterants based on SCAR markers

TIAN Mengliang<sup>1</sup>, GUAN Yu<sup>1</sup>, LIU Fan<sup>1</sup>, YUAN Jichao<sup>1</sup>, YANG Hua<sup>2\*</sup>

(1. College of Agronomy, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China;

2. Section of Science and Technology Management, Sichuan Agricultural University, Ya'an, 625014, China)

[Abstract] Chuanniuxi (Radix Cyathule) is one of the most important geo-herb in Sichuan province, which adulterants are Hongniuxi (*Cyathula capitata*) and Huainiuxi (*Achyranthes bidentata*). In this paper Chuanniuxi and its adulterants were identified by SCAR markers. Nineteen populations from Tianquan, Baoxin, Huili and Jinkouhe were collected and their RAPD fingerprints were established. Based on the RAPD patterns, two polymorphic bands F300 and F500 were selected, recycled, cloned and sequenced. According to the sequences two pairs of sequence characterized amplified regions (SCAR) primers were designed and used to amplify all materials to prove the efficiency of identification of the different populations. Chuanniuxi and Huainiuxi could be distinguished by the primer SC-320, Chuanniuxi and Hongniuxi could be distinguished by the primer SC-495. Combining the two SCAR markers, Chuanniuxi, Hongniuxi and huainiuxi could be identified effectively and quickly.

[Key words] Radix Cyathule; promiscuous medicinal materials; RAPD marker; SCAR marker

doi: 10.4268/cjcm20100803

[责任编辑 吕冬梅]