

人参 RAPD 指纹鉴定的毛细管 PCR 方法[△]

中国医学科学院

中国协和医科大学 药用植物研究所(北京 100094)

马小军* 汪小全** 邹喻革**

肖培根 洪德元**

摘要 本实验建立并优化了用毛细管 PCR 扩增人参 RAPD 指纹的反应体系,讨论了用毛细管 PCR 方法扩增 RAPD 指纹在中药材鉴别上的应用前景。

关键词 人参 RAPD 毛细管 PCR

中药品种鉴别是保证中药质量的一个关键环节。传统的中药鉴别方法是以药材表型特征为基础的鉴别方法,包括形态组织比较和化学成分分析。然而,常规方法对一些疑难种、易混种的鉴定往往很难得出正确有效的结论。随着分子生物学技术的发展,90 年代以来一种以药材基因型特征为鉴定指标的新兴技术——药材 DNA 指纹鉴定技术的出现^[1~3],为中药鉴定学开辟了一条新路。这一技术包括 RAPD、AFLP、PCR—RFLP、特异 DNA 探针杂交、小卫星、微卫星指纹分析等,由于它是直接分析遗传物质本身,排除了环境因素给药材鉴定带来的干扰,所以比传统方法更准确可靠。它不仅能区分相近物种,而且可以检测变种、品种、化学型乃至个体之间 DNA 的细微变异。通过名优地道药材 DNA 指纹的认定,还能提供划分中药档次的分子标记,因此在中药鉴别及种质资源研究中显示出极大的应用前景。

RAPD(随机扩增的多态 DNA 分析)是药材 DNA 指纹鉴定技术中最简便、快捷的一种,该方法一般在 Eppendorf 离心管进行 PCR 反应,扩增 DNA 指纹,但其费用较高(反应体积大),花费的时间较长,需要的 DNA 模板量较多,因而使其应用受到一定限制。近年发展起来的毛细管 PCR 方法^[4]在一定程度上弥补了这一缺点。与普通 PCR 方法

相比,毛细管 PCR 的优点是:第一,反应体系小,节省试剂和材料。第二,毛细玻璃管管壁比普通薄壁管感温灵敏、传热快,反应介质与反应环境接触面积相对大,提高了 Taq 酶功效,反应时间仅为普通 PCR 的 1/3。因此,我们认为毛细管 PCR 方法比普通 PCR 更适于作药材鉴别。为此,我们于 1996 年首次将毛细管 PCR 应用于中药鉴定,系统比较了不同条件扩增人参 RAPD 指纹的效果,建立并优化了扩增人参 RAPD 指纹的反应体系,现将研究结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料:人参 *Panax ginseng* L. 和西洋参 *P. quinquefolius* L. 采自北京中国医学科学院药用植物研究所实验地,用 5 年生人参叶或根和 4 年生西洋参叶作实验材料。取 2~3 片干叶(硅胶干燥)、鲜叶或 1 g 根,用 CTAB 法提取总 DNA^[5],干、鲜材料分别用 2×CTAB 和 1×CTAB 提取液提取。DNA 提取后进行去 RNA 纯化,即将总 DNA 用 1% 的 RNaseA 酶解,等体积氯仿异戊醇(24:1)抽提,用无水乙醇沉淀后溶于 0.1×TE 中,并用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 浓度,电极缓冲液用 1×TAE。

1.2 实验设计:1)DNA 模板条件的研究:先比较人参不同材料即根与叶、干叶与鲜叶 DNA 的 PCR 扩增效果,再比较干叶不同

* Address: Ma Xiaojun, Institute of Medicinal Plant Development, CAMS, PUMC, Beijing

** 中国科学院植物研究所系统与进化植物学开放实验室

△ 本课题得到中国科学院植物研究所系统与进化植物学开放实验室资助

DNA 浓度的扩增效果:以 100 ng/ μ L 的 DNA 原液为基础,逐级稀释 10、20、40、60、80 倍。2)反应条件的探讨:Tag 酶购自中国农业大学生物技术中心,酶浓度设 0.58 U/ μ L 和 0.29 U/ μ L 两个浓度;PCR 反应的退火温度设 37 $^{\circ}$ C、35 $^{\circ}$ C、32 $^{\circ}$ C;引物使用美国 Opron Technologies 公司生产的 F、H、K、M、L、Y 组中的部分通用引物(表 1)。

表 1 引物及其序列

引物	序列 (5' to 3')
1 OPG02	GAGGTACCCT
2 OPG13	CTCTCCGCCA
2 OPG19	GTCAGGGCAA
3 OPH03	AGACGTCCAC
5 OPG10	TGGCCCTCAC
7 OPL07	AGGCAGGAAC
8 OPL15	AAGAGAGGGG
9 OPO04	AAGTCCGCTC
10 OPY04	GGGTCTCGGT

1.3 反应条件及程序:DNA 扩增在 Idaho1605 型毛细管气浴式 PCR 仪上进行,反应体系为 10 μ L,成分为:模板 1~100 ng、引物 20 ng/ μ L、dNTP 各 200 μ mol/ μ L、Ficoll 1%,酒石黄 1 mmol。PCR 扩增条件:94 $^{\circ}$ C 变性 1 min,35 $^{\circ}$ C 复性 10 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,此程序 2 个循环后接第 2 个程序 45 个循环:94 $^{\circ}$ C 变性 2 s,35 $^{\circ}$ C 复性 10 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,最后 1 个循环后接 72 $^{\circ}$ C 4 min。PCR 反应产物在 1.5% 琼脂糖凝胶(含 0.5 μ g/mL EB)上电泳,电泳结果在透射式紫外灯上观察并用 FOTODYNE 型紫外自动成像仪照相。

2 结果和分析

2.1 DNA 模板

2.1.1 干、鲜材料的比较:利用引物 OPG13 比较人参干叶和鲜叶的 RAPD 图谱,可以看出,两者均扩增出 3 条带,分别为 800、510、450 bp 相应条带的分子量完全相同。综合前人的报道^[6]和本实验结果,我们认为尽管药材在干燥过程中 DNA 确有降解,但干品仍带有足够多的 DNA 信息特别是稳定的小分子带,可供鉴别药材使用。

2.1.2 不同器官的比较:用引物 OPH03 扩增人参根和叶,在 350~2 500 bp 范围内获

得 6 条完全一致的条带。

2.1.3 DNA 模板浓度:用引物 OPG10 扩增人参的 5 个 DNA 模板浓度发现,不同浓度扩增效果是有差异的,浓度约 100 ng/ μ L 的 DNA 提取原液没有扩出 RAPD 条带,因为提取液中可能含有多糖、多酚等物质干扰核苷酸的合成。随着 DNA 浓度的逐级稀释,扩增效果越来越好,稀释至 1.25 ng/ μ L 时效果最佳,而这一浓度只有普通 PCR 所需 DNA 浓度的 1/40,显然毛细管 PCR 方法大大节省了实验材料。

2.2 PCR 反应条件

2.2.1 退火温度:退火温度是影响 PCR 扩增效果的重要因素,我们在不改变其它条件的前提下设计 32 $^{\circ}$ C、35 $^{\circ}$ C、37 $^{\circ}$ C 3 个退火温度进行实验,得到的 3 个指纹图型基本相同,其中 35 $^{\circ}$ C 退火的指纹信号较强,这表明 32 $^{\circ}$ C~37 $^{\circ}$ C 均是毛细管 PCR 扩增人参 RAPD 指纹的适宜退火温度。过低的退火可能导致条带过多而弥散,降低引物扩增的专一性。过高的退火温度可能减少或扩不出 RAPD 条带,只有在适宜的退火温度内才能进行引物筛选并扩增出满意的条带。

2.2.2 Taq 酶浓度:我们用两个 Taq 酶浓度对相同引物(OPL07 和 OPL15)的扩增效果进行了比较,发现两者带型没有差异,故认为 0.58 U/ μ L 和 0.29 U/ μ L 均为适于毛细管扩增的适宜浓度(图 1)。

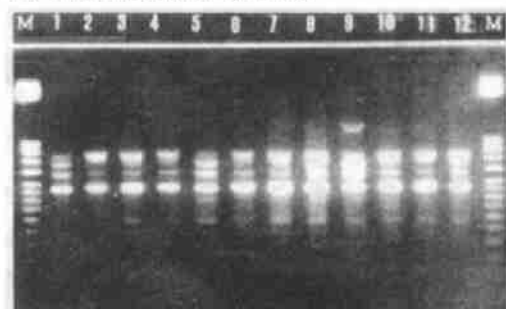


图 1 退火温度

1~4-37 $^{\circ}$ C 5~8-35 $^{\circ}$ C 9~12-32 $^{\circ}$ C

2.2.3 引物种类的筛选及引物浓度的确定:引物的选择对鉴别药材是至关重要的。我们

就适宜做人参 RAPD 扩增的引物进行了大量筛选,结果表明,在筛选的约 300 个引物中,约 12% 的引物不能扩增或扩出极弱的 DNA 条带,在可以扩增出明显条带的引物中,有些重复性较差如 OPY02,另一些则有较好的重复性如引物 OPY04、OPK10、OPL08 等,我们用 OPY04 对人参 40 个个体进行扩增的比较,所有个体展示出几乎完全一样的条带图型。为了确立引物的适宜浓度,本实验参照毛细管 PCR 实验以往的经验,比较了引物 OPG19 的 3 个浓度:即终浓度 40 ng/ μ L、20 ng/ μ L 和 10 ng/ μ L,结果引物浓度为 20 ng/ μ L 的扩增效果最好。

2.3 人参与西洋参的 RAPD 指纹比较:西洋参与人参是近缘种,药材外形极为相似,在市场上最易混淆,但从 DNA 指纹上很容易找到两者的差异而加以区别,这方面已有一些报道^[7,8]。我们用人参和西洋参各 2 个个体,用毛细管 PCR 的方法用引物 OPO04 扩增 DNA 指纹,发现两者的共同条带仅有 2 条,而西洋参特有带带有 4 条,分别是 790、630、590、370 bp。用另一引物 OPF02 扩增的结果是,人参与西洋参有 4 条共同带,西洋参有 1 条分子量为 600 bp 的特有带(图 2)。

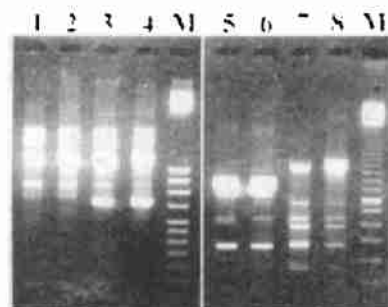


图2 人参与西洋参 RAPD 指纹比较

1、2、5~6-人参 3、4、7、8-西洋参 引物:1~4-OPF02
5~8-OPO04

3 讨论

3.1 毛细管 PCR 扩增 RAPD 指纹的稳定性:应用 RAPD 指纹鉴别药材,最重要的一点是必须要有好的重复性,而重复性的好坏与以下关键环节直接有关。

3.1.1 DNA 模板的质量:在我们的大量实验中发现,提取 DNA 的方法对日后做 PCR 的效果有很大影响,例如比较用乙醇沉淀 DNA 和用异丙醇沉淀 DNA 对 RAPD 扩增效果发现,前者明显好于后者;又如用 DNA 提取原液直接做 RAPD 扩增远不如去 RNA 纯化后再做 RAPD 效果好。因此,高质量的 DNA 模板是应用毛细管 PCR 鉴别药材所必需具备的条件。

3.1.2 中药材的加工方法对 DNA 的可能影响:不同药材的加工方法不尽相同,药材最常见的加工方法是收获后及时晾晒,这种迅速干燥的方法可以将药材 DNA 的降解减到最小,所以在我们的实验中干品和鲜品的 DNA 在扩增 RAPD 指纹时没有表现出明显差异。但其它加工方法对药材 DNA 有何影响,本文未做探讨,这方面还有待今后做细致的比较研究。

3.1.3 引物的选择:RAPD 技术引起争议的一个主要问题是其结果有时不够稳定。我们认为引物的正确选择对提高再现性是极为重要的。就人参而言 OPL07 和 OPY04 分别有 4 条和 5 条稳定的条带,即使不同人、不同时间、不同仪器上重复,仍可获得相同带型,此类引物可以用作人参鉴定;相反,有些引物虽能扩出清晰条带但很难重复,此类引物不能用作药材鉴别。

除了模板提取方法和引物的筛选之外,将反应体系中各种因子包括 DNA 模板浓度、酶浓度、引物浓度均调整至最适状态,使之标准化,将有可能建立药材 RAPD 指纹鉴定的统一标准。

3.2 组织器官特异性对扩增 RAPD 指纹的影响:理论上说植物不同组织或器官中细胞核、叶绿体、线粒体 3 个基因组的比例可能存在差异,故采样部位不同可能导致 DNA 指纹的差异,但这种差异实际上极小。由于 cpDNA 和 mtDNA 在 totalDNA 中所占比例很小,被随机扩增的机率也极低,如 cpDNA 仅约 150 kb 且不含重复序列,而 nDNA^{10⁸~11}

bp 且有 20% 以上的高度重复序列, 专门杂交实验认为, 线粒体和叶绿体对 RAPD 产物的贡献加起来不超过 5%^[9], 因此在 PCR 反应中可忽略。本实验比较了取材人参根和叶对 RAPD 的影响, 两者 RAPD 图型完全一致, 印证了上述结论。但各部位次生化合物不均一可影响 DNA 质量, 这一问题通过 DNA 纯化消除后, 可认为选择药材的任何部位包括非药用部分做鉴定材料, 效果是等同的。

3.3 毛细管 PCR 方法和特点和需要注意的问题: 毛细管 PCR 方法的特点是反应体系小, 扩增 DNA 指纹比普通 PCR 灵敏的多, 仅用纳克级的样品量即可完成一次反应, 汪小全的研究发现当模板 DNA 少至 0.4 ng/ μ L 时, 仍能扩增出正常稳定的 DNA 条带^[10], 这是毛细管 PCR 的一大优点, 大大节

省了材料和试剂, 但也正因为其对 DNA 的敏感, 操作时更容易被 DNA 污染, 干扰鉴别结果。一个解决的办法是设三蒸水对照组, 通过比较消除污染造成的杂带。

参考文献

- 1 Walliams J G, *et al.* Nucl Acids Res, 1990, 18: 6531
- 2 黄璐琪. 中国中药杂志, 1995, 20(11): 643
- 3 王义权, 等. 中国中药杂志, 1997, 22(10): 583
- 4 Paul WS, *et al.* The Rapid Cyclist, 1992, 1(1): 9
- 5 Scott OR, *et al.* Plant Molecular Biology, 1985, 5: 69
- 6 曹 晖, 等. 中国中药杂志, 1997, 22(4): 197
- 7 Shaw PC, *et al.* Planta Med, 1995, 61: 466
- 8 Ozeki Y, *et al.* Natural Med, 1996, 50: 24
- 9 Kurt Weising, *et al.* DNA Fingerprinting in Plants and fungi. Boca Raton Ann Arbor London Tokyo: CRC Press Inc, 1995. 33
- 10 汪小全, 等. 植物学报, 1996, 38(12): 954

(1997-11-28 收稿)

Studies on Ginseng (*Panax ginseng*) RAPD Fingerprinting with Capillary PCR

Ma Xiaojun, Xiao Peigen (Institute of Medicinal Plant, Chinese Academy of Medical Sciences, Chinese Xiehe Medical University, Beijing 100094)

Wang Xiaoquan, Zhou Yuping, Hong Deyuan (Institute of Plant, Chinese Academy of Sciences)

Abstract RAPDs fingerprinting amplified in capillary tube for *Panax ginseng* was studied and the application of capillary PCR to identify Traditional Chinese Drug was evaluated.

Key Words Ginseng RAPD Capillary PCR

黄芩茎段直接诱导丛生芽

第二军医大学药学院(上海 200433) 丁如贤* 张汉明 付 翔

摘 要 黄芩带节茎段培养在 MS+6-BA 1 mg/L+NAA 0.2 mg/L 的培养基上, 先诱导形成愈伤组织, 然后出现许多绿色小芽。进一步移至 MS 培养基上产生大量的丛生芽。丛生芽培养于 1/2MS+IBA 0.5 mg/L 培养基上可诱导生根, 形成完整植株。

关键词 黄芩 组织培养 植株再生

中药黄芩为唇形科黄芩属植物黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi 的干燥根, 是我国的传统中药, 最早收载于《神农本草经》

列为草根药的上品。中医认为黄芩有清热燥湿、泻火解毒、止血、安胎的功效。现代药理实验证明其有抗菌、解热及降压作用^[1], 近年来

* Address: Ding Ruxian, College of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai

丁如贤 男, 讲师, 本科毕业于南京师范大学生物学系, 1993-07 华东师范大学生物学系植物生理专业研究生毕业获硕士学位, 同年分配至第二军医大学药学院生药教研室, 从事药用植物组织培养研究。