

驴皮药材 RAPD 分析方法建立及其与伪品马皮的鉴别

田俊生¹, 史碧云^{1,2}, 张福生¹, 李晓伟^{1,2}, 耿伟华³, 杨永³, 刘会来³, 秦雪梅^{1*}

1. 山西大学 中医药现代研究中心, 山西 太原 030006

2. 山西大学化学化工学院, 山西 太原 030006

3. 保定赛行阿胶有限公司, 河北 保定 071404

摘要: 目的 建立驴皮药材 RAPD 分析方法并用于伪品马皮的鉴别。方法 采用化学试剂盒法确定了驴皮药材中 DNA 提取的最佳条件, 采用 $L_{16}(4^5)$ 正交设计方法, 针对 Taq 酶、 Mg^{2+} 、dNTP、模板 DNA、引物设计了 5 因素 4 水平的正交试验, 优化了 RAPD-PCR 反应条件。结果 驴皮药材 RAPD-PCR 反应体系的最佳条件为 25 μ L 反应体系中含有 Taq 酶 1.5 U、 Mg^{2+} 0.15 mmol/L、dNTP 0.25 mmol/L、模板 DNA 1.5 μ L、引物 0.5 μ mol/L; PCR 反应条件为 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 37 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 共 30 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。RAPD 反应结果中 300~400 bp 处的条带可作为鉴别驴皮及其伪品的特异性条带。结论 所建立的 RAPD 分析方法具有简便快捷、稳定性好、重现性高的特点, 可用于驴皮药材及其伪品马皮的鉴别。

关键词: 驴皮; RAPD-PCR 分析; 正交设计; DNA 分子标记; 伪品鉴别

中图分类号: R282.32 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2013)03-0354-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.03.024

Establishment of RAPD for analysis on furs of *Equus asinus* and discrimination from *Equus caballus orientalis*

TIAN Jun-sheng¹, SHI Bi-yun^{1,2}, ZHANG Fu-sheng¹, LI Xiao-wei^{1,2}, GENG Wei-hua³, YANG Yong³, LIU Hui-lai³, QIN Xue-mei¹

1. Modern Research Center for Traditional Chinese Medicine, Shanxi University, Taiyuan 030006, China

2. College of Chemistry and Chemical Engineering, Shanxi University, Taiyuan 030006, China

3. Baoding Saixing E-jiao Co., LTD, Baoding, Baoding 071404, China

Key words: *Equus asinus* L.; RAPD-PCR analysis; orthogonal design; DNA molecular marker; fake identification

驴皮为马科马属动物驴 *Equus asinus* L. 的干燥皮, 是制造传统中药阿胶的重要原料^[1]。《本草纲目》将阿胶列为“上品”, 自古以来作为一种药食同源之品受到人们的青睐。近年来, 随着生活水平的提高, 阿胶用量逐年增加, 市场供不应求。然而, 市场调查结果显示, 在我国驴养殖业发展严重滞后, 驴的存栏数呈逐年下滑之势^[2]。由于驴 *E. asinus* L. 和马 *E. caballus orientalis* Noack 为同科同属动物, 因此驴皮与马皮在毛色、性状等方面十分相近, 肉眼很难区分, 故市场上以马皮作为驴皮伪品制造阿胶最为常见。目前, 驴皮药材尚无药典质量标准, 地方标准收录的传统鉴别方法大多依据性状判断, 存在着客观性差、准

确度低的缺点。因此, 建立快速简便、客观稳定的驴皮及其伪品的鉴别方法显得十分重要。

随机扩增多态性 DNA 技术 (random amplified polymorphic DNA, RAPD) 是 20 世纪 90 年代发展起来的一项基于 PCR 技术的 DNA 多态性检测分子标记技术。它具有操作简便、快速、成本低、所需 DNA 量少、灵敏度高、不易受环境和生物周期的影响等特点^[3]。利用 RAPD 技术鉴别中药材的真伪已受到越来越广泛的关注。但是, 针对动物类药材特别是驴皮的 DNA 鉴别方法文献报道较少^[4]。本研究初步建立了经济实用、方便快捷、准确可靠的驴皮 RAPD-PCR 分析方法并将其用于伪品马皮的鉴别,

收稿日期: 2012-10-06

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81102833); 山西省基础研究项目 (2012021031-2); 山西省中药材、中药饮片地方标准研究 (2011012A)

作者简介: 田俊生 (1980—), 男, 内蒙古人, 博士, 讲师, 研究方向为细胞药理学。Tel: (0351)7011202 E-mail: jstian@sxu.edu.cn

*通信作者 秦雪梅 Tel: (0351)7018379 E-mail: qinxm@sxu.edu.cn

网络出版时间: 2013-01-08 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1108.R.20130108.0928.002.html>

对于保证阿胶质量具有重要意义。

1 材料与仪器

驴皮采集自黑龙江、吉林、辽宁、内蒙古、河北等省区的 12 个产地 (1~12 号), 另外还收集了河北的马皮样品 3 份 (13~15 号), 均为整张皮, 样品信息见表 1, 全部样品经山西大学中医药现代研究中心秦雪梅教授鉴定为马科动物驴 *E. asinus* L.

或马科动物马 *E. caballus* L. 的干燥皮。凭证样本保存于山西大学中医药现代研究中心。

离心柱型血液/细胞/组织基因组 DNA 提取试剂盒, 天根生化科技 (北京) 有限公司; Marker 和 Taq 酶, 宝生物工程 (大连) 有限公司; GoldView I 型核酸染色剂, 北京索来宝生物科技有限公司; 其他试剂均为分析纯。

表 1 样品信息

Table 1 Information of collected samples

编号	样品	产地	编号	样品	产地
1	驴皮 <i>E. asinus</i>	黑龙江哈尔滨	9	驴皮 <i>E. asinus</i>	河北唐山
2	驴皮 <i>E. asinus</i>	黑龙江哈尔滨	10	驴皮 <i>E. asinus</i>	河北唐山
3	驴皮 <i>E. asinus</i>	吉林	11	驴皮 <i>E. asinus</i>	内蒙古包头
4	驴皮 <i>E. asinus</i>	吉林	12	驴皮 <i>E. asinus</i>	内蒙古包头
5	驴皮 <i>E. asinus</i>	辽宁锦州	13	马皮 <i>E. caballus orientalis</i>	河北保定
6	驴皮 <i>E. asinus</i>	辽宁锦州	14	马皮 <i>E. caballus orientalis</i>	河北邢台
7	驴皮 <i>E. asinus</i>	内蒙古赤峰	15	马皮 <i>E. caballus orientalis</i>	河北保定
8	驴皮 <i>E. asinus</i>	内蒙古赤峰			

BSA124S 电子天平, 赛多利斯科学仪器有限公司; HH 数显恒温水浴锅, 江苏金坛市金城国胜实验仪器厂; TGL-16 台式高速离心机, 湘仪离心机仪器有限公司; MJ-Mini 48 孔梯度 PCR 仪, 美国伯乐公司; DYY-6B 型稳压稳流电泳仪, 南京安铎贸易有限责任公司; 凝胶成像仪, Syn Gene Ltd. Cambridge, England.

2 方法

2.1 基因组 DNA 的提取

将驴皮及其伪品马皮分别去毛后粉碎, 过 24 目筛, 按照试剂盒微量提取法操作说明进行基因组 DNA 的提取。经过反复试验, 最终确定样品用量、水解时间等参数。利用琼脂糖凝胶电泳法检查基因组 DNA 提取的效果, 并将提取的 DNA 置于 -20 °C 冰箱中保存, 备用。

2.2 RAPD-PCR 分析

2.2.1 引物 参考文献方法^[4-5], 选取 7 条 RAPD 分子标记的引物 (上海生工生物工程有限公司合成), 合成引物序列见表 2。

2.2.2 PCR 反应程序 参照文献方法^[6]及标准 PCR 反应, 设定如下反应程序: 95 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 30 s, 36 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 共 30 个循环, 最后 72 °C 延伸 7 min, 4 °C 保存。将扩增产物用 1.5% 琼脂糖凝胶进行电泳检测, 上样量为 6 μL。首先对所选 7 条引物进行筛选, 其次设计了 6 个梯度对退火温度进行优化。

表 2 RAPD 分析随机引物及其序列

Table 2 Analysis on random primers and their sequences by RAPD

编号	引物	序列
1	S423	5'-GGTACTCCCC-3'
2	S22	5'-GGTGACGCAG-3'
3	S7	5'-AGGGAACGAG-3'
4	S17	5'-TGCCGAGCTG-3'
5	S42	5'-GGACCCAACC-3'
6	S43	5'-GTCGCCGTCA-3'
7	S47	5'-TTGGCACGGG-3'

2.2.3 正交试验反应体系的优化 选用质量较好的模板 DNA 和前期筛选出的最适引物进行 RAPD 扩增, 在初始反应体系的基础上, 采用 $L_{16}(4^5)$ 对体系中 Mg^{2+} 、dNTP、引物、模板 DNA、Taq DNA 聚合酶等设计 5 因素 4 水平正交试验进行优化, 并用 6 μL 扩增产物于 1.5% 琼脂糖凝胶进行电泳检测, 用直观分析法确定最佳反应体系。PCR 反应的因素及水平见表 3。

2.2.4 RAPD 扩增反应及电泳检测 在优化后的反应体系基础上, 应用所筛选出来的最适引物和最佳反应体系对 12 个驴皮样品及 3 个伪品马皮样品进行 PCR 扩增反应和电泳检测。取样品 DNA 6 μL, 加入 2 μL 6×Loading 缓冲液混匀后上样, 用 1.5% 琼脂糖凝胶于 5 V/cm 的电压下进行电泳检测, 电泳缓冲液为 1×TBE, 用 DNA Marker 作为标准相对分子

表 3 RAPD-PCR 反应体系的因素与水平
Table 3 Factors and levels of RAPD-PCR reaction system

水平	因 素				
	Mg ²⁺ /(mmol·L ⁻¹)	dNTP/(mmol·L ⁻¹)	引物/(μmol·L ⁻¹)	Taq DNA 聚合酶/(U·μL ⁻¹)	模板 DNA/μL
1	0.10	0.10	0.30	0.04	1.5
2	0.15	0.15	0.40	0.06	2.0
3	0.20	0.20	0.50	0.08	2.5
4	0.25	0.25	0.60	0.10	3.0

质量标记, 在凝胶成像系统中观察拍照。

2.3 数据处理

RAPD 为显性标记, 同一引物的扩增产物在琼脂糖凝胶电泳中迁移率相同的条带被认为是同源性的, 处于同一位点的条带按清晰可见的强带或反复出现的弱带记为“1”, 无带记为“0”, 形成二元数据矩阵^[7]。使用 SPSS 17.0 软件, 对矩阵进行聚类分析。

3 结果与分析

3.1 基因组 DNA 的提取

将所提取的基因组 DNA 在 1.5% 琼脂糖凝胶上进行电泳检测, 结果在各样品泳道均出现明显的特异亮带, 表明样品基因组 DNA 已成功地提取出, 结果见图 1。经过反复试验后最终确定样品用量约为 25 mg, 水解时间为 4 h 时, 各样品条带清晰。

3.2 PCR 引物及退火温度筛选

按照 PCR 反应程序对所选的 7 条引物进行筛选, 结果见图 2, 可知 2 号引物 (S22) 电泳条带最为清晰, 且稳定可重复, 因此选择 S22 引物进行后续研究。以 S22 引物为对象, 筛选最佳退火温度, 结果见图 3, 可知泳道 D、E 的条带均较多且清晰, 故退火温度应为 36.2~38.3 °C 为宜, 最后确定退火

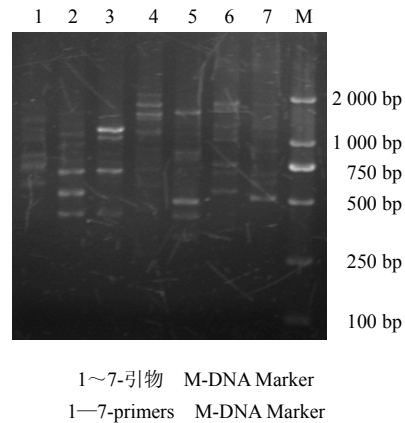


图 2 随机引物筛选电泳图

Fig. 2 Electrophoresis of random screening for primers

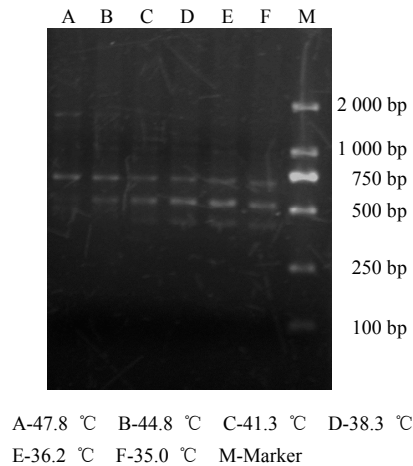


图 3 退火温度筛选电泳图

Fig. 3 Electrophoresis of screening for annealing temperature

温度为 37 °C 进行后续研究。

3.3 正交试验 PCR 反应体系的优化

正交试验的结果见图 4。实验结果表明不同反应体系中, 随着各因素水平的不同, DNA 条带存在明显差异。体系 1~4 结果较差, 可能因为 Mg²⁺浓度过低, 导致 Taq DNA 聚合酶活性降低; 体系 10 和 15 拖尾现象严重, 可能由于高浓度的 Mg²⁺导致

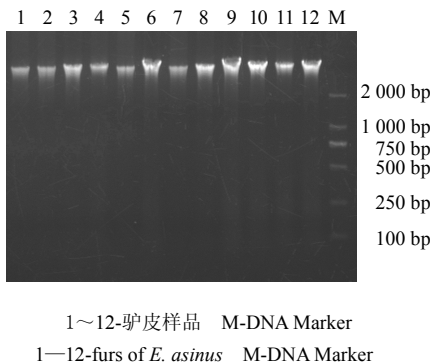


图 1 基因组 DNA 提取电泳图

Fig. 1 Electrophoresis of extracted genomic DNA

非特异性扩增;体系 5 和 6 产生条带少,可能是由于 dNTP 浓度过低,扩增产生的片段太少;体系 11 和 16 产生条带数量少且不清晰,原因可能为引物浓度低,使反应不能有效扩增;体系 12 的结果不好可能是由于酶的浓度低,以致反应无法顺利进行,产物产量过低;体系 7、8、9、13 和 14 的谱带多态性高且比较清晰,其中以反应体系 8 效果最好,结果见表 4。

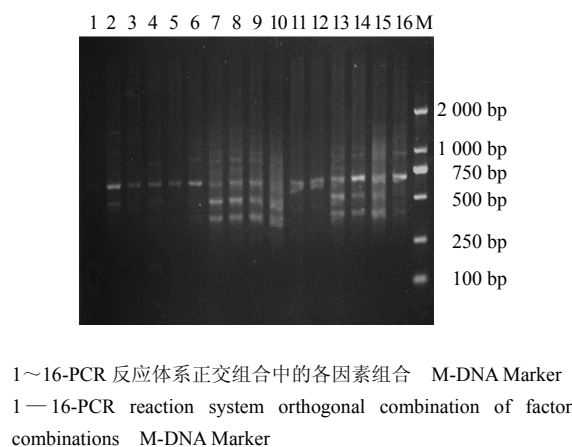


图 4 正交试验优化 PCR 反应体系电泳图
Fig. 4 Electrophoresis of PCR reaction system by orthogonal test

表 4 最佳 PCR 反应体系

Table 4 Optimal PCR reaction system

试剂	体积 / μL
10 $\times$ PCR 缓冲液	2.5
Mg ²⁺ (25 mmol/L)	1.5
dNTP (2.5 mmol/L)	2.5
引物 (2.5 $\mu\text{mol/L}$)	5.0
Taq DNA 聚合酶 (5 U/ μL)	0.3
模板 DNA	1.5
超纯水	11.7

3.4 RAPD 反应电泳检测

按照上述正交试验确定的最佳 RAPD-PCR 反应体系及扩增程序对驴皮及其伪品马皮进行电泳检测,结果见图 5。可知驴皮样品中位于 1 000~1 100 bp、900~1 000 bp、600~700 bp、500~600 bp 以及 300~400 bp 有 5 条较为清晰的 DNA 条带。在马皮样品中大部分 DNA 条带与驴皮样品比较接近,但有两条明显的条带是不一致的,其中位于 1 600~1 700 bp 的弱亮条带在马皮中有而驴皮中没有,而位于 300~400 bp 的较明亮条带在驴皮中有而马皮中没有,这两条 DNA 带有可能成为区别驴皮与马皮的特异性条带。

3.5 聚类分析

聚类分析结果见图 6。可知,在距离为 5~15

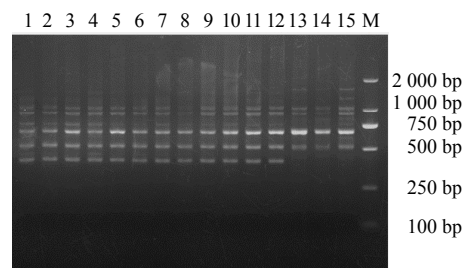


图 5 引物 S22 扩增结果的电泳检测
Fig. 5 Electrophoresis of Primer S22 PCR

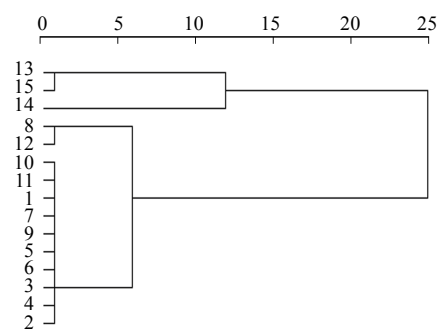


图 6 样品聚类分析图

Fig. 6 Cluster analysis of samples

时,样品明显地分成 2 类,即驴皮样品和马皮样品。其中,驴皮样品 1~7 与 9~11 距离较为接近,聚为一类,而样品 8 和 12 距离较为接近,聚为一类。马皮样品 13 和 15 距离较为接近,聚为一类,而样品 14 距离较远,单独聚为一类。对聚类分析结果进一步分析可知,驴皮样品和马皮样品可明显地区分,聚类分析结果与电泳检测结果具有一致性。

4 讨论

PCR 反应程序包括预变性、变性、退火以及延伸的温度和时间等参数,其中退火温度是最为重要的参数之一。退火温度过高会使引物与模板难于结合,过低则会引起引物与模板的非特异性结合,导致 RAPD 反应的特异性降低^[8]。本研究筛选出的驴皮 RAPD 反应的最佳退火温度为 37 $^{\circ}\text{C}$,这与关于哺乳动物的现有研究如藏獒、西藏牦牛、大汉梅猪等物种 RAPD-PCR 反应的退火温度较为接近^[9]。在建立和优化 RAPD-PCR 反应体系时,常用单因素考察法和正交试验设计两种方法。但是单因素考察法无法考虑到各因素间的相互影响作用,而正交试验

设计具有均衡分散、综合可比、效应明确等特点,可较快地找到因素间的最优组合^[10-12]。在RAPD-PCR反应体系中引物浓度通常为0.1~2.0 $\mu\text{mol/L}$,这时大多数引物能产生6~12条扩增条带^[13]。Taq DNA聚合酶是反应中的催化剂,一般在25 μL 的体系中使用1~5 U的Taq酶,用量过低则使DNA新链合成效率太低,导致扩增产物过少,过高则容易产生非特异性扩增产物^[14]。DNA模板量过低,会导致无扩增产物或者扩增产物少,过高又会导致扩增条带模糊和非特异性产物的出现^[15],一般认为5~500 ng的模板量能提供扩增效果较好的谱带^[16]。因此,本研究重点对这5个重要影响因素进行了正交试验研究,确定了最佳的反应体系。

本研究对采集自黑龙江、内蒙古、辽宁、吉林、河北等地的12批驴皮样品及3批马皮样品进行了DNA分子标记研究,凝胶电泳检测结果与聚类分析结果均显示驴皮和马皮可以明显地区分开,且在300~400 bp处,驴皮样品具有一条明显亮带,而马皮样品则没有,表明所建立的RAPD-PCR分析方法不仅有望成为鉴别驴皮及其伪品的有效而简便的方法,而且可以作为驴皮药材的质量控制新方法。针对驴皮样品中扩增条带的特异性,可以将300~400 bp处条带进行基因测序研究,从而设计出鉴别驴皮的特异性引物,相关工作正在进行中。

鉴于驴皮商品来源复杂、质量参差不齐、鉴别非常困难的现状,建立RAPD分析方法用于驴皮的鉴别及其质量控制是一种新的探索。由于动物类药材本身存在着某些特殊性,而且产地遍布全国,考虑到不同产地、不同人工繁殖条件等因素可能会影响到RAPD-PCR鉴别结果,为此在后续的研究中还需收集更多产地的驴皮样品以及更多种类的混伪品,增加鉴别的可信度,消除可能存在的假阳性。

综上所述,本实验构建的RAPD-PCR方法为25 μL 反应体系中含有Taq酶1.5 U、 Mg^{2+} 0.15 mmol/L、dNTP 0.25 mmol/L、模板DNA 1.5 μL 、引物0.5 $\mu\text{mol/L}$,PCR反应条件95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性5 min,94 $^{\circ}\text{C}$ 变性30 s,37 $^{\circ}\text{C}$ 退火30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸1 min,共30个循环,最后72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸7 min。位于300~400 bp处的条带可明显区分驴皮与马皮,有望成为鉴别驴皮及其伪品的特异性条带。

致谢:保定赛行阿胶有限公司为本研究提供驴皮和马皮样品。

参考文献

- [1] 丁立威. 阿胶价格攀升缘在驴皮短缺—1999~2008年阿胶产销调查 [J]. 中国现代中药, 2008, 10(9): 44-46.
- [2] 丁立威. 阿胶价格趋势分析 [J]. 中国现代中药, 2011, 13(6): 57-61.
- [3] 邓琳琼, 陈庆富. 甜芥和苦芥品种遗传多样性的RAPD分析 [J]. 安徽农业科学, 2011, 39(15): 8895-8898.
- [4] 汪小龙, 包振民, 师秀梅, 等. 细胞色素B基因PCR-RFLP鉴定阿胶原料 [J]. 中国海洋大学学报, 2006, 36(4): 645-648.
- [5] 刘娟, 焦传珍. 德州驴RAPD遗传多态性分析 [J]. 广东农业科学, 2010(11): 213-214.
- [6] 周胜花, 贺东昌, 焦福林, 等. 大汉梅猪群体遗传结构及繁殖性能的RAPD分析 [J]. 家畜生态学报, 2008, 29(1): 44-48.
- [7] 高书晶, 韩靖玲, 常秀清, 等. 亚洲小车蝗和黄胫小车蝗不同地理种群的RAPD遗传分化研究 [J]. 华北农学报, 2011, 26(2): 94-100.
- [8] 李晓波, 王峥涛, 徐路珊, 等. 基于PCR技术的中药DNA分子标记鉴别 [J]. 中草药, 2002, 33(8): 760-762.
- [9] 兰小平, 李三相, 李一婧, 等. 藏獒基因组DNA提取及RAPD扩增体系的优化 [J]. 湖北农业科学, 2010, 49(3): 522-525.
- [10] 高震, 张铮, 周婷, 等. 三叶木通MSAP反应体系的优化及引物筛选 [J]. 中草药, 2012, 43(3): 572-576.
- [11] 原勤勤, 文亚峰, 何钢, 等. 用正交设计方法优化枣树ISSR-PCR反应体系 [J]. 中南林业科技大学学报, 2010, 30(2): 70-74.
- [12] 盖均益. 试验统计方法 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2000.
- [13] 邹喻苹, 蔡美琳, 王晓东. 古代“太子莲”及现代红花中国莲种子资源的RADP分析 [J]. 植物学报, 1998, 40(2): 163-168.
- [14] 伏颖, 吴元华, 穆凌霄, 等. 烟草靶斑病菌基因组DNA提取及RAPD反应体系的优化 [J]. 烟草科技, 2011, 11: 71-78.
- [15] 张福生, 郭顺星. 金线莲ISSR反应体系的建立与优化 [J]. 中草药, 2011, 42(1): 137-142.
- [16] 郭宝林, 戴波. 中药材DNA分子标记研究的技术问题II. RAPD实验技术和方法学论述 [J]. 中草药, 2002, 33(2): 178-180.