

正品和伪品大黄的 RAPD 指纹图谱鉴定研究

杨美华^{1,2}, 张大明¹, 刘健全³, 郑俊华², 范国强^{4*}

(1. 中国科学院植物研究所系统与进化植物学开放实验室, 北京 100093; 2. 北京大学药学院, 北京 100083; 3. 中国科学院西北高原生物研究所, 青海 西宁 810001; 4. 北京市中药科学研究所, 北京 100011)

摘要: 目的 用 RAPD 方法对正品和伪品大黄进行指纹图谱的研究, 为正品和伪品大黄的基原鉴定提供分子依据。方法 对 RAPD 反应的实验体系进行了优化, 并采用个体筛选的方法筛选 121 个引物, 采用 BSA 的方法筛选了 64 个引物。结果 分别得到了 2 个具有正品大黄的特征性条带的引物。结论 该方法可靠、准确、快速、重现性好, 达到了在分子水平上鉴定正品和伪品大黄基原的目的。此外, 该实验亦表明 BSA 的方法筛选的特征性条带的引物的效率比个体筛选引物的效率高。

关键词: 正品大黄; RAPD; 指纹图谱

中图分类号: R282.710.3 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2003)06-0557-04

Fingerprint research on authentication of official and unofficial plants of *Rheum L.* by RAPD

YANG Mei-hua^{1,2}, ZHANG Da-ming¹, LIU Jian-quan³, ZHENG Jun-hua², FAN Guo-qiang⁴

(1. Laboratory of Systematic & Evolutionary Botany, Institute of Botany, CAS, Beijing 100093, China; 2. School of Pharmaceutical Sciences, Beijing University, Beijing 100083, China; 3. Northwest Plateau Institute of Biology, CAS, Xining 810001, China; 4. Beijing Institute of Chinese Materia Medica, Beijing 100011, China)

Abstract **Object** In order to identify the resources of official and unofficial plants in *Rheum L.* at molecular level, a random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis was performed. **Methods** The amplification program of polymerase chain reaction (PCR) was optimized. Arbitrary decamer primers of 121 based on the individual selecting method, and 64 based on the BSA method were screened. **Results** Four primers among all screened primers were found to be useful to amplify specific strips to the official plants of *Rheum L.* **Conclusion** This method is reliable, accurate, quick and reproducible for authenticating the official and unofficial plants of *Rheum L.* at molecular level. Moreover, the experiment results indicate that it is more effective to screen the primers using BSA method than using individual selecting method.

Key words official plants of *Rheum L.*; RAPD; fingerprint

RAPD 是用任意序列的 10 碱基寡核苷酸片段作为单引物在全基因组上扫描, 因此, 不需要预先知道基因组的序列信息, 且在理论上可提供的信息量是无限的, 并具有快速、高效等特点, 目前广泛应用于生药鉴定^[1,2], 动、植物遗传育种, 基因诊断, 居群遗传学, 生物系统学与进化研究^[3]。但有关大黄的 RAPD 分子标记的报道仅见于刘叔倩等^[4,5]对 5 种大黄的初步研究。正品与伪品大黄的生药鉴定主要依赖于传统

的性状、显微、化学和理化鉴定。然而, 这些手段对于正品与伪品大黄的种的准确鉴定仍显不足。如鉴定正品大黄的唯一特征“星点”^[6]在伪品中也存在^[7]; 伪品中的独有的化学成分土大黄苷^[8]在正品中亦以较低浓度存在^[9,10]。能否找到一种更为快速、准确、可靠的正品与伪品大黄的种的鉴定方法? 本实验采用 RAPD 分子标记技术对此进行了研究。

1 材料和方法

* 收稿日期: 2002-12-09

基金项目: 国家重点基础研究发展计划项目 (G2000046804)

作者简介: 杨美华 (1964-), 女, 江西省南昌市人, 1985 年 7 月毕业于江西中医学院药学系中药专业, 获学士学位, 1985 年 8 月至 1998 年 8 月在江西省药品检验所从事药品检验工作, 并于 1998 年 7 月评为副主任药师, 2001 年 7 月毕业于北京大学药学院, 获博士学位, 研究方向为生药分子鉴定、生药分析及新药研究开发, 曾主持或参与中国药典、部颁标准、省级标准和新药研究开发项目 12 项, 在国内外发表论文章近 20 篇。

Tel: (010) 66932284 (O) (010) 88271323 (H) Fax: (010) 68158311 E-mail: yangmeihua15@ hotmail.com

1.1 仪器与试剂: Rapidcycler 1818型毛细管气浴式 PCR仪(美国 Idaho Tech. 公司); Sigma 2K 15 离心机; Sigma 1-13离心机; DYY-III 2型稳流稳压电泳仪(北京六一仪器厂); 理光相机。

Taq DNA聚合酶(中国农业大学); dNTPs (Promega 公司); 引物 (Operon Technologies 公司); 1 mol/L MgCl₂ (Sigma 公司); Ficoll-400 (Pharmacia公司); BSA (Sigma公司); Tartrazine

(Sigma公司); Agarose (Promega公司); EB (瑞士 Fluka Chemika 公司)。

1.2 材料: 除药用大黄 *Rheum officinale* Baill. 为中国医学科学院药用植物研究所马小军博士采集外, 大部分材料为作者在野外采集的硅胶干燥的叶片(表 1), 并由中国科学院植物研究所李安仁研究员、北京大学陈虎彪教授鉴定。凭证标本存放于北京大学药学院生物技术研究室

表 1 实验材料的来源及采集地

Table 1 Source and locality of experimental materials of *Rheum L.*

来源	采集地	样品个体数	采集时间	标本凭证号
唐古特大黄 <i>Rheum tanguticum</i>	青海玛沁	5	1999-09-02	Q99155
掌叶大黄 <i>R. palmatum</i>	青海互助	5	1999-08-11	Q99134
药用大黄 <i>R. officinale</i>	重庆南川	2	1999-10-13	M991013
小大黄 <i>R. pumilum</i>	青海玉树	4	1999-08-28	Q99145
歧穗大黄 <i>R. przewalskii</i>	青海互助	4	1999-08-12	Q99136
河套大黄 <i>R. hotaense</i>	青海乐都	4	1999-08-08	Q99130
网脉大黄 <i>R. reticulatum</i>	青海称多	4	1999-08-25	Q99141
窄叶大黄 <i>R. sublancoletum</i>	青海称多	4	1999-08-26	Q99142
丽江大黄 <i>R. likiangense</i>	青海玉树	4	1999-08-29	Q99147
天山大黄 <i>R. wittrockii</i>	新疆伊宁	2	1999-07-06	Y99101
矮大黄 <i>R. nanum</i>	新疆巴里坤	4	1999-07-28	Y99120
密序大黄 <i>R. compactum</i>	新疆巴里坤	4	1999-08-01	X99006
波叶大黄 <i>R. undulatum</i>	药植所药园	1	1999-06-15	Y990615
	北京大学药园	1	1999-09-22	Y990922

1.3 方法

1.3.1 DNA模板的提取和浓度的测定: 称取约 0.05 g的硅胶干燥的大黄叶片, 参考文献^[11]并经适当修改提得 DNA 取 3 μ L DNA样品和 2 μ L点样缓冲液(0.2% 溴酚蓝, 40%蔗糖)混匀, 在 0.8% 琼脂糖凝胶上进行电泳。以 λ DNA作对照, 70 V 电压下电泳 1 h, 检测 DNA片段的长度并估测 DNA的浓度。

1.3.2 PCR反应: 参照文献^[12-14]确定了 PCR的反应体系和反应程序。为避免污染造成的误差, 每个引物均设阴性对照, 即以灭菌双蒸水代替模板, 其他条件均同有模板的 PCR 反应结束后, PCR产物在 4 $^{\circ}$ C 条件下保存至电泳。

1.3.3 PCR扩增产物的检测: 反应结束后, 截去毛细管两端的封头, 直接在含有 0.5 μ g/mL EB的 1.5% Agarose胶上点样, 用 100 bp DNA Ladder作相对分子质量标准, \times TBE为电泳缓冲液, 80 V 恒压电泳 4~5 h 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。

1.4 实验体系的优化: RAPD引物是 10个碱基或更短的寡核苷酸片段, 在退火温度下引物与模板的

互补结合不很稳定, 这种随机扩增容易受到诸多因素的影响: 模板浓度与纯度、缓冲系统的种类与 pH 聚合酶的种类与用量、扩增程序与循环周期等都会影响扩增式样, 其中尤为重要的是所用 PCR的型号^[3]。因此, 研究工作参考本实验室的 RAPD流程(反应程序与反应成分)^[12-14], 均在同一型号的 PCR 仪上进行, 采用同一批的药品, 固定缓冲系统的种类与 pH值、聚合酶的种类与用量, 仅从模板的纯度和浓度、退火温度等方面对大黄毛细管 PCR进行了优化, 最后将各种优化后的条件固定下来, 结果得到了很好的重复。

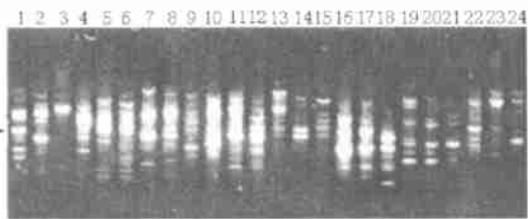
1.4.1 模板的纯度和浓度: 大黄中含有较多的次生代谢产物, 在 DNA的提取过程中应尽可能除去。本实验参考谢中稳^[11]的 CTAB法, 并经修改后, 可有效地从大黄中提取 DNA 经电泳检测, 所提 DNA的片段大小约为 50 kb, 确保了 RAPD的可靠性扩增。

一般认为在每个 PCR反应中, 5~500 ng (100倍)的 DNA能提供好的结果, 推荐 DNA模板浓度为 5~50 ng/50 μ L为最佳^[3]。本实验比较了 4个浓度梯度的 DNA模板对扩增的影响。结果表明, 反应

体系中模板的量在 6.6~ 50 ng,扩增的主要谱带基本一致,随着模板浓度的升高,扩增的主要谱带基本一致,而一些较弱的谱带则更弱或消失。为了降低抑制 Tag DNA 聚合酶活性的因子的影响,每个反应体系中,模板的量调整在 10 ng 左右。

1.4.2 退火温度的选择: 变性温度和延伸温度一般分别为 94℃ 和 72℃,而退火温度一般都在 40℃ 以下,35℃~ 37℃ 合适^[3]。本实验采用了实验方法中所述的 PCR 扩增程序,仅改变退火温度,比较了 35℃、36℃、37℃、39℃ 退火温度的扩增产物。从实验结果可知,较低的退火温度(35℃)导致 PCR 产物的弥散,降低了扩增产物的专一性;较高的退火温度(39℃)虽然增强了扩增产物的专一性,降低了背景的弥散,但引物的主要谱带强度减弱,甚至有的谱带消失。故采用 37℃ 为反应程序的退火温度。

1.4.3 引物的选择: 针对本项研究目的,选择不仅能扩增出清晰的、重复性好的条带,且能扩增出正品大黄的种的特征性条带的引物。为此,采用个体筛选的方法筛选了 121 个引物,采用 BSA 的方法^[15](即:分别等量吸取正品大黄的 3 个种的 DNA 混合均匀作为一个模板,伪品大黄每 3~ 4 个种分别等量吸取 DNA 混合均匀作为模板)筛选了 64 个引物,分别得到了 2 个具有正品大黄的特征性条带的引物 A₈, A₁₀, A_{G12}, Z₁₁(图 1,采用 BSA 的方法筛选引物的 RAPD 实验结果)。此实验说明 BSA 的方法筛选种的特征性条带的引物的效率比个体筛选引物的效率高。



模板: 1, 4, 7, 10, 13, 16, 19, 22 为正品大黄的混合模板,其余均为伪品大黄的混合模板。

引物: 1~ 3, A₈; 4~ 6, A₁₀; 7~ 9, F₇; 10~ 12, H₇; 13~ 15, I₅; 16~ 18, Q₅; 19~ 21, Q₁₀; 22~ 24, R₇

Templates 1, 4, 7, 10, 13, 16, 19 and 22 are mixed templates of official plants of *Rheum L.*

Primers 1~ 3, A₈; 4~ 6, A₁₀; 7~ 9, F₇; 10~ 12, H₇; 13~ 15, I₅; 16~ 18, Q₅; 19~ 21, Q₁₀; 22~ 24, R₇

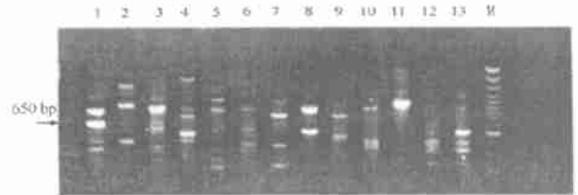
图 1 用 BSA 的方法筛选不同引物的 RAPD 产物(箭头表示引物 A₈ 扩增的正品大黄的的特征性条带)

Fig. 1 RAPD products of different primers screened by BSA (Arrow indicating specific band of official plants of *Rheum L.* amplified by primer A₈)

2 结果和讨论

为了证实所筛选的 4 个引物 (A₈, A₁₀, A_{G12},

Z₁₁) 扩增的特征性是否为正品大黄所专有,将这些引物分别应用于正品与伪品大黄的各个种及其个体间的扩增,结果证实了上述的扩增结果。此外,几乎每个种都有其特有的 DNA 指纹图谱,扩增片段通常在 0.3~ 2.0 kb,不仅能区别正品和伪品大黄,而且能相互区别正品大黄的 3 个种,从而在分子水平上达到了鉴定正品与非正品大黄的目的(图 2~ 5)。

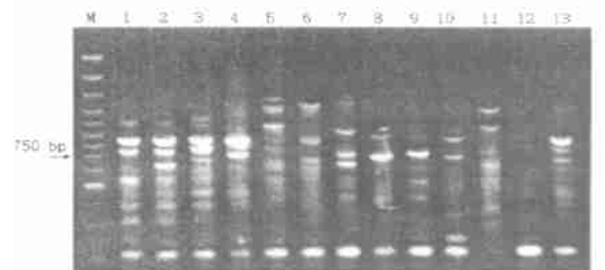


1-唐古特大黄 2-掌叶大黄 3-药用大黄 4-小大黄 5-歧穗大黄 6-河套大黄 7-网脉大黄 8-窄叶大黄 9-丽江大黄 10-天山大黄 11-矮大黄 12-密序大黄 13-波叶大黄 M-DNA 梯度相对分子质量标准

1-R. tanguticum 2-R. palmatum 3-R. officinale 4-R. pumilum 5-R. przewalskii 6-R. hotaense 7-R. reticulatum 8-R. sublancaolatum 9-R. likiangense 10-R. wittrockii 11-R. nanum 12-R. compactum 13-R. undulatum M-DNA Ladder (Dingguo Inc. China)

图 2 引物 A₈ (5' GTGACGTAGG3') 在正品与伪品各个种间的扩增结果(箭头表示正品大黄所特有的条带)

Fig. 2 RAPD fingerprints of official and unofficial plants of *Rheum L.* generated with primer A₈ (Arrow indicating specific band of official plants of *R. tanguticum* amplified by primer A₈)



1~ 13 M 同图 2 注

Notes 1~ 13 and M are seen in Fig. 2

图 3 引物 A₁₀ (5' GTGATCGCAG3') 在正品与伪品各个种间的扩增结果(箭头表示正品大黄所特有的条带)

Fig. 3 RAPD fingerprints of official and unofficial plants of *Rheum L.* (Arrow indicating specific bands of official plants of *R. tanguticum*, *R. palmatum* and *R. officinale* amplified by primer A₁₀)

从上述实验结果可看出,在图 2 中约 650 bp 为唐古特大黄的特有条带;在图 3 中约 750 bp 为唐古特大黄、掌叶大黄、药用大黄的共有条带,在图 4 中约 350 bp 为药用大黄的条带,在图 5 中约 800 bp 670 bp 为唐古特大黄、掌叶大黄的共有条带。

对上述正品大黄的条带,可考虑进一步将

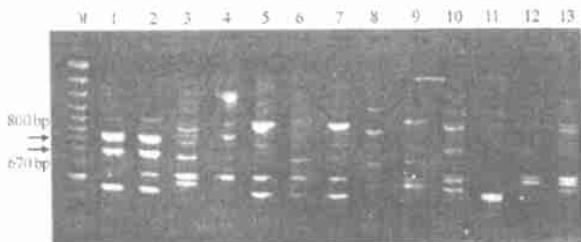


1~ 5唐古特大黄 6~ 10掌叶大黄 11~ 12药用大黄 13~ 16小大黄 17~ 20歧穗大黄 21~ 24河套大黄 M-DNA梯度相对分子质量标准

1~ 5-*R. tanguticum* 6~ 10-*R. palmatum* 11~ 12-*R. officinale* 13~ 16-*R. pumilum* 17~ 20-*R. przewalskii* 21~ 24-*R. hotaense* M-DNA Ladder (Dingguo Inc. China)

图 4 引物 AG₂(5' CTCCCAGGTT3')在正品与伪品各个体间的扩增结果(部分显示)(箭头表示正品大黄所特有的条带)

Fig. 4 RAPD fingerprints of official and unofficial plants of *Rheum* L. generated with primer AG₂ (partly shown) (Arrow indicating specific band of official plant of *R. officinale* amplified by primer AG₂)



1~ 13 M同图 2注

Notes 1~ 13 and M are seen in Fig. 2

图 5 引物 Z₁(5' CTCAGTCGCA3')在正品与伪品各个体间的扩增结果(箭头表示正品大黄所特有的条带)

Fig. 5 RAPD fingerprints of official and unofficial plants of *Rheum* L. (Arrow indicating specific band of official plants of *R. tanguticum* and *R. palmatum* amplified by primer Z₁)

其克隆,并进行测序分析。通过序列分析设计出一对互补到原来 RAPD片段两端的长引物,用这对引物与原来的模板 DNA进行 PCR扩增,这些特征序列扩增区域(SCARs)^[16]可作为正品大黄种的特征性鉴定条带。由于 SCAR标记用了一对互补到专一基因组位点上的长引物和严格的 PCR条件,排除了引物结合位点之间的竞争,因而将得到可靠的重复性好的条带,他们对反应条件不敏感,相信这一技术在生药的快速而准确的鉴定上具有广泛的应用前景。

References

[1] Wang Y Q, Xu L S, Xu G J, *et al.* Prospects of application of DNA molecular genetic marker to pharmacognostical identification [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志),

1997, 22(10): 583-586.

- [2] Gao H, Liu Y P. Application of molecular marker in authentication of Chinese materia medica [J]. *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 1998, 33(5): 269-273.
- [3] Zhou Y P, Ge S, Wang X D. *The Molecular Marker among Systematic and Evolutionary Botany* (系统与进化植物学中的分子标记) [M]. Beijing: Science Press, 2001.
- [4] Liu S Q, Pei D Q, Zheng Q, *et al.* The original research on authenticating the species of *Rheum* L. by molecular marker [J]. *J Beijing Med Univ* (北京医科大学学报), 1998, 30 (Suppl): 48-49.
- [5] Liu S Q, Lu P, Zheng Q, *et al.* Identification of differences among five species of *Rheum* L. by RAPD method [J]. *J Beijing Med Univ* (北京医科大学学报), 1998, 30(Suppl): 60.
- [6] Lou Z C, Wang X, Mikage M, *et al.* Pharmacognostical studies on the Chinese crude drug "Dahuang" (I) Botanical origin of the official Dahuang [J]. *Shoyakugaku Zasshi*, 1988, 42(4): 291-301.
- [7] Wang X, Lou Z C, Mikage M, *et al.* Pharmacognostical studies on the Chinese crude drug "Dahuang" (II) Botanical origin of three unofficial Dahuang [J]. *Shoyakugaku Zasshi*, 1988, 42(4): 302-309.
- [8] Chin T C, Youngken H W. The cytotoxicity of *Rheum* L. [J]. *Am J Bot*, 1947, 34: 401-407.
- [9] Nonaka G I, Minami M, Nashioka I. Studies in rhubarb (*Rhei Rhizoma*) III. Stilbene glycosides [J]. *Chem Pharm Bull*, 1977, 25(9): 2300-2305.
- [10] Guo J X, Shen G Q. The quality analysis of ten species of rhubarb [J]. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 1980, 1: 5-6.
- [11] Xie Z W. Population genetics and conservation strategies of *Oryza rufipogon* Griff. in China [A]. *Dissertation of Doctor Degree of Chinese Academy of Sciences* [D]. Beijing: Institute of Botany, CAS, 1999.
- [12] Qian W. Studies on the genetic structure, forming and maintaining mechanism of wild rice *Oryza granulata* [A]. *Dissertation of Doctor Degree of Chinese Academy of Sciences* [D]. Beijing: Institute of Botany, CAS, 2000.
- [13] Liu S Q. Studies on the germplasm of *Ginkgo biloba* [A]. *Dissertation of Doctor Degree of Beijing University of Medical Sciences* [D]. Beijing: School of Pharmaceutical Sciences, Beijing University, 2000.
- [14] Xie Z W, Ge S, Hong D Y. Preparation of DNA from silica gel dried mini-amount of leaves of *Oryza rufipogon* for RAPD study and total DNA bank construction [J]. *Acta Bot Sin* (植物学报), 1999, 41(8): 807-812.
- [15] Michelmore R, Paran I, Kessili R V. Identification of markers linked to disease resistance genes by bulked segregate analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions using segregation population [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88: 9828-9832.
- [16] Paran I, Michelmore R W. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce [J]. *Theor Appl Genet*, 1993, 85: 985-993.