

· 药材 ·

诃子及其混淆品 RAPD 分析[△]

广州中医药大学临床药理研究所 (510405) 黄 丰* 王培训 周 联 曹柳英 梁瑞燕
广州中医药大学中药资源研究室 徐鸿华 刘军民

摘 要 目的: 对不同品种的诃子进行 DNA 指纹图的鉴别研究, 并对 RAPD 在中药材鉴别中存在的一些问题进行研究。方法: 应用 RAPD 技术对诃子及其常见混淆品进行 DNA 指纹图多态性的比较。结果: DNA 指纹图显示, 各样品间具有不同的遗传关系, 根据这些差别可进行鉴别, 同时对存在的若干问题提出了解决的方法。结论: RAPD 可以有效地鉴别诃子及其混淆品。

关键词 诃子 RAPD DNA 指纹图

Identification of the Fruit of *Terminalia chebula* from Its Confusable Varieties by RAPD Analysis

Institute of Clinical Pharmacology, Guangzhou University of TCM (Guangzhou 510405) Huang Feng, Wang Peixun, Zhou Lian, Cao Liuying and Liang Ruiyan

Department of Resource of TCD, Guangzhou University of TCM Xu Honghua and Liu Junmin

Abstract Different varieties of *Terminalia chebula* Retz. were identified by DNA finger prints, and at the same time, some problems encountered during the application of RAPD for the identification of TCM were studied. The polymorphic features of DNA finger prints of different species were compared. Results of the study showed that they were differently related in heredity which can provide a basis for the differentiation of one species from the other. Means for the solution of problems arised during RAPD application were suggested. It was concluded that RAPD is an effective method to identify *T. chebula* from its confusable varieties.

Key words fruit of *Terminalia chebula* Retz. RAPD DNA finger prints

随机扩增多态 (RAPD) 是在聚合酶链反应 (PCR) 技术上发展起来的 DNA 多态性检测技术^[1,2], 具有微量、无放射污染、准确、快速等优点, 已成功地用于遗传多样性检测、基因作图、品系分类及鉴定等。近几年在中药材中也得到了广泛应用, 如西红花^[3]、溪黄草^[4]、郁金^[5]、细辛^[6]、人参^[7]等。

诃子为我国重要南药之一, 为使君子科植物诃子 *Terminalia chebula* Retz. 和绒毛诃子的干燥成熟果实, 具有敛肺、敛肠之功效。目前市场流通的商品来源较为复杂^[8], 为准确鉴定和使用诃子药材, 我们应用 RAPD 技术进行了鉴定。对中药材的 RAPD 鉴别中尚存在如何统一模板浓度、模板降解度对反应的影响、合适引物的选择等问题进行了探讨。

1 材料和方法

1.1 材料: 见表 1, 所有样品均为原产地购买 (采集时间不详), 并由徐鸿华教授鉴定。

1.2 试剂 Tris (B.M.), SDS (serva), Marker (为加拿大 MBI 的 100bp DNA Ladder Plus), Taq 酶、随机引物 (上海 Sango), 琼脂糖 (Promega), 其余试剂均为国产分析纯。

1.3 主要仪器: 低温高速离心机 (Beckman GS-15R); 紫外-可见分光光度计 (Pharmacia 4000); 凝胶成像仪 (UVP GDS 7600G); 低温恒温式电泳仪 (LKB); PCR 仪 (PE 2400)。

1.4 DNA 提取: 称取各中药材样品 0.3 g 用玻璃砂研磨, 采用我们改进的高盐、低 pH 法^[9] 获得总 DNA。

1.5 DNA 扩增: 反应体积为 25 μ L。其成分为:

* Address: Huang Feng, Institute of Clinical Pharmacology, Guangzhou University of TCM, Guangzhou

黄 丰 男, 29 岁, 广州中医药大学 97 级博士生, 专业为中西医结合基础, 主要研究方向为分子生物学技术在中药鉴别中的应用。曾参加国家、部、省级课题共 6 个。已发表论文共 5 篇。参与编辑《免疫中药学》; 主编教材《分子生物学技术在中药鉴别中的应用》, 该书为国家级中医药继续教育项目用书。现在北京军事医学科学院博士后流动站, 研究方向为基因芯片 (2000 年 8 月开始)。E-mail: xytong@public.guangzhou.gd.cn

[△] 国家中医药管理局科研基金 (950379), 广东省五个一工程科研基金

MgCl₂ 2.5 μL (25 mmol/L), 引物 2 μL (5 μmol/L), BSA 1 μL (25 g/L), 4种 dNTP 0.25 μL (100 mmol/L), 10× buffer 缓冲液 2.5 μL (无 Mg²⁺), 2.0 U Taq 酶, 25 ng 样品。循环参数为先 94℃, 变性 3 min; 然后 94℃, 1 min; 39℃, 45 s; 72℃, 60 s; 35个循环 最后 72℃, 3 min

1.6 扩增产物检测: 取扩增产物 10 μL 于 1.5% 琼脂糖凝胶上用 × TAE 电泳缓冲液电泳, 用 EB 染色 30 min 于凝胶成像仪上进行分析

1.7 数据分析: 电泳图谱中每 1 条带代表 1 个引物结合位点, 根据分子迁移率及其有无进行统计: 有带计为 1, 无带计为 0 任意两个样本间的遗传差异用遗传距离指数 D 衡量

$$F = 2N_{xy} / (N_x + N_y) \quad D = 1 - F$$

F 为共享度, N_x N_y 分别为第 x 个和 y 个体拥有的 RAPD 标记数, N_{xy} 为 x 和 y 个体共享的 RAPD 标记数

采用 Phlip 软件包的 UPGMA 软件进行分析, 建立种系发生图

2 结果和讨论

2.1 DNA 提取: 核酸提取是核酸研究的第一步, 中药材加工运输的过程中, 均可能受到外源 DNA 的污染, 因此, 我们在取样之前, 先将样品洗净, 并用紫外照射 30 min 以去除外源 DNA 取样时, 最好选用核仁提取 DNA 经过反复提取, 发现各种诃子的皮和壳较难得到 DNA, 而种仁 DNA 含量较为丰富。但需注意的是, 仁含有较多油状物质, 必须用氯仿 异戊醇 (24: 1) 多抽提 1 次, 另外, 各样品 DNA 的 TE 溶液都为不同程度的黄褐色, 经纯化后也难以去除, 我们在 PCR 反应中加入了 BSA (1.0 g/L), 使 PCR 反应得到了有效扩增

2.2 DNA 模板浓度对 RAPD 结果的影响: 经过多次实验比较, 本研究采用了 25 ng/25 μL, 重复性较好。关于 RAPD 的最佳浓度有关报道不一, 通常在 10~ 100 ng 之间^[4, 5], 我们认为不同的品种其最佳扩增浓度可能是不相同的, 实验时应分别进行对比研究以找到最佳扩增浓度

2.3 反应介质: BSA 对 PCR 的扩增有一定影响^[10, 11], 在龟板和鳖甲的 PCR 扩增中用各种方法甚至 PROMEGA 的纯化试剂盒均不能去除反应中的抑制物, 但加入 BSA 后则获得了较好的扩增。许多中药材中所含杂质较多, 有时经多次纯化也难以去除, 所以在反应中加入 BSA 能中和抑制 PCR 反应的物质, 使反应顺利进行, 经过比较, 我们在实验时采用了 1.0 g/L (BSA) 进行 PCR 扩增, 得到了

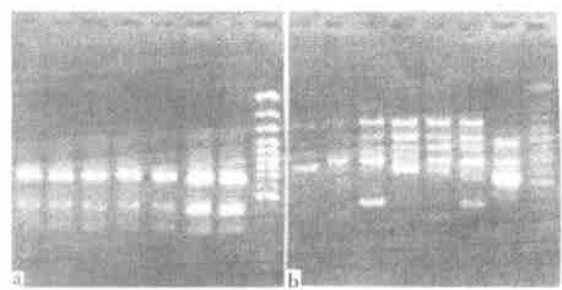
清晰的指纹图, 所以在反应中应当加入 BSA 以使 PCR 扩增顺利进行。另外, Mg²⁺、dNTP 也能影响扩增, 主要是影响某些弱带的扩增, 建议在各物质的有效扩增范围内, 应尽量选取偏低的浓度, 以减少非特异扩增

2.4 DNA 纯度及降解度: 在本研究中, 所用样品均为原产地干品, 所得 DNA 纯度大多较低 (见表 1), 说明有不同程度的杂质存在, 但经过稀释等处理后并不影响反应的进行^[12]。由于许多中药材均含有未知杂质, 有时难以提到纯度较高的 DNA, 研究发现只要采取适当措施^[11], 并不影响 PCR 的反应, 所以过多的纯化是不必要的。

表 1 样品基原

样品	产地	纯度 A260/A280
1. 绒毛诃子 <i>Terminalia chebula</i> var. <i>tomentella</i> Kurt.	云南	1.01
2. 诃子 <i>T. chebula</i> Retz.	广东	1.05
3. 小诃子 <i>T. chebula</i> Retz. f. <i>macrocarpa</i>	广东	1.05
4. 恒河诃子 <i>T. chebula</i> var. <i>gunguica</i> (Robx.) C. B. Clarke	广西	1.04
5. 银叶诃子 <i>T. argyrophylla</i> Pott et Prain.	云南	1.03
6. 大诃子 <i>T. chepula</i> f. <i>macrocarpa</i> nov. ined.	广东	1.06
7. 毛诃子 <i>T. billerica</i> (Gaertn.) Roxb.	云南	1.08

由于各种原因, 中药材大都降解程度较大, 所以用完整的基因组 DNA 来进行扩增是难以实现的, 但只要引物选择合适, 在 200~ 2 000 bp 内是能够扩增出有效 DNA 指纹图的 (图 1 表 2)。



左→右 (1~ 7 孔)
1-绒毛诃子 (云南) 2-诃子 (云南) 3-小诃子 (广东) 4-恒河诃子 (广西) 5-银叶诃子 (云南) 6-大诃子 (广东) 7-毛诃子 (云南) 8-Marker 从上至下为 3 000, 2 000, 1 500, 1 200, 1 031, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100
a-引物 S354 CACCCGGATG; b-引物 S30 GTGATC-GCAG

图 1 样品 DNA 指纹图

2.5 PCR 结果: 本实验所得 DNA 指纹图多态性的特征为: (1) 能够产生清晰 DNA 指纹图的引物少, 121 条引物仅筛选出 8 条, 占 6.6%, 根据这些引物可进行鉴别。 (2) 8 条引物中有 1 条各样品指纹图基本一致 (图 1-a), 7 条能产生多态性 (图 1-b 为其中一条), 低于我们在其他中药研究中的比率, 说

表 2 样品 DNA 指纹图

引 物	序 列
Primer	Sequence
S30	GTGATCGCAG
S161	ACCTGGACAC
S207	GGCAGGCTGT
S208	AACGGCGACA
S341	CCCGGCA TAA
S359	GGACACCACT
S429	TGCCGGCTTG
S443	CTGTTGCTAC
总数	8

表 3 7个样本间的遗传距离 (D)

	1	2	3	4	5	6	7
1	0.000 0						
2	0.612 9						
3	0.757 6	0.556 6					
4	0.657 1	0.526 3	0.150 0				
5	0.600 0	0.488 4	0.333 3	0.191 5			
6	0.764 7	0.567 6	0.230 8	0.122 0	0.260 9		
7	0.515 2	0.611 1	0.421 1	0.300 0	0.300 0	0.282 1	0.000 0

诃子的药用成分会产生何种影响,是值得深入研究的课题。

传统的中药鉴别方法主要靠外观性状特征,有经验的老药工根据药物的形状、大小、色泽、表面特征、质地、断面、气味等进行鉴别^[14],现代则从生物分类学、组织学、化学的角度建立了比较客观的中药质量评价标准^[15]。随着科学技术的迅速发展,染色体分析、同工酶分析、蛋白质分析及免疫测定^[16]等研究方法也广泛地应用到中药的品质评价中。

80年代,随着分子生物学的迅猛发展^[17,18],生物分类的手段从形态表征扩展到了生物

遗传物质 DNA, DNA 序列含有生命有机体构建维持和繁殖生命所必需的遗传信息^[19,20]。一方面,同种生物具有相同的 DNA 序列,保持同种生物体的遗传性状,具有相对的稳定性;另一方面,这些物种又具有多态性^[21,22],分子生物学的研究发现,生物的“物种”的多样性是由于其基因多态性所致,而基因的多态性可从分子水平进行检测,它比形态、组织、化学等传统的方法更能代表生物的遗传信息^[23],更能体现物种间的亲缘关系。因此,用基因的多态性来作为鉴别的依据,具有重要的意义,而 RAPD 技术的发展正适应了这种要求。药用诃子主

明各样品之间有着较近的亲缘关系。

2.6 多态性的遗传分析:按 1.7 中的公式进行了计算,结果见表 3

从图 2 中可看出,4 号(恒河诃子)与 6 号(大诃子)亲缘关系最近,而与 1 号(绒毛诃子)关系最远。现在关于诃子的品种及分类存在一定争论,从遗传树来看,绒毛诃子(1 号)与诃子(2 号)的相似性系数仅为 38.17%,应为诃子的变种,这与文献^[13]等观点一致。这种基因的改变除了已导致外观的改变外,对

要为植物诃子和绒毛诃子,但目前市场上的混用品较多,这些混用品的亲缘关系与药用品较近,化学成分较为类似^[7,12],常规方法较难区分。而 RAPD 技术利用 10 bp 的短引物以模板结合,PCR 扩增所得多态性丰富,根据这些多态所产生的差别,对于近缘属甚至同一品种不同产地的植物都可进行鉴别。

RAPD 技术本身对仪器设备要求不高,与其他方法结合使用,必将推动中药材鉴别技术的发展。

参 考 文 献

1 Nakai R, Shimashi S. Biol Pharm Bull, 1996, 19: 67
2 Cheng K T, Chang H C, Su C H, et al. Bot Bull Acad Sin (Taiwan), 1997, 38: 241
3 黄 丰,王培训,周 联,等. 中药新药与临床药理, 1999, 10 (4): 226
4 陈林姣,屈良鹄,施苏华,等. 中国中药杂志, 1998, 23(6): 328
5 陈敏亨,白守梅,程克棣,等. 中国中药杂志, 1999, 24(3): 131
6 黄璐璐,王 敏,周长征,等. 药学报, 1998, 33(10): 778
7 马小军,汪小全,孙三省,等. 药学报, 1999, 34(4): 312
8 徐鸿华,陈建南,赖小平等. 中药材, 1996, 19(3): 25
9 王培训,黄 丰,周 联,等. 中药新药与临床药理, 1999, 10 (1): 17
10 陈永久,张亚平. 动物学报, 1997, 18(2): 225
11 王亚明,周开亚,吴 平,等. 药学报, 1996, 31(6): 474
12 王培训,黄 丰,周 联,等. 中药新药与临床药理, 1999, (2): 113
13 广州中医药大学中药资源研究室. 中药资源开发利用研究论文集. 广州: 广东科技出版社, 1996: 74
14 沈保安,刘晓龙,吴秀清,等主编. 中药鉴定现代研究. 北京: 中国中医药出版社, 1998: 182
15 阎文玖,郭占峰,阎汝南,等主编. 中药材真伪鉴定. 北京: 人民卫生出版社, 1994: 1
16 毛文山,严智慧,马兴民,等主编. 中药材真伪鉴别. 西安: 陕西科学技术出版社, 1996: 14
17 Higuchi R G, Bownman B, Freiburger M, et al. Nature, 1984, 312: 184
18 Paaablo S, Giford J A, Wilson A C. Nuc Acid Res, 1988, 16: 7775

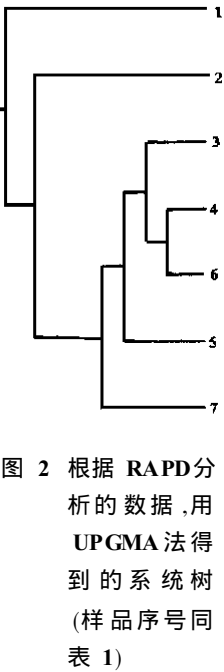


图 2 根据 RAPD 分析的数据,用 UPGMA 法得到的系统树(样品序号同表 1)

19 Baldwin B G. Molec Phylogen Evol, 1992, 1: 3

20 Bousquet J, Strauss S H, Doersen A H, *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1992, 89: 7844

21 Buchheim M A, Lemieux C, Otis C, *et al.* Mol Phylogent Evol, 1996, 5(2): 391

22 Chase M W, Soltis D E, olmstead R G, *et al.* Ann Mixxouri Bot Gard, 1993, 80: 528

23 王建云,付文,范亚刚. 中国药事, 1998, 12(6): 377

(2000-01-27收稿)

山东产木贼科草药形态解剖学的研究[△]

山东中医药大学 (济南 250014) 郭庆梅* 周凤琴

威海市中医院 王汝新

摘要 目的: 为山东产木贼科草药经典分类提供属种间形态解剖学依据。方法: 采用光镜和扫描电镜对山东产 2 属 5 种 1 变种木贼科草药进行了形态解剖学的研究。结果: 木贼属和问荆属在气孔类型、气孔保卫细胞表面附属物及内皮层层数等方面有显著差异; 山东木贼科植物维管束内均有侧生木质部。结论: 依据茎的内部结构和表面特征可将它们进行属间分类, 但属内种间差异较小。

关键词 木贼科 形态解剖学 分类

Morphological and Anatomical Studies on the Medicinal Material of *Equisetaceae* from Shandong Province

Shandong University of TCM (Ji'nan 250014) Guo Qingmei and Zhou Fengqin
Weihai Hospital of TCM Wang Ruxin

Adbstract The morphology and anatomy of two genera, five species and one variety of *Equisetaceae* produced in Shandong Province were studied under light and scanning electron microscope. There are remarkble differences between *Equisetum* L. and *Hippochatete* Milde in the type of stomas, attachments on the surface of stoma guard cells and the number of epithelial layers; and the presence of lateral xylem in all vasular bundle of *Equisetaceae* from Shandong. The results showed that they can be identified taxonomically according to their inner structual and epidermal characteristics of stem between different genera, but with little difference among species of same genus.

Key words *Equisetaceae* morphology and anatomy taxonomy

木贼科植物中一些种类作药材或民间药用。《本草纲目》载木贼有疏风散热、解肌退翳之功; 问荆能“主结气瘤痛, 上气气急”^[1]。据记载, 节节草功效与木贼相似^[2]; 犬问荆也可作问荆入药^[3]。山东产的 5 种 1 变种木贼科植物在各地均作民间药使用。由于本科植物外形相似, 共用性很多, 科以下等级分类较

难, 药材上混用现象较多, 而前人的研究多侧重于形态分类方面^[4,5]。我们对山东产 5 种 1 变种木贼科植物进行了内部结构及表面微形态的研究, 为药材鉴定和木贼科植物的分类提供了形态解剖学的依据。

1 材料和方法

1.1 材料: 见表 1

表 1 形态解剖学实验所用材料

植 物 名	产 地	标本号
节节草 <i>Hippochaete ramosissimum</i> (Desf.) Boerner	鲁西北地区	李建秀 70022 70023
中日节节草 <i>H. ramosissimum</i> var. <i>japonicum</i> (Milde) J. X. Li et F. Q. Zhou	东营黄河三角洲	李建秀、周凤琴 890-92
问荆 <i>Equisetum arvense</i> L.	蒙山	李建秀 850-510
草问荆 <i>E. pratense</i> Ehrh.	牙山	李建秀 980-51
林下问荆 <i>E. sylvaticum</i> L.	崂山	李建秀 980-146
犬问荆 <i>E. palustre</i> L.	昆崮山	李建秀 960-518

* Address: Guo Qingmei, Shandong University of TCM, Ji'nan
郭庆梅 1989 年于吉林农业大学获学士学位, 1994 年于山东大学获硕士学位, 讲师, 现主要从事药用植物研究, 已发表论文数篇
[△]山东省自然科学基金项目 Y95C1335