

· 综述 ·

基于 PCR技术的中药 DNA分子标记鉴别

李晓波^{1,2,3}, 伏见裕利², 小松かつ子², 王峥涛³, 徐璐珊³

(1. 上海交通大学, 上海 200030; 2. 日本富山医科药科大学, 富山 930-0194; 3. 中国药科大学, 江苏 南京 210038)

摘要: 综述基于 PCR技术的中药 DNA分子鉴别研究, 重点论述了 RAPD法和 DNA直接测序法的应用, 提出了 DNA分子鉴别研究的思路与实验设计。

关键词: 中药鉴定; DNA指纹图谱; DNA直接测序; DNA分子标记

中图分类号: R282.710.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2670(2002)08-0760-03

Identification of DNA molecular marker in Chinese materia medica on PCR-basis

LI Xiao-bo^{1,2,3}, FU SHIMI H², KOMATSU K², WANG Zheng-tao³, XU Luo-shan³

(1. Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200030, China; 2. Toyama Medical and Pharmaceutical University, Toyama 930-0194, Japan; 3. China Pharmaceutical University, Nanjing 210038, China)

Key words identification of Chinese materia medica; DNA fingerprint; DNA direct sequencing; DNA molecular marker

作为应用基础学科的中药鉴定学, 其研究技术与手段是随相关基础学科, 如植物解剖学、分析化学、生物化学、分子生物学等的发展而不断更新和发展的。近年来, PCR(Polymerase Chain Reaction)技术带来的基因操作的变革, 使PCR技术不仅在医学、农学、系统与进化生物学研究中广泛应用, 同时也渗透到中药鉴定的研究与应用领域。自1994年Cheung^[1]首次将任意引物PCR(Arbitrarily Primer PCR, AP-PCR)技术引入中药鉴定学, 几年来结合PCR技术鉴别中药的研究得到了极大的发展, 并正在逐渐成为中药鉴定的一种新方法——DNA分子标记鉴别。

1 基于PCR技术的DNA分子标记鉴别研究

基于PCR技术的DNA分子标记鉴别的研究方法依据分析对象可分为两类: 其一是采用检测基因组DNA的多态, 如随机扩增多态性DNA(Random Amplified Polymorphic DNA, RAPD)、AP-PCR扩增内切酶片断多态性(Amplified Restriction Fragment Length Polymorphism, ARFLP)等方法, 又称为PCR-DNA指纹法; 其二是检测特定片断DNA的多态, 即以特定的基因(或短片断的DNA)为研究对象, 如PCR产物的限制性片断长度多态性(PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism, PCR-RFLP)、等位基因特异PCR(Allele-Specific PCR, AS-PCR)、DNA直接测序等方法。

1.1 检测基因组DNA的多态: 研究应用较多的是RAPD法, 具有快速、简捷、灵敏度高等特点。但RAPD法的重复性差问题曾引起许多争议^[2], 汪小全等^[3]采用大量对照实验,

并结合他人的研究结果, 对RAPD技术作出了“可以应用于种间乃至近缘属之间的亲缘关系的研究, 但有一定的局限性”的结论。

在Cheung^[1]采用AP-PCR法获得可以区别西洋参 *Panax quinquefolius* L. 和人参 *P. ginseng* C. A. Mey的指纹图谱之后, Shaw^[4]采用AP-PCR和RAPD技术对人参、西洋参和三七 *P. notoginseng* (Burk.) F. H. Chen 3种人参药材及桔梗 *Platycodon grandiflorum* (Jacq.) A. DC.、紫茉莉 *Mirabilis jalapa* L.、土人參 *Talinum paniculatum* (Jacq.) Gaertn. 和商陆 *Phytolacca acinosa* Roxb. 4种伪品进行了鉴别研究。丁建弥^[5]在比较野山人参和栽培人参的80个引物的RAPD图谱中, 发现一个引物能产生稳定的、可重复的野生山参的特征条带, 可以用来鉴定野山人参。Yamazaki^[6]分析不同产地的5种甘草属植物(光果甘草 *Glycyrrhiza glabra* L.、甘草 *G. uralensis* Fisch.、刺毛甘草 *G. echinata* L.、刺果甘草 *G. pallidiflora* Maxim.、胀果甘草 *G. inflata* Batal.)的DNA指纹图谱, 并以此鉴定了4种药材(Afghan Licorice, Soviet Licorice, 西北甘草, 新疆甘草)。此外, 还有苦地胆^[7]、蒲公英^[8]、郁金^[9]、金钱莲^[10]、溪黄草类^[11]、铁线莲属^[12]、木蓝属^[13]和黄连属^[14]的应用。RAPD技术的鉴别研究报道。对于动物类药材的鉴别研究, 王义权等^[15]获得了可以正确区别乌梢蛇及3种混淆品、金钱白花蛇及2种伪品的RAPD图谱。此外, Cheng^[16]将RAPD指纹图谱鉴别法用于区别正品冬虫夏草及含伪品的虫草。

RAPD指纹图谱鉴别不仅被用于单味药材, 也被用于复

* 收稿日期: 2002-01-08

基金项目: 中国博士后科学基金(1998年第24批); 归国人员基金资助项目(教外司留98679号)

作者简介: 李晓波(1963-), 女, 回族, 博士, 1991-1998年赴日留学攻读学位, 主要从事生药学、分子生物学研究。Tel (021) 62933467
E-mail: xlbli@mailsjtu.edu.cn

方制剂中的组成药的鉴别,如采用 RAPD法检测“玉屏风散”中的白术、黄芪、防风 3味生药^[17]。

由于中药材不同于新鲜的动植物材料,在加工、炮制、贮藏等过程中 DNA受到一定程度的降解甚至严重的降解,而模板 DNA的降解程度直接影响 RAPD产物^[18,19],因此 RAPD法在中药材鉴别的广泛应用还有待进一步的探讨。

1.2 检测特定片断 DNA的多态:在检测特定片断 DNA的多态的方法中,DNA直接测序法是在对目的基因的 DNA序列分析基础上,采用 PCR-RFLP 突变等位基因 (Mutant Allele Specific Amplification, MASA)以及 ASPCR法对药材进行鉴别。DNA直接测序具有可在严重降解的药材 DNA中扩增出特定的序列片断,而且有较高的重复性和稳定性,不需要克隆,省时、省力,可分析杂合等位基的特点。既可避免因药材的特性造成的误差,又具高度的专属性。

Fushimi等^[20]利用 18S rRNA基因的序列差异鉴别中国川芎 *Ligusticum chuanxiong* Hort. 和日本川芎 *Cnidium officinale* Makino;在对人参、西洋参和竹节人参的 18S rRNA基因进行序列分析后,用 Ban II 和 Ddd 对该基因的 PCR产物进行消化反应,所获得的酶切图谱以及应用 MASA法特异扩增 18S rRNA 基因片断均可鉴别人参、西洋参和竹节人参 3种药材^[21]。Mizukami^[22]比较分析了当归 *Angelica acutiloba* (Seb. et Zucc.) Kitag., 三岛柴胡 *Bupleurum falcatum* acut. sin. non L. 和珊瑚菜 *Glehnia littoralis* Fr. Schmidt ex Miq. 的 5S rRNA基因的间隔区的碱基序列,针对该 DNA片断的序列差异,选用限制性内切酶 Hind III消化 PCR产物,所获得的图谱可鉴别 3种药材。分析苍术属植物的 trnK基因,并用 PCR-RFLP法对 trnK基因的 PCR产物进行 Hinf I 酶消化,可鉴别出白术 *Atractylodes ovata* Thunb.^[23]。Kondo^[24]对半夏 *Arum ternatum* Thunb. 和天南星 *Arisaema heterophyllum* Blume的原植物及药材的 rbcL基因的部分序列进行分析,结果显示其 DNA序列分为 7个类型,以此更易鉴别半夏。Ma等^[25]测定分析了西红花 *Crocus sativus* L., 红花 *Carthamus tinctorius* L. 以及易混品萱草 *Heimerocallis fulva* (L.) L., 黄花菜 *Heimerocallis citrina* Baroni的 5S rRNA间隔区序列。

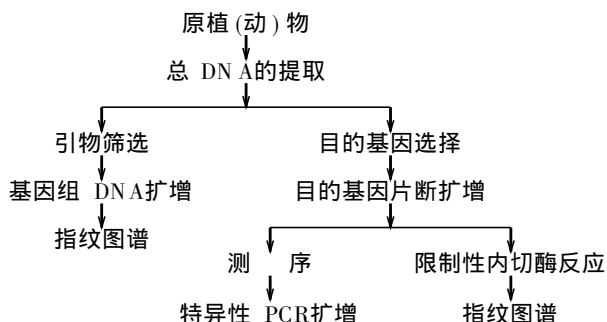
王义权等^[26]对蛇类药材的 cytb基因片断序列分析基础上,设计了金钱白花蛇 PCR鉴别的一对高特异性引物—BuL-1和 BuH-1,用此引物能在药材粉末中检测出被检样品中是否含有金钱白花蛇。通过测定线粒体 DNA的 12S rRNA基因序列,也能区别其原动物和药材种类,如龟板^[27]、海马^[28]、蛇胆^[29]、壁虎^[30]。Hashimoto^[31]等用 PCR方法扩增了鹿茸、蝮蛇和海马的 12S rRNA和 cytb基因片断,并对鹿茸的 PCR产物进行了测序,结果表明动物类药材可以用标准的药材作参照,同时进行 PCR扩增,经电泳检测达到鉴别的目的,同时还建立了制剂中鹿茸的检测方法^[32]。

2 基于 PCR技术的 DNA分子标记鉴别的实验设计

DNA分子标记鉴别研究可分为 2个阶段:一是对基原植(动)物的 DNA多态的检测,即在比较碱基序列多样性的

基础上,确定具有种群区别意义的区段或位点;二是对药材的鉴别应用,即鉴别方法的可行性验证。

总 DNA的提取是研究过程的第一步,也是关键步骤。新鲜材料的 DNA提取分离的常规方法比较成熟,而对于中药材来说,一般因加工、干燥、储藏等过程使高质量 DNA提取受到很多因素的限制,如易受到细胞中抑制 PCR成分的影响,如蛋白质、多糖、多酚类物质等。此外,不同的药材其炮制方法不同,应探讨适用于不同药材的 DNA分离提取方法。总结 DNA分子标记鉴别研究可按以下流程进行实验设计:



3 结语

利用 DNA分子的特征进行物种鉴别的 DNA分子标记鉴别法,与现有的中药鉴别方法相比具有以下主要特点: 1) 准确性高、重现性好,真实、稳定、可靠; 2) 不受样品形态的限制,原药材、饮片、粉末乃至含有生药原型的中成药(丸剂、散剂等)均可应用; 3) 所需检样量少,对珍稀药材及化石标本的鉴定更具应用价值; 4) PCR技术的快速、便捷性使得 DNA分子标记鉴别法更适宜推广使用。

中药鉴定是以鉴定药材的真伪优劣为目的,根据不同药材的特点,选择不同的分析方法。结合现有的鉴别方法,建立既能反应中药材整体固有特点又能给出稳定的中药质量评价标准的鉴定方法,将是今后中药鉴定研究的热点。

参考文献:

- [1] Cheung K S, Kwan H S, But P P H, et al. Pharmacognostical identification of American and oriental ginseng roots by genomic fingerprinting using arbitrarily primer polymerase chain reaction (AP-PCR) [J]. J Ethnopharmacol, 1994, 42: 67-69.
- [2] 刘春林,官春云,李 梅. 植物 RAPD标记的可靠性研究 [J]. 生物技术通报, 1999, 2: 31-34.
- [3] 汪小全,邹喻苹,张大明,等. RAPD应用于遗传多样性和系统研究中的问题 [J]. 植物学报, 1996, 38(12): 954-962.
- [4] Shaw P C, But P H. Authentication of *Panax* species and their adulterants by random-primed polymerase chain reaction [J]. Planta Med, 1995, 61: 466-469.
- [5] 丁建弥,万树文,梅其春,等. 用随机扩增多态 DNA(RAPD)技术鉴定野山人参 [J]. 中成药, 2001, 23(1): 3-5.
- [6] Yamazaki M, Sato A, Shimomura K, et al. Extraction of DNA and RAPD analysis from dried Licorice root [J]. Nat Med, 1995, 49(4): 488-490.
- [7] 曹 晖,毕培曦,邵鹏柱. 中药材苦地胆及其混淆品的 DNA指纹鉴定 [J]. 药学学报, 1996, 31: 543-553.
- [8] 曹 晖,毕培曦,邵鹏柱. 香港市售蒲公英及其混淆品蒲公英的 DNA指纹鉴别 [J]. 中国中药杂志, 1997, 22(4): 197-200.
- [9] 陈毓亨,白守梅,程克棣,等. 温郁金和川郁金的 RAPD研究

- [J]. 中国中药杂志, 1999, 24(3): 131-133.
- [10] 胡珊梅, 张启国, 袁文杰, 等. 珍稀中草药金线莲的 RAPD 研究 [J]. 中草药, 2000, 31(12): 944-946.
- [11] 陈林姣, 屈良鸽, 施苏华, 等. RAPD 技术在溪黄草类原植物鉴别中的应用 [J]. 中国中药杂志, 1998, 23(6): 328-330.
- [12] 张荣, 邵建本, 田学明, 等. RAPD 分析法对铁线莲属 7 种中药的鉴定研究 [J]. 中草药, 1996, 27(11): 686-687.
- [13] 张荣, 张步振, 叶浩. 用 RAPD 分析法鉴定木蓝属生药 [J]. 中国中药杂志, 1997, 22(2): 72-73.
- [14] Cheng K T, Chang H C, Su C H, *et al.* Identification of dried rhizomes of coptis species using random amplified polymorphic DNA [J]. Bot Bull Acad Sinica, 1997, 38: 241-244.
- [15] 王义权, 周开亚. 蛇类药材的分子遗传标记鉴别的初步研究 [J]. 药学报, 1997, 32(5): 384-387.
- [16] Cheng K T, Su C H, Chang H C, *et al.* Differentiation of genuines and counterfeits of Cordyceps species using Random Amplified Polymorphic DNA [J]. Bot Bull Acad Sinica 1997, 38: 241-244.
- [17] Cheng K T, Tsay H S, Chen C F, *et al.* Determination of the components in a Chinese prescription Yu-Ping-Feng-San by RAPD analysis [J]. Planta Med, 1998, 64: 563-565.
- [18] 黄璐琦, 王敏, 周长征. RAPD 方法在药材鉴别研究中的问题及其对策 [J]. 药学报, 1998, 33(10): 778-784.
- [19] 王培训, 黄丰, 周联, 等. RAPD 在商品药材中若干问题的探讨 [J]. 中药新药与临床药理, 1999, 10: 112-115.
- [20] Fushimi H, Komatsu K, Isobe M, *et al.* A new approach for the identification of a Chinese Traditional Medicine, “Chuan-xiong” by 18S ribosomal RNA gene sequence [J]. Phytomedicine, 1996/97, 3(4): 387-389.
- [21] Fushimi H, Komatsu K, Isobe M, *et al.* Application of PCR-RFLP and MASA analysis on 18S ribosomal RNA gene sequence for the identification of three ginseng drugs [J]. Biol Pharm Bull, 1997, 20(7): 765-769.
- [22] Mizukami H. Amplification and sequence of a 5S rRNA gene spacer region from the crude drug “Angelica Root” [J]. Biol Pharm Bull, 1995, 18(9): 1299-1301.
- [23] Mizukami H, Shimizu R, Kohjiyuma M, *et al.* Phylogenetic analysis of *Atractylodes* plants based on chloroplast trnK sequence [J]. Biol Pharm Bull, 1998, 21(5): 474-478.
- [24] Kondo K, Terabayashi S, Higuchi M, *et al.* Discrimination between “Banxia (半夏)” and “Tiannanxing (天南星)” based on rbcL sequence [J]. Nat Med, 1998, 52(3): 253-258.
- [25] Ma X Q, Zhu D Y, Li S P, *et al.* Authentic identification of stigma croci (stigma of crocus sativus) from its adulterants by molecular genetic analysis [J]. Planta Med, 2001, 67: 183-186.
- [26] 王义权, 周开亚, 徐珞珊, 等. 金钱白花蛇及其伪品的 cytb 基因序列分析和 PCR 鉴别研究 [J]. 药学报, 1998, 33(12): 941-947.
- [27] 吴平, 周开亚, 徐珞珊, 等. 中药材龟甲的分子鉴别研究 [J]. 药学报, 1998, 33(4): 304-309.
- [28] 吴平, 周开亚, 张朝晖, 等. 海马类药材分子遗传标记鉴定研究 [J]. 药学报, 1998, 33(3): 226-233.
- [29] 刘向华, 王义权, 刘忠权, 等. 中药材蛇胆的 DNA 分子标记鉴定研究 [J]. 药学报, 2001, 36(3): 229-232.
- [30] Liu Z Q, Wang Y Q, Zhou K Y, *et al.* Authentication of Chinese crude drug, gecko, by allele-specific diagnostic PCR [J]. Planta Med, 2001, 67: 385-387.
- [31] Hashimoto A, Nishimura N, Kokusenya Y, *et al.* Studies on “Signal” constituents for evaluation of animal crude drugs IV: application of DNA analytical technique to quality evaluation of medicines containing animal crude drugs [J]. Nat Med, 1998, 52(1): 38-46.
- [32] 桥本晶夫, 西村信幸, 西博行, 等. 动物生药の指标成分の探索 (第 6 报) DNA 分析制剂中鹿茸确认法 [J]. 药学杂志, 1999, 119: 178-183.

乌檀属植物的吲哚类生物碱成分研究进展

康文艺¹, 杨小生², 赵超², 郝小江¹

(1. 中国科学院昆明植物研究所 植物化学与西部资源持续利用国家重点实验室, 云南 昆明 650204; 2. 贵州省中科院天然产物化学重点实验室, 贵州 贵阳 550002)

摘要: 对乌檀属植物吲哚类生物碱的植物资源、骨架结构、波谱学特征及生物活性进行了阐述, 对其吲哚生物碱的植物资源进行了归纳, 为其开发提供了方向。

关键词: 乌檀属植物; 吲哚类生物碱; 苕类吲哚生物碱

中图分类号: R284.11 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2670(2002)08-0762-04

Advances in studies on indole alkaloids of *Nauclea* L.

KANG Wen-yi¹, YANG Xiao-sheng², ZHAO Chao¹, HAO Xiao-jiang¹

(1. State key Lab of Phytochemistry and Continued Application of Plant Resources in West China, Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650204, China; 2. Key Lab of Chemistry for Natural Products of Guizhou and Chinese Academy of Sciences, Guiyang 550002, China)

Key words *Nauclea* L.; indole alkaloids; glycosidic indole alkaloids

* 收稿日期: 2001-12-14

作者简介: 康文艺 (1971-), 男, 黑龙江人, 在读博士, 研究方向为药用植物化学。

E-mail: kangweny@hotmail.com