

· 中药现代化论坛 ·

一种中药鉴定 gDNA 芯片的制备与展望

李同祥^{1,2}, 王进科¹, 王小兰^{1,2}, 陆祖宏^{1*}

(1. 东南大学 教育部分子与生物分子电子学重点实验室, 江苏 南京 210096; 2. 甘肃广播电视大学, 甘肃 兰州 730030)

摘要: 中药鉴定是中药质量控制系统的首要环节, 中药鉴定技术的不断发展提高了药材品质评价水平。至今, 中药鉴定技术经历着从传统生药鉴定学的细胞和亚细胞水平向遗传物质 DNA 分子水平发展的历程, 运用 DNA 芯片技术进行中药鉴定成为中药鉴定发展的方向之一。介绍了筛选 gDNA 种特异性探针的抑制性差减微阵列“SSH-array”新技术, 该技术是将抑制性差减杂交与基于尼龙膜微阵列杂交相结合。以名贵中药材石斛 5 个品种作为实验材料, 首先是用抑制性差减杂交获得 2 个品种之间的 gDNA 差异片段, 然后用这些 gDNA 差异片段与由所有研究品种的 gDNA 制备成的微阵列杂交筛选到某一个品种的种特异性 gDNA 片段。这些种特异性 gDNA 探针作为种特异性探针进行物种鉴定。在此基础上建立中药鉴定 gDNA 芯片的方法并对其应用进行了展望探讨。

关键词: 中草药鉴定; 种质特异性 DNA 探针; gDNA 芯片

中图分类号: R282.5

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2005)07-0961-04

Preparation and prospect of gDNA microarray for species identification of Chinese materia medica

LI Tong-xiang^{1,2}, WANG Jin-ke¹, WANG Xiao-lan^{1,2}, LU Zu-hong¹

(1. National Laboratory for Molecular and Biomolecular Electronics, Southeast University, Nanjing 210096, China;

2. Gansu Radio TV University, Lanzhou 730030, China)

Abstract: The identification of traditional Chinese herbs (TCH) is very important in the quality control system of TCH. The development of the TCH identification techniques has improved the quality evaluation level of TCH. By so far, the TCH identification techniques have been developed from traditional pharmacognostic identification methods based on cell and sub-cell to genetic DNA (gDNA) level. It is a tendency to use DNA microarray to identify the species of TCH in recent years. In this review, a new method called suppression subtraction hybridization and DNA array (SSH-array) was introduced, which combined the SSH technique with microarray hybridization based on nylon film. Five plants from *Dendrobium* Sw. were used as experimental materials. Firstly the differential gDNA fragments between two species by SSH-array were obtained and then the differential gDNA fragments with the microarrays made up of multiple whole genomes from several species were hybridized to screen the unique gDNA fragments for one species. The screened unique gDNA fragment can be used as species-specific probes for identifying the species. Based on the method, a procedure for species identification of TCH was established with gDNA microarray and its applied prospects were discussed.

Key words: identification of traditional Chinese herbs; species-specific DNA probes; gDNA microarray

我国药材资源丰富,但目前使用的药材来源复杂,时有互混、互代、以假充真现象存在,严重影响中药使用安全有效和中药质量水平,因此,对各种药材进行快速、准确、高通量鉴定十分重要。然而,传统的鉴定方法主要是基于形态学^[1,2]、解剖学^[3]和化学成

分分析^[4]的方法,这些方法易受到环境及发育条件的影响。为了克服传统的鉴定方法的不足,许多以遗传物质为基础的分子生物学方法成功地应用于物种的鉴定,如 ribotyping^[5,6]、随机扩增多态性 DNA (random amplified polymorphic DNA, RAPD)^[7,8]、

收稿日期: 2004-11-09

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30371750); 国家高技术研究计划(2001AA2Z2012, 2002AA2Z2041)

作者简介: 李同祥(1966-), 男, 甘肃兰州人, 副教授, 生物医学工程博士, 研究方向为分子生物学和生物芯片。

E-mail: ltxiang@seu.edu.cn

* 通讯作者 陆祖宏 Tel: (025)83619983 E-mail: zhlu@seu.edu.cn

16S-23S 间隔转录区 PCR 扩增(PCR amplification of the internal transcribed spacer 16S-23S, ITS 16S-23S PCR)^[9]、ITS-PCR-RFLP^[10]、特异鉴别 PCR(PCR-specific identification)^[11]和 mip 基因测序(mip gene sequencing)^[12]。这些方法为基于基因组序列的物种鉴定提供了可能的工具。但是这些方法检测过程烦琐或结果的不稳定^[5]使它们没有成为常规和可靠的物种鉴定方法。

DNA 芯片技术的出现为高通量中药鉴定提供了良好的发展前景。虽然 DNA 芯片技术已广泛应用于 DNA 测序(sequencing by hybridization, SBH)、单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphisms, SNPs)分析、基因表达分析、基因诊断、药物筛选、物种鉴定等各个方面,但在中药鉴定方面,有限的种特异性探针数量及鉴定的准确性成为应用基于探针的 DNA 芯片技术进行高通量中药鉴定的瓶颈。为此笔者提出了两种可能的方法以促进生物芯片的中药鉴定,一是在整个基因组寻找可用于中药鉴定的大量种特异性探针,另一是使用多重特异性探针进行物种鉴定。本文就抑制性差减阵列(suppression subtraction hybridization and array, SSH-array)技术^[13]进行大量的种特异性探针筛选和中药鉴定 gDNA 芯片的制备技术流程作一介绍,同时对其应用的前景进行了展望。

1 “SSH-array”技术的大量种特异性探针筛选

1.1 差异片段的制备:差异片段的制备是按照抑制性差减杂交方法^[14]进行。利用链内退火优于链间退火,且比链间退火更稳定,从而使非目的序列片段两端反向重复序列在退火时产生类似于“钢柄”的结构,无法与引物配对,选择性地抑制了非目的片段的扩增而使目的片段大量的扩增富集。抑制性差减杂交与差异片段的富集见图 1。

首先,用 CTAB 法提取各石斛品种基因组 DNA,用识别 4 个碱基的 Rsa I 酶酶切,酶切产物为平头末端,理论上每 256 个碱基就有一个酶切位点,其酶切片段大小在 150~500 bp,主条带区在 250 bp。再次,设计合成一对用于套组 PCR 的接头 1 (Adaptor 1) (5'-CTAATACGACTCACTAT-AGGGCTCGAGCGGCCCGCCGAGGT-3')和接头 2 (Adaptor 2) (5'-CTAATACGACTCACT-ATAGGGCAGCGTGGTTCGCGGCCGAGGT-3'),引物 1 (Primer 1) (5'-CTAATACGACTCACTATAGGGC-3')和一对套组 PCR 引物 1 (Nested PCR Primer 1) (5'-TCGAGCGGCCG-

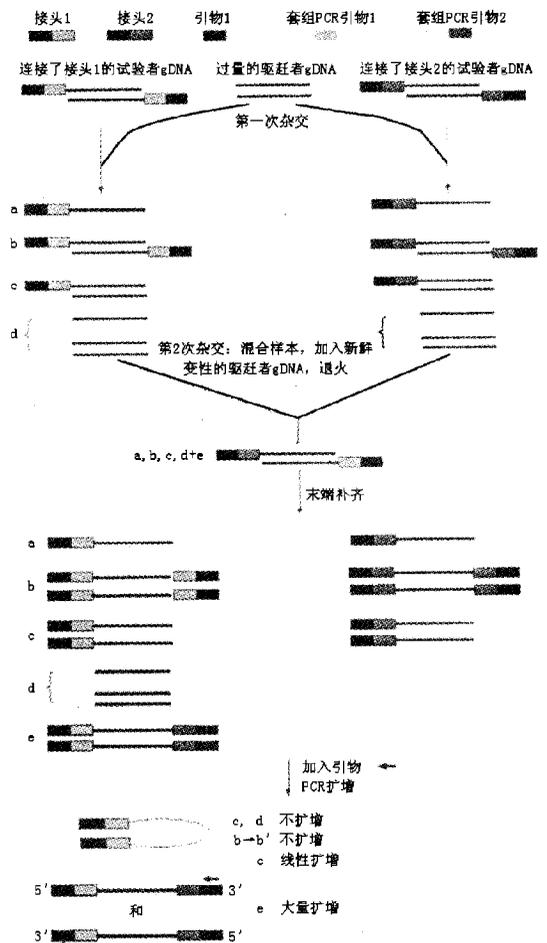


图 1 抑制性差减杂交与差异 DNA 片段的富集图
Fig. 1 Schema of SSH and differential DNA fragments enrichment

CCGGCAGGT-3')和套组 PCR 引物 2 (Nested PCR Primer 2) (5'-AGCGTGGTTCGCGGCCGAGGT-3')。然后进行两次差减杂交和两次 PCR 扩增。
1.1.1 两次差减杂交:第 1 次差减杂交时,用过量的驱赶者(Driver)加入到分别连接了 Adaptor 1 和 Adaptor 2 的试验者(Tester)(即 Adaptor 1-Tester 和 Adaptor 2-Tester)中加热变性后分别退火杂交,则 Tester 和 Driver 中相同的片段形成双链,而留下各自有差别的片段。第 2 次差减杂交时,将第 1 次杂交后的产物混合,再加入新制备的变性的 Driver,再次退火杂交。在 Tester 和 Driver 样本之间所存在的那些有差异的片段进一步得到富集。
1.1.2 两次 PCR 扩增:差减杂交产物需经 2 次 PCR 才能有效地扩增差异片段。首先用 Primer 1 进行第 1 次扩增,再用 Nested PCR Primer 1 和 Nested PCR Primer 2 进行第 2 次扩增。在 PCR 反应中,

只有(e)类 DNA 片段能以指数级扩增。而其他形式,如(a)、(d)类无引物结合点,不能扩增,(b)类两端均为同一接头,链内退火优于链间退火。因此,在链内形成互补结构(发夹或柄环结构)的可能性和稳定性均大于引物与其配对结合的可能性和稳定性。故不能被扩增。使得目标 DNA 片段(e)得到大量的富集(图 1)。

1.2 差异片段的克隆:用差减 PCR 产物建立一个标准的 10 μL 连接反应体系(10×T4 ligation buffer 1 μL, T-vector 1 μL, 差减 PCR 产物 7 μL, T4DNA ligase 1 μL),在 16 °C 连接过夜。连接物转化大肠杆菌,挑取白色重组子克隆,挑取的克隆转入含有 LB 培养基的 96 孔培养板中,在 37 °C 和 200~250 r/min 条件下振荡培养过夜。

1.3 差异克隆的标记:取 0.5 μL 培养饱和菌液加入到反应体积为 50 μL/孔的 96 微孔板中(1 μmol/L DIG-Nested PCR Primer 1、1 μmol/L Nested PCR Primer 2、0.1 U/μL Taq Polymerase、200 μmol/L dNTPs)扩增标记差减克隆,这里采用 Nested PCR Primer 1 和 Nested PCR Primer 2 代替 T-vector 的正反引物来扩增重组克隆,大大的提高了阳性克隆率,阳性克隆率最低 78.1%,最高 84.6%,阳性克隆率平均达到 82.3%。差减杂交组合及阳性克隆率见表 1^[13]。

表 1 抑制性差减杂交阳性克隆率

Table 1 Positive clones ratios of SSH

品 种	差减克隆	Tester	Driver	阳性克隆	阳性克隆率/%
选鞘石斛	192	选鞘石斛	金钗石斛	155	80.7
铁皮石斛	192	铁皮石斛	选鞘石斛	161	83.8
金钗石斛	192	金钗石斛	选鞘石斛	166	86.4
鼓槌石斛	192	鼓槌石斛	流苏石斛	158	82.3
流苏石斛	192	流苏石斛	铁皮石斛	150	78.1

1.4 gDNA 微阵列的制备:通过 SSH 只能获得不同种两两之间差异克隆,而不能获得某一品种的特异性片段。为了筛选到某一品种的特异性探针,将提取的 5 种石斛,即选鞘石斛、铁皮石斛、金钗石斛、鼓槌石斛、流苏石斛的 gDNA,用 Rsa I 酶切后,加入变性液(0.5 mol/L NaOH, 1.5 mol/L NaCl)变性,点样并固定在尼龙膜上制备成 gDNA 微阵列用于杂交筛选。

1.5 地高辛(DIG)标记的差减克隆与 gDNA 微阵列的杂交筛选: DIG 标记的差减克隆在 98 °C 变性,变性后的克隆和经 60 °C 预杂交的含有 gDNA 微阵列的尼龙膜在 62 °C 杂交过夜。经适当浓度的 SSC

(氯化钠/柠檬酸钠)、SDS(十二烷基硫酸钠)溶液洗涤,进行免疫学检测,那些只与它所代表品种的 gDNA 杂交而不与其他 4 种石斛 gDNA 杂交的差异克隆即为该品种的种特异性探针。5 对杂交组合中种特异性探针的阳性探针筛选率最低 7.9%,最高 14.6%,平均达到 12.1%(表 2)^[13],具有较高的筛选效率。用筛选到的其中两个探针进行了石斛样本的鉴定,分别来自于铁皮石斛和鼓槌石斛的两个种特异性探针均能准确检测出它们的靶目标。

表 2 种特异性探针的筛选率

Table 2 Screening ratios of species-specific probe

品 种	筛选的差减克隆	Tester	Driver	特异性探针数	种特异性探针率/%
选鞘石斛	41	选鞘石斛	金钗石斛	6	14.6
铁皮石斛	43	铁皮石斛	选鞘石斛	5	11.6
金钗石斛	31	金钗石斛	选鞘石斛	3	9.7
鼓槌石斛	62	鼓槌石斛	流苏石斛	8	12.9
流苏石斛	25	流苏石斛	铁皮石斛	3	12.0

2 中药鉴定 gDNA 芯片制备主要技术流程

以尼龙膜为支持材料,建立了中药鉴定 gDNA 芯片主要技术流程(图 2)。

2.1 大量的种特异性探针筛选:寻找、筛选中药的种特异性 DNA 序列即探针是 DNA 芯片技术能否成功应用于中药鉴定的关键。要实现 DNA 芯片技术鉴定中药,必须获得大量的种质特异性探针,在此基础上才能开展 DNA 芯片中药鉴定。如前所述,以选鞘石斛、铁皮石斛、金钗石斛、鼓槌石斛、流苏石斛为实验材料,以尼龙膜为支持材料,用“SSH-array”技术成功筛选到了一定数量的种质特异性探针。

2.2 种质特异性探针制备 gDNA 芯片(gDNA 微阵列):使用人工或标准机器点样仪将获得的种特异性探针点样在尼龙膜上,98 °C 烘烤 20 min 将其固定在膜上,可使用未纯化的 PCR 产物探针点样,其点样过程比点样到其他固相支持物表面更简单。

2.3 待鉴样品 DNA 的提取、扩增及标记:待鉴样品 DNA 的提取与进行种质特异性探针筛选时方法相同。gDNA 用 Rsa I 酶切后,连接接头 3(Adaptor 3) (5'-AGGCAACTGTGCTATCCGAGGGAA-3'),用 DIG 标记的引物 3(DIG-primer 3)(5'-AGGCAACTGTGCTATCCGAGGGAA-3')扩增标记,其标记的 PCR 产物直接用于杂交鉴定。

2.4 检测样品 DNA 与芯片杂交:杂交过程与 DIG 标记的差异克隆与 gDNA 微阵列的杂交筛选一样, DIG 标记的检测样品 DNA 在 98 °C 变性,变性后和经 60 °C 预杂交的含有 gDNA 种特异性探针微阵列

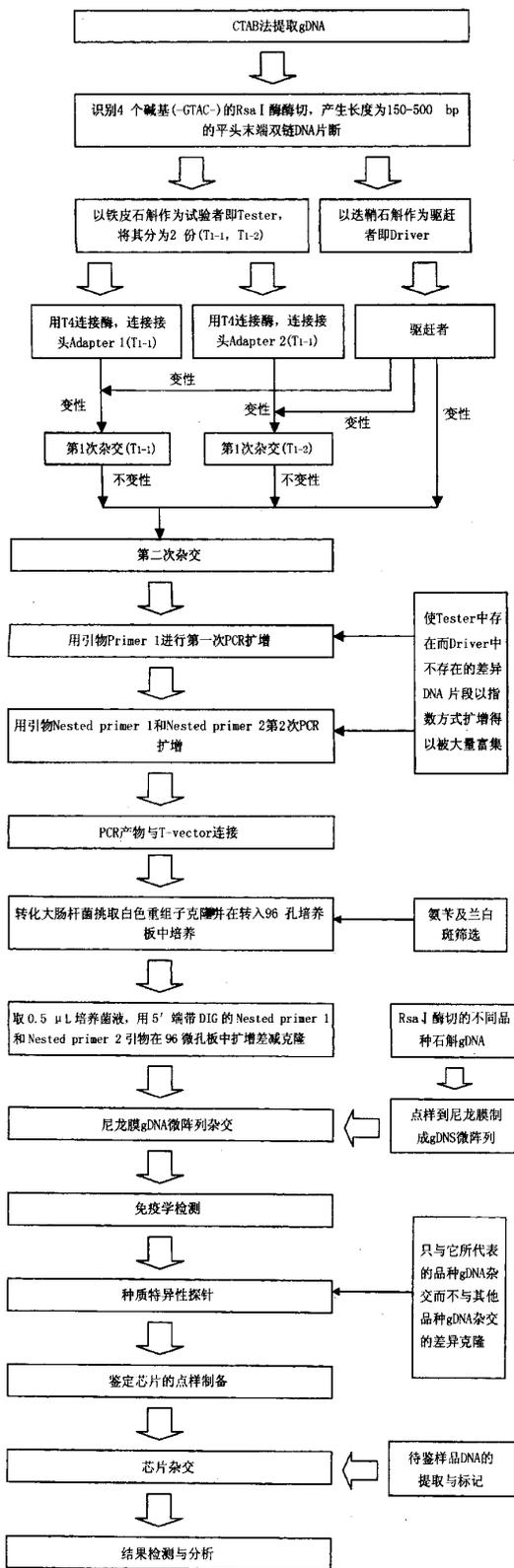


图 2 中药鉴定 gDNA 芯片制备主要技术流程

Fig. 2 Procedure for preparation of gDNA microarray for species identification of TCH

的尼龙膜在 62 °C 适度杂交。经适当浓度的 SSC、SDS 溶液洗涤,进行免疫学检测。与膜上 gDNA 种特异性探针微阵列杂交的检测样品 DNA 用剥离液剥离后,膜阵列可以重复使用 4~5 次。

2.5 结果检测与分析:待鉴样品 DNA 与 gDNA 微阵列杂交后,经化学发光或荧光扫描检测得到杂交结果,对结果进行分析,确定物种属性。

3 “SSH-array” gDNA 阵列技术的特点与中药鉴定 gDNA 芯片的应用展望

3.1 方便的可操作性:不论是标记的差异克隆与膜微阵列杂交筛选种特异性探针,还是待鉴样品 DNA 和膜微阵列杂交鉴定,杂交和洗膜在高严谨条件下进行以抑制非特异性杂交,最大限度的降低背景干扰。可用未纯化探针或标记的待鉴样品 PCR 产物进行点样和杂交。微阵列可重复杂交 3~5 次,相对成本较低,一般要求较低专业化和成本的仪器及试剂,在一般条件下的实验室就可开展工作。

3.2 可靠的探针载体:种特异性探针是在整个基因组水平上筛选,gDNA 的信息量大,存在大量的不同分子标记区,且不受外界因素和生物发育阶段及器官组织差异的影响,每一个体的任一细胞均含相同的遗传信息,为在基因组水平上寻找获得种质特异性探针提供了技术保证。

3.3 中药物种的有效鉴定:筛选到的大量的种特异性探针在大肠杆菌中进行克隆繁殖,可点样于玻片或尼龙膜上制备成低成本、高通量鉴别多种中药物种及真伪的中药材种质鉴定 gDNA 芯片,可解决一些同属多来源的植物药(如贝母类)、动物药(如蛇类、龟板鳖甲类)和一些贵重中药(如麝香类、燕窝类)及其伪品等的鉴定问题,对中药的安全用药和质量控制,促进中药现代化具有重要的意义。

3.4 中药材种间、真伪鉴别系统基因库标准基因图谱建立:如果以此获得的大量种特异性探针为基础,可对中药的基因组特征进行全面研究,为探索中药的遗传进化和生物学分类提供大量的信息资源,从而建立中药材种间、真伪鉴别的系统基因库标准基因图谱。

3.5 道地药材的鉴别:道地药材的产生除了与药材特定的生长环境和特殊的采收加工技术有关外,还与该道地药材产区这一物种的地方种群或居群中遗传上的特殊性有关,找出道地药材的特异性 gDNA 序列,建立特定的杂交图谱,即可区分道地药材与非道地药材。并且可通过对获得的大量探针的

(下转第 992 页)

石油醚脱脂,然后用醋酸乙酯萃取,回收溶剂得浸膏 115 g,经硅胶柱色谱分离,以环己烷-醋酸乙酯-氯仿-甲醇系统梯度洗脱,得到化合物 I ~ VI。

3 结构鉴定

β -香树脂醇(I):白色针晶(甲醇),mp 194~196 °C。MS (m/z):426(M^+),411,247,218(100),203,189,135,121,69,57。IR ν_{\max}^{KBr} cm^{-1} :3 232,1 628,1 606,1 512,1 450,1 281,1 229,1 067。其 $^1\text{H-NMR}$ 及 $^{13}\text{C-NMR}$ 数据与文献报道一致^[5]。

齐墩果酸(II):白色针晶(甲醇),mp >300 °C。MS (m/z):456(M^+),438,423,395,248(100),233,208,190,133。IR ν_{\max}^{KBr} cm^{-1} :3 360,2 940,1 695,1 460,1 375,1 310,1 265,1 225,1 030,990。与齐墩果酸对照品 TLC、IR、MS 一致。

5-去甲基橘黄素(III):浅黄针晶(甲醇),mp 145~146 °C。MS (m/z):388(M^+),387,373(100),359,345,211,183,162,147,137。IR ν_{\max}^{KBr} cm^{-1} :3 440,1 655,1 560,1 340,1 280,1 100,1 050。其 $^1\text{H-NMR}$ 及 $^{13}\text{C-NMR}$ 数据与文献报道一致^[6]。

百里香素(IV):浅黄针晶(甲醇),mp 221~222 °C。MS (m/z):360(M^+),345(100),197,169,151,

148。IR ν_{\max}^{KBr} cm^{-1} :3 430,2 846,1 660,1 598,1 584,1 380,1 285,840。其 $^1\text{H-NMR}$ 及 $^{13}\text{C-NMR}$ 数据与文献报道一致^[7]。

β -谷甾醇(V):无色片晶,mp 139~140 °C,与对照品 TLC、IR 一致。

胡萝卜苷(VI):白色粉末,mp 280~285 °C,与对照品 TLC、IR 一致。

References:

- [1] Lan M. *Herbal of Southern Yunnan* (滇南本草) [M]. Vol 2. Kunming: Yunnan People's Publishing House, 1997.
- [2] Jiangsu New Medical College. *Dictionary of Chinese Materia Medica* [M]. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers, 1986.
- [3] Zhu G P. Chemical analysis of essential oil from *Micromeria biflora* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1991, 22 (3): 127.
- [4] He R Y, Wang J Y, Zhang W J. Essential oil of *Micromeria biflora* [J]. *Chin Pharm J* (中国药理学杂志), 1993, 28(9): 536-537.
- [5] Zhong H J, Luo S D, Wang H Y, et al. Chemical constituents of *Crepis phoenix* [J]. *Acta Bot Yunnan* (云南植物研究), 1999, 21(4): 531-534.
- [6] Ansari M A, Barron D, Abdalla M F, et al. Flavonoid constituents of *Stachys aegyptiaca* [J]. *Phytochemistry*, 1991, 30(4): 1169-1173.
- [7] Van Den Broucke C, Dommissie R, Esmans E, et al. Three methylated flavanones from *Thymus vulgaris* [J]. *Phytochemistry*, 1982, 21(10): 2581-2583.

(上接第 964 页)

综合分析研究,为由于遗传上的差异性造成的道地药材和非道地药材质量差异的研究、以及优质中药材质地的筛选和育种栽培研究提供信息资源。

3.6 复方制剂中单味药材的检出:中药复方制剂中单味药材的检出,用传统的鉴别方法时常难以奏效,如果获得大量的不同药材的特异性 DNA 探针,便可以此为基础制备出高通量中草药 gDNA 芯片即可达到鉴别的目的。

致谢:中国药科大学李萍教授对该项工作给予帮助。

References:

- [1] Carlswald B S, Stern W L, Judd W S, et al. Comparative leaf anatomy and systematics in *Dendrobium*, sections *Aporum* and *Rhizobium* (Orchidaceae) [J]. *Int J Plant Sci*, 1997, 158: 332-342.
- [2] Stern W L, Morris M W, Judd W S. Anatomy of the thick leaves in *Dendrobium* section *Rhizobium* (Orchidaceae) [J]. *Int J Plant Sci*, 1994, 155: 716-729.
- [3] Namba T, Lin C C. Pharmacognostical studies on the crude drugs of Orchidaceae from Taiwan (IV) on "Chioh-hak" [J]. *Shoyakugaku Zasshi*, 1981, 35: 221-232.
- [4] Anonymou S. *Chinese Materia Medica* (中药志) [M]. 2nd ed. Beijing: People's Medical Publishing House, 1988.
- [5] Salloum G, Meugnier H, Reyrolle M, et al. Identification of *Legionella* species by ribotyping and other molecular methods [J]. *Res Microbiol*, 2002, 153: 679-686.

- [6] Regnault B, Grimont F, Gimont P A D. Universal ribotyping method using a chemically labelled oligonucleotide probe mixture [J]. *Res Microbiol*, 1997, 148: 649-659.
- [7] Bansal N S, McDonnell F. Identification and DNA fingerprinting of *Legionella* strains by randomly amplified polymorphic DNA analysis [J]. *J Clin Microbiol*, 1997, 35 (9): 2310-2314.
- [8] LoPresti F, Riffard S, Vandenesch F, et al. Identification of *Legionella* species by randomly amplified polymorphic DNA profiles [J]. *J Clin Microbiol*, 1998, 36: 3193-3197.
- [9] Tannock G W, Tilsala-Timisjarvi A, Rodtong S, et al. Identification of *Lactobacillus* isolates from the gastrointestinal tract, silage, and yoghurt by 16S-23S rRNA gene intergenic spacer region sequence comparison [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1999, 65: 4264-4276.
- [10] Amelio S D, Mathiopoulos K D, Santos C P, et al. Genetic markers in ribosomal DNA for the identification of members of the genus *Anisakis* (Nematoda: Ascaridoidea) defined by polymerase chain reaction-based restriction fragment length polymorphism [J]. *Int J Parasitol*, 2000, 30: 223-226.
- [11] Song Y L, Kato N, Liu C X, et al. Rapid identification of human intestinal *Lactobacillus* species by multiplex PCR assays using group and species-specific primers derived from the 16S-23S rRNA intergenic spacer region and its flanking 23S rRNA [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2000, 187: 167-173.
- [12] Ratcliff R M, Lanser J A, Manning P A, et al. Sequence-based classification scheme for the genus *Legionella* targeting the mip gene [J]. *J Clin Microbiol*, 1998, 36: 1560-1567.
- [13] Li T X, Wang J K, Bai Y F, et al. A novel method for screening species-specific gDNA probes for species identification [J]. *Nucleic Acids Res*, 2004, 32(4): e45.
- [14] Diatchenko L, Lau Y F, Campbell A P, et al. Suppression subtractive hybridization: A method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93: 6025-6030.