

与其他种的遗传相似度低、遗传距离大,加强对该种的保护显得尤为重要。

References:

- [1] Zhu Y M. *Nei Inner Monggol Medicinal Flora* (内蒙古植物药志) [M]. Vol Ⅱ. Huhhot: Inner Mongolia People's Publishing House, 1993.
- [2] Ma Y Q. *Flora Intramongolica* (内蒙古植物志) [M]. Vol Ⅱ. Huhhot: Inner Mongolia People's Publishing House, 1989.
- [3] Hewitt G M, Johnston A. *Molecular Techniques in Taxonomy* [M]. Berlin: Springer, 1991.
- [4] Ma C C, Gao Y B, Liu H F, *et al.* Interspecific transition among *Caragana microphylla*, *C. davazamcii*, and *C. korshinskii* along geographic gradient. 1. Ecological and RAPD evidence [J]. *Acta Bot Sin* (植物学报), 2003, 45(10): 1218-1227.
- [5] Wei W, Wang H X, Hu Z A, *et al.* Primary studies on molecular ecology of *Caragana* spp. populations distributed over Maowusu sandy grassland: from RAPD data. [J]. *Acta Ecol. Sin* (生态学报), 1999, 19(1): 16-22.
- [6] Yu H, Zhou R X, Li Y Y, *et al.* RAPD analysis of common medicinal plants of *Rhodiola* L. in Yunnan Province [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2005, 36(1): 96-99.
- [7] Wang J B. ISSR markers and their application in plant genetics [J]. *Hereditas* (遗传), 2002, 24(5): 613-616.
- [8] Qian W, Ge S. Analyses of population genetic structure by using dominant markers [J]. *Acta Genet Sin* (遗传学报), 2001, 28(3): 244-255.
- [9] Cao Y N, Li Q Z, Sun Y, *et al.* Analysis of genetic diversity in certified *Radix Gentianae* by RAPD and ISSR [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2005, 36(1): 100-103.
- [10] Li B. *Natural Resource and Environment Study of the Ordos Plateau of Mongol Province*. (内蒙古鄂尔多斯高原自然资源与环境研究) [M]. Beijing: Science Press, 1990.

鹿源类中药材 DNA 序列分析及马鹿和梅花鹿的 PCR 鉴定

白根本¹, 张林源², 刘春生¹, 程 伟¹, 陈代贤³

(1. 北京中医药大学, 北京 100102; 2. 北京麋鹿生态实验中心, 北京 100076; 3. 大连市药品检验所, 辽宁 大连 221100)

摘要:目的 采用特异引物 PCR 扩增鉴定马鹿和梅花鹿源中药材。方法 从马鹿、梅花鹿等国内 11 种鹿的鹿血和鹿茸中提取 DNA, 用通用引物 L1091 和 H1478 调取细胞线粒体 12S rRNA 基因片段, 在该片段核苷酸序列比对的基础上, 设计马鹿和梅花鹿高特异性 PCR 鉴定引物对, 并进行 PCR 特异性鉴定。结果 12S rRNA 基因片段能较好地在种的水平上将不同的种区分开来; 特异引物对 (EP-1/H1478 和 EP-2/H1478) PCR 可准确地鉴定出马鹿和梅花鹿等。结论 特异引物 PCR 适宜马鹿、梅花鹿等珍贵中药材的鉴定。

关键词:鹿; DNA 序列; PCR 鉴定

中图分类号: R282.7

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2006)10-1566-04

Analysis of DNA sequence of Chinese medicinal materials deers and PCR identification of *Cervus elaphus* and *C. nippon*

BAI Gen-ben¹, ZHANG Lin-yuan², LIU Chun-sheng¹, CHENG Wei¹, CHEN Dai-xian³

(1. Beijing University of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100102, China; 2. Beijing Milu Ecological Research Center, Beijing 100001, China; 3. Dalian Institute for Drug Control, Dalian 221100, China)

Abstract: Objective To identify the animal drug of *Cervus elaphus* and *C. nippon* from origin of deers.

Methods To extract DNA from deer blood and hairy antler of 11 species of deers such as *C. elaphus*, *C. nippon* and so on, and to gain the mitochondrial 12S rRNA gene fragment using the general primers of L1091 and H1478. Based on the sequence multialinement of 11 species deers above gene fragments, designing the couples of special difference primers and identifying *C. elaphus* and *C. nippon*. **Results** 12S rRNA Gene fragments can distinguish different deers well. The couple of primers (EP-1/H1478 and EP-2/H1478) PCR can effectively identify *C. elaphus* and *C. nippon*. **Conclusion** Special primer PCR is suitable for the identification of valuable Chinese medicinal materials, such as *C. elaphus* and *C. nippon*.

Key words: deer; DNA sequence; PCR identification

收稿日期: 2005-12-26

基金项目: 北京中医药大学 211 工程项目资助

作者简介: 白根本 (1958—), 教授, 博士后, 长期从事遗传学、生物技术的教学与科研工作, 主持完成 2 项国家自然科学基金等, 发表论文 40 余篇。 Tel: (010) 64219516 E-mail: baigb@263.net

鹿源类动物药材为名贵中药材,《中国药典》将梅花鹿和马鹿茸列为正品。但目前药材市场上有约 10 多种鹿源药材,加上有鹿茸、鹿血、鹿鞭等通过加工或非加工药材,以及伪品牛鞭、驴鞭等给梅花鹿和马鹿的准确鉴定带来了极大的困难。DNA 核酸序列和特异引物 PCR 扩增在动物药材鹿茸、鹿鞭、乌梢蛇、龟板、土鳖虫、蜈蚣等^[1,2]鉴定方面都取得了良好效果。但就鹿源类药材鉴定仍然存在一些问题,首先是有些基因比对属于科以上的水平,虽然利用常规方法难以鉴定,但在 DNA 序列上已相去甚远;其次,比对的范围有限。一是鹿源药材从种内 DNA 序列比对鉴定没有实际意义,《中国药典》规定了梅花鹿和马鹿这 2 个种,并非某个产地;二是对同一物种不同药用部位(血、鞭、肉,甚至毛)DNA 序列的比对从遗传学上讲已没有必要,这也是本研究在取材上不同于过去同类研究。我国是主要的产鹿国之一,包括鹿科 15 个属,有 16 个种,其中白唇鹿、毛冠鹿和坡鹿是我国特有的种,但从 DNA 水平上最具鉴定意义是同属内动物药材的鉴定,由于属间及其以上 DNA 序列的差异远远大于同属种间的差异,所以在 DNA 水平上关键的是要找出 DNA 种间水平的差异。本实验在国内 11 种鹿 12S rRNA 基因序列研究的基础上,设计出了马鹿和梅花鹿的高特异性鉴定引物,以期建立简便易行的鹿源类中药材的鉴定方法。

1 材料和方法

1.1 材料:鹿血采自北京麋鹿园,鹿茸片由大连市药品检验所陈代贤研究员提供并鉴定(表 1)。

表 1 样品
Table 1 Samples

样 品	数量	备 注
梅花鹿 <i>Cervus nippon</i>	2	鹿血(1♀,1♂)
马鹿 <i>C. elaphs</i>	2	鹿血(1♀,1♂)
水鹿 <i>C. unicolor</i>	1	鹿茸
白唇鹿 <i>C. albirostris</i>	2	鹿血(1♀,1♂)
爪哇鹿 <i>C. timorensis</i>	1	鹿茸
坡鹿 <i>C. eldi</i>	1	鹿茸
黇鹿 <i>Dama dama</i>	2	鹿血(2♂)
麋鹿 <i>Elaphurus davidianus</i>	2	鹿血(2♂)
驯鹿 <i>Rangifer tarandus</i>	1	鹿茸
驼鹿 <i>Alces alces</i>	1	鹿茸
狍 <i>Capreolus capreolus</i>	2	鹿血(2♂)

1.2 DNA 提取:异丙醇法提取鹿血 DNA;鹿茸 DNA 的提取方法:取 0.3 g 的鹿茸片材料(用刀片刮去表面层,无菌水清洗若干次,凉干后研磨至细粉末,装入一 10 mL 离心管;加入 4 400 μ L TEN9(50 mmol/L Tris-Cl, 100 mmol/L EDTA · Na₂, 200

mmol/L NaCl, pH 9.0) 提取液混匀;加 100 μ g/mL RNase (无 DNA 酶),加终浓度为 2% SDS 混匀 10 min, 37 $^{\circ}$ C 保温 1 h;加 5~10 mg 蛋白酶 K (proteinase K),终浓度 40 mmol/L 的 DTT,使总体积为 5 mL;50 $^{\circ}$ C 保温 3~4 h,期间不时轻摇,使组织消解;加等体积的 Tris-Cl (pH 8.0) 的饱和酚,轻轻颠倒数分钟,室温

条件下 12 000 r/min 离心 10 min,取上清液于一洁净的离心管中;加入等体积的酚-氯仿-异戊醇(50:48:2)轻轻颠倒数分钟,室温 12 000 r/min 离心 10 min,取上清液于一洁净的离心管中;加入等体积的氯仿-异戊醇(24:1)同上方法抽提一次,取上清液于一洁净的离心管中,重复抽提 3 次;加 1/10 体积的 3 mol NaAc(终浓度为 0.3 mol),加入 2 倍体积的预冷乙醇 4 $^{\circ}$ C 过夜沉淀;12 000 r/min 离心 15 min,弃上清,加入 70% 乙醇漂洗 1~2 次;室温挥发干乙醇,加入适量的无菌去离子水;1% 的琼脂糖凝胶电泳,观察 DNA 质量(部分样品 DNA 见图 1),鹿茸片 DNA 有降解。

1.3 12S rRNA 基因的扩增:12S rRNA 基因片段通过引物对^[1]为:L1091:5'-AAAAAGCTTCAAA-CTGG GATTAGATACCCCACTAT-3'; H1478:5'-TGACTGCAGAGGGTGACGGGCGGTGTGT-3'。反应体系和反应条件:ddH₂O 37.2 μ L, 10 $\times$ Buffer 5 μ L, MgCl₂ 3 μ L (25 mmol/L), dNTP 1 μ L (每种 10 mmol/L), L1091/H1478 各 0.3 μ L (50 mmol/L), DNA 3 μ L (约 100 ng), Taq 酶 0.3 μ L (0.9 U)。PCR 扩增条件:94 $^{\circ}$ C 预变性 6 min, 72 $^{\circ}$ C、4 min;循环体包括 94 $^{\circ}$ C、40 s, 56 $^{\circ}$ C、1 min, 72 $^{\circ}$ C、1 min,共 40 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸补齐 6 min;最后 4 $^{\circ}$ C 保存。用 1.4% 的琼脂糖凝胶电泳检测扩增,获得约 500 bp 的 DNA 片段,见图 2(部分样品)。

1.4 序列分析:扩增产物用低熔点胶法回收,测序由上海生物工程公司完成,所得数据用 PHYLIP 3.6a3 软件进行分析比较。

2 结果与分析

2.1 图 3 是 11 种鹿 12S rRNA 基因片段比对结

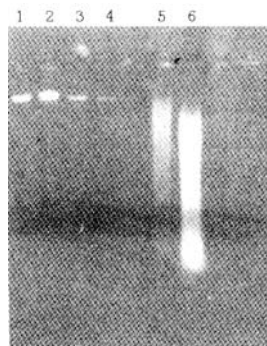
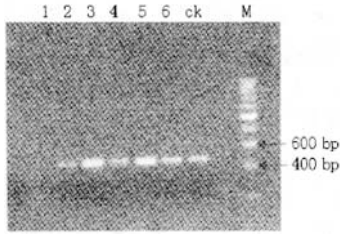


图 1 鹿血(1~4)和鹿茸(5,6)的 DNA
Fig. 1 DNA of deer blood (1-4) and hairy antler (5, 6)



1~6-梅花鹿、马鹿、水鹿、白唇鹿、黏鹿、麋鹿
ck-对照 M-DNA 标记
1-*C. nippon* 2-*C. elaphus* 3-*C. unicolor* 4-*C. albirostris*
5-*Dama dama* 6-*Elaphurus davidianus*
ck-control M-DNA marker

图 2 12S rRNA 基因片段的 PCR 扩增产物

Fig. 2 PCR Amplification of 12S rRNA gene fragments

果,由于种内重复的测序结果完全相同,故在图 3 中不再列出。在 12 种鹿基因片段序列中,共有 45 个碱基的变异,其中共有 53 个碱基转换,10 个碱基颠换,转换与颠换比为 5.3 : 1;爪哇鹿在 182 处有一个碱基的插入。从碱基发生变异的位置看,在 2~12、242~248、270~287 的 3 个区域发生突变的频率比较高。从种的角度看,黏鹿、麋鹿、驯鹿和狍发生变异的频率最高,主要表现在属间,在 45 个碱基变异中,鹿属内的碱基变异有 18 个,其中有 15 次转换和 2 次颠换,二者相差 7.5 倍,即碱基的颠换主要发生在属间。

2.2 分子系统树采用 Clustal X 1.8 分别用简约 (Parsimony) 法和邻接 (Neighbour Joining) 法构建,经分析比较 NJ 法所构建的系统树更接近鹿科动物的系统进化(图 4),在亚科水平上除了空齿鹿亚科的驼鹿与鹿亚科聚在一类外,其余 10 种鹿分别聚为两类,即鹿亚科和空齿鹿亚科。在鹿亚科中又以马鹿和梅花鹿首先聚在一起,并依次聚类的是白唇鹿等,最后与黏鹿聚在一起。这一进化树基本反映了鹿科动物系统进化关系。

2.3 梅花鹿与马鹿的 PCR 特异鉴定:根据图 3,11 种鹿科动物 12S rRNA 基因片段序列差异分析,分别设计梅花鹿和马鹿特异 PCR 鉴定引物对(表 2)。并以序列最接近的鹿属其他种及空白模板为对照进行 PCR 扩增鉴定。PCR 反应体系同上,梅花鹿鉴定的复性温度为 61 ℃,马鹿为 65 ℃。扩增产物用 1.4% 的琼脂糖凝胶电泳,EB 染色,成像,结果见图 5。图 5-a 中只有马鹿有扩增条带,图 5-b 只有梅花鹿有扩增条带,长度均约 400 bp,与设计长度(根据测序结果计算长度)相符。

引物设计遵从以下原则:首先是特异性原则,即

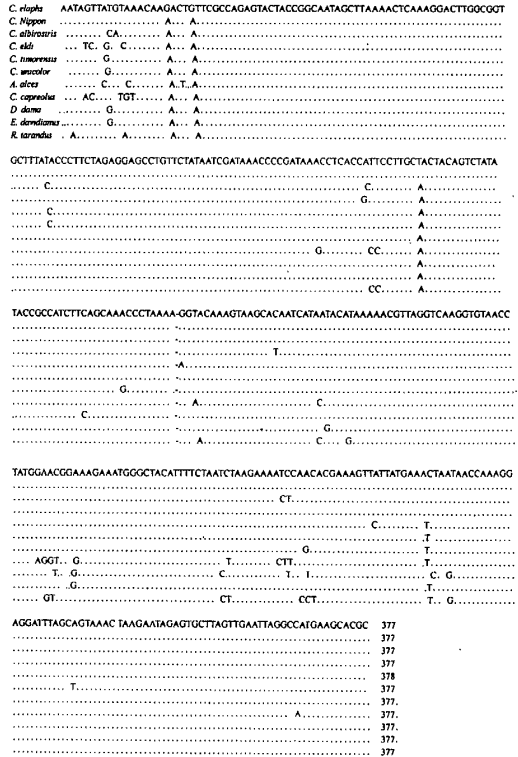


图 3 11 种鹿 12S rRNA 基因片段多重序列比较

Fig. 3 Alignments of 12S rRNA gene fragment sequences of 11 species of deer

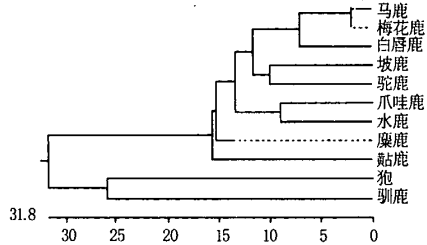


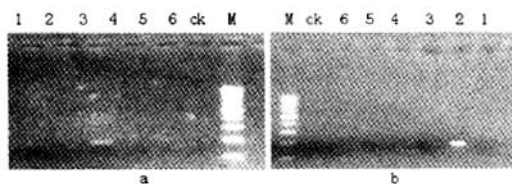
图 4 11 种鹿聚类图

Fig. 4 Cluster dendrogram of 11 species of deer

种间差别越大越好。其次遵从引物设计的基本原则,即引物长度以 15~30 bp 为宜;引物内部不应该形成二级结构,两个引物之间尤其在 3' 末端不应有互补链存在;引物碱基的顺序不应与非扩增区域有同源性;引物 3' 末端碱基原则上要求与模板 DNA 一一配对。而 3' 末端碱基在很大程度上影响 *Taq* 聚合酶的延伸效率,据报道 3' 碱基引发错配的效率大小依次为 A>G、C>T。客观上引物的设计往往并不能满足以上要求,如引物长度和 G、C 受配对引物的 T_m 值及客观序列的制约,从实践方面笔者认为序列长度可以在 38 bp 内,为了保证 PCR 的特异性,尤其是特异引物只差 1~2 个碱基时,双引物的 T_m

表 2 PCR 引物对
Table 2 Pair of PCR primer

名称/引物	序 列	配对引物
梅花鹿/EP-1	5'GTTATGTAAACAAAAGTATTCGCCAGAGTACTACCGGC3'	H1478
马鹿/EP-2	5'GTTATGTAAACAAGACTGTTCCGACAGTACTACCGGC3'	H1478



1-水鹿 2-梅花鹿 3-马鹿 4-白唇鹿 5-爪哇鹿
6-坡鹿 ck-空白模板 M-DNA 标记
1-*C. unicolor* 2-*C. nippon* 3-*C. elaphs* 4-*C. albirostris*
5-*C. timorensis* 6-*C. eldi* ck-control M-DNA marker

图 5 特异 PCR 扩增

Fig. 5 Specificity of primers PCR amplification

值相差越小越好,否则其他影响特异性的条件都可能掩盖 PCR 的特异性。

3 讨论

由于动物鹿源药材因器官、加工等原因,给常规鉴定带来了很大困难,单从 12S rRNA 基因序列的来源研究不同鹿种具有很好的稳定性。在本研究中有 6 个鹿种进行了 2 样本的重复测序,其结果表现出高度的一致性,证明了在种的水平上该区段进化是保守的,属间序列差异明显大于种间差异。

动物药材的基因鉴定很好地克服了不同器官以

及样品保存时间等给鉴定带来的复杂性,但从序列鉴定仍然较难推广,高度特异性引物极大地简化了鉴定程序。在本研究中,所用的试验材料有鹿血和存放时间数年的鹿茸,在基因片段的调用上取得了同样的效果。特异引物的设计在技术上除了遵循引物设计的基本原则外,序列之间的差异大小直接影响特异性扩增的效果,马鹿和梅花鹿在所分析的片段上仅有 2 个碱基的差异,但所设计的引物对(马鹿:PE-1, H1478;梅花鹿:PN-1, H1478)都特异地扩增出长度约 400 bp 的 12S rRNA 基因片段,这与根据测序结果设计的序列长度一致。

在本研究中,马鹿和梅花鹿特异性扩增引物对中都用了共同引物 H1478。事实上,如果将下游引物设计的其他碱基变异较大的区域将会取得更好的鉴别效果。此外,引物质量直接影响特异性扩增的效果,引物设计时遵循引物设计的一般技术指标外,要尽可能地选择差异较大的区域,如果遇到差异数仅 1~2 个,且间隔距离又较远时,要尽可能地差异碱基放在引物的 3' 端,同时引物的 T_m 值越匹配越好。

References:

- [1] Liu Z Q, Wang Y Q, Zhou K Y, *et al.* Study on highly specific diagnostic PCR of the traditional chinese medicine tortoise plastron and its original animals [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 1999, 34(12): 941-945.
- [2] Wang J J, Zhang G J, Bai G B. Study on endonuclease cutting of 18S rRNA gene in five animal drugs including *Scolopendra* [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2002, 37(8): 582-584.

近红外光谱鉴别冬虫夏草道地药材

王钢力¹, 石 岩¹, 魏玉海², 王慧春², 徐晓杰³, 林瑞超¹

(1. 中国药品生物制品检定所, 北京 100050; 2. 青海省药品检验所, 青海 西宁 810000;
3. 热电(上海)科技仪器有限公司, 北京 100032)

摘要:目的 研究冬虫夏草药材的道地性。方法 收集不同产地的冬虫夏草药材样品 102 批, 采用漫反射法, 测定药材粉末及药渣的近红外光谱, 采用透射法测定药材甲醇提取物的近红外光谱。采用 TQ 定量分析软件, 对样品的青海和西藏产地进行判别分析。结果 药材粉末的判断准确率达到 100%, 药材的甲醇提取物光谱较药渣更能显示药材的产地差别。结论 在扩大建模样本的前提下, 近红外光谱分析可以用于冬虫夏草药材的产地鉴别。

关键词: 近红外光谱; 冬虫夏草; 地道药材; 鉴别

中图分类号: R282.7

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2006)10-1569-03

Application of NIR analysis in identification of genuine *Cordyceps*

WANG Gang-li¹, SHI Yan¹, WEI Yu-hai², WANG Hui-chun², XU Xiao-jie³, LIN Rui-chao¹

(1. National Institute for Control of Biological and Pharmaceutical Products, Beijing 100050, China; 2. Qinghai

收稿日期: 2006-01-05

基金项目: 青海省重大科技项目(2004-N-103-01)