

## 玉竹及其掺伪品的 RAPD 鉴定

王润玲, 唐 斌, 周 晔\*, 刘 奇, 安适之

(天津医科大学药学院, 天津 300070)

**摘要:**目的 探索鉴别玉竹及其掺伪品热河黄精、黄精等药用植物的方法。方法 采用显微鉴定和 RAPD 技术进行药材鉴别。结果 通过所选引物进行 PCR 扩增, 可以获得特异性的谱带, 将玉竹及其主要掺伪品热河黄精、黄精区分开。结论 建立的该分析方法可用作区分玉竹及其掺伪品的依据。

**关键词:**玉竹; 显微鉴定; RAPD

**中图分类号:**R282.7 **文献标识码:**A **文章编号:**0253-2670(2006)11-1727-03

### Identification of rhizome of *Polygonatum odoratum* and its adulterants by RAPD

WANG Run-ling, TANG Cheng, ZHOU Ye, LIU Qi, AN Shi-zhi

(College of Pharmacy, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

**Key words:** *Rhizoma Polygonati Odorati*; microscopic identification; RAPD

玉竹始载于《神农本草经》,列为上品。玉竹性甘、微寒,归肺、肾二经,有滋阴润燥、生津止渴之功效。经现代研究表明玉竹有降血糖、调血脂、免疫调节等药理活性<sup>[1]</sup>。据《中国药典》2005 年版记载玉竹的来源应为百合科植物玉竹 *Polygonatum odoratum* (Mill.) Druce 的干燥根茎<sup>[2]</sup>。由于该属植物外形相近,玉竹等黄精属生药显微特征只有细微的不同。古今均将黄精属多种具互生叶而根茎圆柱状者如热河黄精 *P. macropodium* Turcz.、黄精 *P. sibiricum* Delar. ex Redoute 等作玉竹入药,造成玉竹品种混淆、鉴别困难,影响临床疗效<sup>[3]</sup>。此前曾有

运用分子标记技术研究黄精属部分植物<sup>[4]</sup>,但未见玉竹与热河黄精等掺伪品鉴别的研究报道。本实验采用传统方法与分子标记技术相结合将玉竹及其掺伪品热河黄精、黄精区分开,并建立植物 DNA 提取的新方法。

#### 1 材料与仪器

1.1 材料:本实验的样品采自河北省、江西省山区和北京植物园,样品来源及其特征见表 1。所有植物的根状茎均经 75% 酒精灭菌并用蒸馏水充分漂洗,储存于 -20 ℃ 备用。

1.2 试剂及其配制:琼脂糖 (Promega 公司)、*Taq*

表 1 玉竹及其掺伪品的主要特征

Table 1 Main characters of rhizome of *P. odoratum* and its adulterants

来源	形态特征			产地	采集时间	状况	鉴定人
	根状茎	叶	花				
玉竹	圆柱状	互生	花序具 3~4 朵花	河北省雾灵山	2004-06	野生	张攻
	圆柱状	互生	花序具 3~4 朵花	天津蓟县九山顶	2004-06	野生	张攻
	圆柱状	互生	花序具 3~4 朵花	北京植物园栽培	2004-06	栽培	张攻
	圆柱状	互生	花序具 3~4 朵花	江西省九江	2004-07	野生	谭策铭
黄精	鸡头状	轮生 3~6 叶		河北省雾灵山	2004-06	野生	张攻
	鸡头状	轮生 3~5 叶		天津蓟县九山顶	2004-06	野生	张攻
热河黄精	圆柱状	互生	花序具 5~8 朵花	河北省雾灵山	2004-06	野生	张攻

酶、dNTP、随机引物、DL-2000 (宝生物公司)、EB (Sigma 公司),其他试剂为分析纯。CTAB 提取液: 2% CTAB, 100 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0 20 mmol/L EDTA, 1.4 mol/L NaCl, 2% 二巯基乙醇, pH 8.0; CTAB/NaCl 溶液: 10% CTAB, 0.7

mol/L NaCl; CTAB 沉淀剂: 1% CTAB, 50 mmol/L Tris-HCl, 10 mmol/L EDTA, pH 8.0; 高盐 TE 缓冲液: 10 mmol/L Tris-HCl, 10 mmol/L EDTA, 1 mol/L NaCl, pH 8.0。

1.3 仪器: 万能研究显微镜 (Olympus wvanox),

收稿日期: 2006-04-01

基金项目: 天津市卫生局基金资助项目 (03009); 天津医科大学科学基金资助项目 (2003KY4)

作者简介: 王润玲 (1959—), 女, 天津市人, 教授, 天津医科大学药学院副院长, 硕士生导师, 研究方向为药物化学和中药有效成分分析。

\* 通讯作者 周 晔 Tel: (022) 23529697 E-mail: zhouye@tjmu.edu.cn

QL-901 型漩渦混合器 (江苏海门麒麟医用仪器厂), TGL-16G 型台式高速离心机 (上海医用分析仪器厂), HH-42 型快速恒温数显水箱 (常州国华电器有限公司), 日本岛津 UV-240 紫外分光光度仪, 9600 型 PCR 仪 (PE 公司), GDS8000 凝胶成像分析系统。

## 2 方法

2.1 显微鉴定: 截取 1 cm<sup>3</sup> 的根状茎, 投入 F. A. A 固定液中固定 24 h。取出后用流水冲洗, 乙醇脱水。用熔点 58 ℃ 的石蜡包埋, 上滑走切片机。切后用 1% 番红、2% 淡绿染色, 中性树胶封片。用 Olympus wvanox 万能研究显微镜 PM-10AD 照像系统拍照。

### 2.2 RAPD 分析

2.2.1 DNA 提取: 取 0.1 g 植物根茎置于 -80 ℃ 预冻 40 min, 迅速置于白瓷乳钵并加入 2 mL CTAB 提取液, 研磨至粉碎, 置于 65 ℃ 水浴 60 min, 并不断振荡使之充分反应; 取出后加入等体积 CHCl<sub>3</sub>-异戊醇 (24:1) 溶液, 10 000 r/min 离心 5 min, 取上层液, 重复抽提 2 次至澄清; 加入 1/10 体积, 65 ℃ 预热的 CTAB/NaCl 溶液混匀, 再加入等体积 CHCl<sub>3</sub>-异戊醇 (24:1) 溶液抽提, 10 000 r/min 离心 5 min, 取上层液, 加入等体积 CTAB 沉淀剂, 于 65 ℃ 水浴 30 min, 4 000 r/min 离心 10 min; 取沉淀, 加入 500 μL 高盐 TE, 混匀, 再加入 0.6 体积的异丙醇, 小心振摇, 10 000 r/min 离心 15 min。用 80% 乙醇清洗沉淀, 挥干, 用 100 μL TE (10,1) 溶液溶解, 可得 DNA 溶液, 并将样品浓度稀释至 5 ng/μL。

2.2.2 PCR: PCR 反应体系共 20 μL, 包括: 20 ng DNA 模板、1 mmol/L 引物、2 μL 10×PCR 缓冲液 (含 Mg<sup>2+</sup>)、0.25 mmol/L dNTP 混合物、1 U *Taq* 酶、10 μL 高压水, 混匀。在 PCR-9600 上扩增, 扩增程序: 第 1 阶段, 预变性 94 ℃、5 min; 第 2 阶段, 每个循环 94 ℃ 变性 1 min, 37 ℃ 退火 1 min, 72 ℃ 延伸 2 min, 共 5 个循环; 第 3 阶段, 每个循环 94 ℃ 变性 15 s, 37 ℃ 退火 1 min, 72 ℃ 延伸 2 min, 共 40 个循环; 第 4 阶段, 72 ℃ 继续延伸 7 min; 4 ℃ 储存。

2.2.3 凝胶电泳: 配置 1.8% 琼脂糖凝胶 (含 EB 1 μg/mL), Marker 加入另一个加样孔作参照。在 1×TAE 缓冲液中电泳, 电泳电压 70 V, 采用 GDS8000 UVP 紫外摄像分析系统下观察、照相。

## 3 结果与分析

3.1 显微鉴定: 结果见图 1、2 (横切放大倍数 10×10, 针晶放大倍数 10×40)。玉竹的维管束以外韧型为主, 热河黄精的维管束大多为外韧型, 少数周木型, 针晶大小亦有所不同, 但这些差别可因地理位置, 气候条件的不同发生一定的变异。

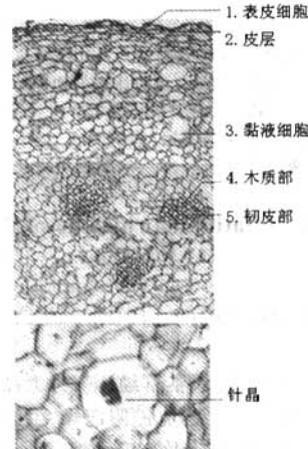


图 1 玉竹 *P. odoratum* (九山顶) 显微图  
Fig. 1 Microscopic identification of rhizome of *P. odoratum* (Jiushanding)

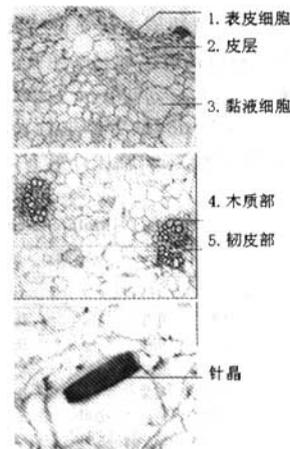


图 2 热河黄精 *P. macropodium* (雾灵山) 显微图  
Fig. 2 Microscopic identification of *P. macropodium* (Wulingshan)

3.2 PCR: 经筛选 23 种引物, 并用其进行 PCR 反应, 从产生的多态性条带可以看出, 玉竹与其主要掺伪品热河黄精、黄精等的亲缘关系较近, 这与它们的性状特征和显微特征相近是一致的。由于所采集植物的遗传特征已经发生了一定的变异, 通过所产生的多态性条带, 可对所采植物进行区分。其中引物

S22 (TGCCGAGCTG)、S27 (GAAACGGGTG) 的 PCR 结果稳定,可用作区分本次采集的玉竹及其掺伪品的依据。

在对所采集的玉竹与热河黄精的 PCR 扩增产物分析后可以看到,以 S27 作为引物进行扩增时,在 750~1 000 bp 有一条热河黄精的特异条带,见图 3。另外,采用此种引物扩增不同条件下生长的玉竹 DNA 模板并未表现出差异性,从而为其人工种植提供了实验依据。在黄精与玉竹的鉴别方面,本实验采用多个引物都可将二者区分开。如二者经引物 S22 扩增,在 250~500 bp 范围内得到黄精只扩增出一条谱带,而玉竹则可以得到两条谱带,见图 4。

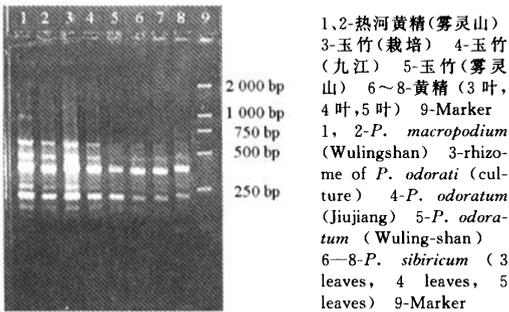


图 3 引物 S27 产生的结果  
Fig. 3 Result of Premier S27

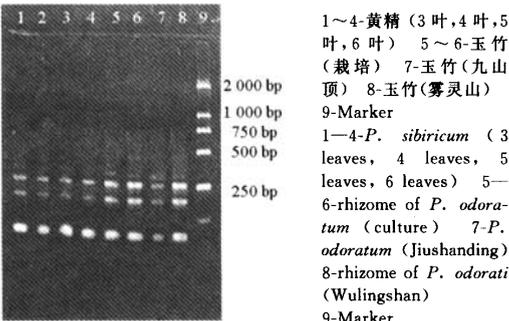


图 4 引物 S22 产生的结果  
Fig. 4 Result of Premier S22

3.3 由于植物中次生代谢产物——多酚类化合物可介导 DNA 降解,而多糖的污染也是影响植物 DNA 纯度最常见的问题,这些多糖能抑制限制酶、连接酶及 DNA 聚合酶等酶类的生物活性。因而本实验采用的是在 Doyle<sup>[5]</sup>的基础上改进的 CTAB 提取法。CTAB 是一种阳离子去污剂,能与核酸形成复合物,这些复合物在低盐溶液中会因溶解度的降低而沉淀,在高盐溶液中可解离,使 DNA 和多糖分

开,再用乙醇沉淀 DNA 除去 CTAB,这样可有效避免多酚类化合物介导的 DNA 降解<sup>[6]</sup>。本实验利用 CTAB 这一性质,并在提取过程中多次通过氯仿-异戊醇溶液提取蛋白质等有机物杂质逐步将各种植物的模板 DNA 提纯,再通过沉淀模板 DNA 除去 CTAB。这样不仅可以获得较纯的模板 DNA,而且可有效地避免 DNA 降解。此外,向样品加入适当比例、预冷的异丙醇处理可使 DNA 较快地沉淀出来,而蛋白、多糖以及 CTAB 等提取试剂则大部分残留在溶液中。这对于最终获得高质量的 DNA 也有一定的促进作用。虽然该方法的提取步骤较复杂,但对于提取试剂的要求不高。一般方法裂解细胞,需要用蛋白酶 K 来消化蛋白质或降解一些细胞组分,而后通常用酚-氯仿溶剂抽提。分离成两相后,核酸在水相中。用乙醇沉淀法做进一步纯化,再重新溶解在适宜的缓冲液中。本实验在提取过程中未采用蛋白酶 K,苯酚等试剂,不仅避免了干扰,而且仍获得了纯度较高的 DNA。一般做植物多态性等研究时,通常提取新鲜植物的叶绿体 DNA,但本实验建立的提取方法即使根茎部含有大量的多糖,蛋白质等干扰物质,也能提取到足够量的 DNA,所得到的 DNA 纯度仍能达到生物学实验技术要求。另外,对常温放置一年以上的玉竹、黄精等根茎的 DNA 进行提取,结果表明本法同样适用。这对玉竹等根茎入药的药用植物很有意义,在生药采收后,人们可从入药部位提取遗传物质进行药材真伪鉴定。

玉竹的来源较多,分类混乱,运用传统方法鉴别较为困难,通过提取所采样品药用部位的 DNA,运用分子生物学技术,建立了玉竹及其掺伪品的快速、准确的鉴别方法。

References:

[1] Chen H, Feng R, Guo Y, et al. Hypoglycemic effects of aqueous extract of *Rhizoma Polygonati Odorati* in mice and rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2001, 74(3): 225-229.  
 [2] Ch P (中国药典) [S]. Vol 1. 2005.  
 [3] Liu T S, Li Z, Liu C L. Analysis of *Polygonatum odoratum* and its substitutes by RAPD [J]. *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 2002, 37: 734-736.  
 [4] Wu S A, Yang J, Rao G Y. Systematic position of *Polygonatum simizui* based on morphological, cytological and chloroplast DNA sequence data [J]. *Bot J Linnean Society*, 2001, 137: 291-294.  
 [5] Doyle J J, Doyle J L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue [J]. *Phytochem Bull*, 1987, 19: 11-15.  
 [6] Kim C S, Lee C H, Shin J S, et al. Simple and rapid method for isolation of high quality genomic DNA from fruit trees and conifers using PVP [J]. *Nuclei Acids Res*, 1997, 25(5): 1085-1086.