

• 药材与资源 •

木香饮片和新鲜药材 DNA 片段的克隆及同源性比较分析

唐金凤, 聂媛媛, 桂柳姿, 鲁耀邦*

湖南中医药大学药学院, 中药药性与药效三级科研实验室, 湖南省中药现代化研究实验室, 湖南 长沙 410208

摘要: 目的 对木香的饮片和新鲜药材进行 DNA 片段的比对分析, 为木香的鉴定提供研究思路。方法 选取木香饮片和新鲜药材, 利用 CTAB 法提取其基因组总 DNA, 再进行 PCR 扩增筛选随机引物, 找出能同时扩增饮片及新鲜药材基因组总 DNA 的随机引物, 对饮片及新鲜药材基因组总 DNA 扩增产生的一致性条带进行克隆, 得到阳性菌落, 经转化子鉴定后测序。对所测序列进行生物信息学分析和同源性比较。结果 木香饮片与新鲜药材长度均为 794 bp 的克隆片段序列相似度达 99.75%, 长度为 1 116 bp 的克隆片段的核苷酸水平比对及氨基酸水平比对的相似度均为 100%。结论 采用分子生物学手段能对木香饮片和新鲜药材进行鉴定。

关键词: 木香; 分子生物学; DNA; 克隆; 生物信息学**中图分类号:** R282.12 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2012)04-0761-05Cloning and homological comparison analysis on DNA fragments of processed pieces and fresh roots of *Saussurea lappa*

TANG Jin-feng, NIE Yuan-yuan, GUI Liu-zi, LU Yao-bang

Key Laboratory of Modernization of Chinese Medicine of Hunan Province, Laboratory of Nature and Effectiveness of Chinese Medicine, School of Pharmacy, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China

Abstract: Objective To compare with the DNA fragments of the processed pieces and fresh roots of *Saussurea lappa* and provide reference for identification. **Methods** Processed pieces and fresh roots of *S. lappa* were selected to extract the total DNA using CTAB method and PCR amplification was used to screen the random primers which could simultaneously amplify total DNA of both the two materials. To clone the consensus bands acquired by amplifying the genomic total DNA of processed pieces and fresh roots of *S. lappa* and select the positive colony for sequencing after transformation and homological analysis by the biological information sciences. **Results** Sequences similar degree of processed pieces and fresh roots of *S. lappa* were 99.75% and 100%, respectively. **Conclusion** The molecular biology is an effective method to identify the processed pieces and fresh roots of *S. lappa*.

Key words: roots of *Saussurea lappa* C. B. Clarke; molecular biology; DNA; clone; biological information sciences

目前中药饮片在国际上尚未形成统一的检测标准, 且安全性难以判断, 这些是中药进入国际市场的最大障碍, 也是影响中药国际竞争力的瓶颈^[1]。市场销售的饮片杂质多, 水分高, 掺杂伪品及使用低劣中药饮片时有发生。因此, 如何科学准确鉴定中药饮片成为中药鉴定领域的当务之急。

我国传统的中药材鉴定方法有其自身的局限性, 如性状鉴定、基原鉴定、显微鉴定都具有较强的主观性; 而理化鉴定操作繁琐, 并且大部分中药尚无法确定标识成分。近年来, 随着分子生物学技

术在中药领域的渗透与发展, 基于 DNA 分子标记技术的分子鉴定方法已成为中药四大鉴定方法的重要补充^[2-5]。DNA 分子标记技术的优势在于直接分析的是生物的基因型而非表现型, 鉴别结果不受环境因素、样品形态和材料来源的影响, 因此可为中药品种鉴别提供更加准确可靠的手段^[6-7]。生物信息学^[7]是建立在分子生物学的基础上以计算机为工具对生物信息进行储存、检索和分析的科学。生物信息学的主要研究方向有序列比对、蛋白质结构比对和预测、基因识别非编码区分析研究、分子进化和

收稿日期: 2011-09-16

基金项目: 国家中医药管理局归国留学人员择优资助项目 (2006 LHR 19); 湖南省中药学重点学科资助项目

作者简介: 唐金凤 (1985—), 女, 湖南衡阳人, 在读硕士研究生, 研究方向为中药资源与质量研究。E-mail: abcdtangjf@163.com

*通讯作者 鲁耀邦 E-mail: luyb414@sina.com

比较基因组学和序列重叠群装配等。本研究旨在以 DNA 分子标记技术为研究手段、以生物信息学为分析方法,寻找木香饮片与其新鲜药材碱基序列相似度较高的 DNA 片段,从而对饮片进行来源鉴定,为中药饮片鉴定、中药品种分类提供理论依据和技术支持。

1 材料与试剂

1.1 材料

木香饮片购于岳阳药材公司,编号为 20090504,经湖南中医药大学中药鉴定教研室刘塔斯教授鉴定为菊科植物木香 *Saussurea lappa* C. B. Clarke 的干燥根。木香新鲜根采自云南昭通市彝良县毛泽乡,经湖南中医药大学中药资源学教研室周日宝教授鉴定为菊科植物木香 *Saussurea lappa* C. B. Clarke 的新鲜根,编号为 20090527,于-70℃条件下保存。

1.2 试剂

Plant Genomic DNA Kit (北京 Tiangen 公司); Qiaex Gel Extraction Kit 凝胶回收试剂盒 (美国 QiaGen 公司); TaKaRa PMD19-T Vector (大连宝生物工程股份有限公司); 琼脂糖 (Promega 有限公司, Spain 分装); 随机引物 (上海生物工程公司); Taq 酶 (2.5 U/ μ L, Toyobo. Co.); λ DNA/EcoR I + Hind III Marker、100 bp DNA ladder Marker R、Nase A (北京鼎国生物技术有限公司); DH_{5 α} 由湖南中医药大学生物工程实验室提供。

溶液 I: 葡萄糖 0.9 g (50 mmol/L), Tris-HCl (pH 8.0) 2.5 mL (25 mmol/L)、EDTA (pH 8.0) 2 mL (10 mmol/L), 加超纯水至 100 mL, 加热搅拌使溶解, 灭菌备用, 4℃保存。溶液 II: NaOH 0.8 g (0.2 mmol/L), 超纯水至 100 mL, 搅拌使溶解; 10% SDS 10 mL (终浓度 1%), 加超纯水至 100 mL, 加热搅拌使溶解, 灭菌备用, 使用前临时配制。4℃保存。溶液 III: 5 mmol/L 醋酸钾 60 mL, 冰醋酸 11.5 mL, 加超纯水至 100 mL, 搅拌使溶解, 4℃保存。

1.3 仪器

超纯水系统 (北京帕思特科技有限公司), 高压灭菌锅 (造鑫企业有限公司), 高速冷冻离心机 (湖南赛特湘仪高速离心机), PCR 扩增仪、核酸蛋白分析仪、微量移液枪 (德国 Eppendorf 公司)。

2 方法

2.1 木香基因组总 DNA 的提取及纯化

参照文献 CTAB 法^[8], 进行木香新鲜药材及饮

片基因组 DNA 的提取及纯化。采用分光光度法检测 DNA 的纯度; 用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的完整性。

2.2 木香基因组总 DNA 的 RAPD 扩增

用上海生工生物技术有限公司合成的 87 个 RAPD 引物分别进行 PCR。PCR 反应体系: 模板 1 μ L, 10 $\times$ PCR 缓冲液 (含 20 mmol/L Mg²⁺) 2 μ L, dNTPs (10 mmol/L) 0.53 μ L, RAPD 引物 0.67 μ L, Taq 酶 0.2 μ L, 用无菌水补足至 20 μ L。PCR 反应条件为: 94℃、5 min; 94℃、30 s, 36℃、50 s, 72℃、2 min 共 43 个循环; 72℃、5 min, 4℃保温。通过试验, 筛选出能同时扩增木香饮片、新鲜根基因组总 DNA 并能产生一致性条带的引物为 S₃₁ (CAATCGCCGT)。PCR 产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。

2.3 目的 DNA 片段回收

参照 QIAEX Gel Extraction Kit 说明书进行操作。取 8 μ L 回收液进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 剩余回收液置-20℃冰柜中保存备用。

2.4 目的 DNA 片段克隆与测序

2.4.1 感受态细胞的制备 将 DH_{5 α} 进行活化, 于 37℃ 生化培养箱中过夜培养。将活化的 DH_{5 α} 单菌落接种于 LB 液体培养基, 37℃、150 r/min 振荡培养过夜。将菌液以 1:50 的比例接种于装有 100 mL 的 LB 液体培养基中, 37℃、170 r/min 剧烈振荡 2~3 h, 每隔 30 min 测定 A₆₀₀ 值, 若 A₆₀₀ 值在 0.3~0.4 则停止培养。将培养液转入已灭菌的 50 mL 聚丙烯管中, 冰上放置 10 min。4℃、5 000 r/min 离心 5 min, 弃上清液。加入 20 mL、-20℃预冷的 0.1 mmol/L CaCl₂, 混匀, 冰上放置 5 min。4℃、5 000 r/min 离心 10 min, 弃上清液。加入 20 mL、-20℃预冷的 0.1 mmol/L CaCl₂-15% 甘油混合溶液, 混匀, 即成感受态细胞悬液。每 200 μ L 分装, -80℃备用。

2.4.2 连接与转化 按照 PMD19-T Vector 试剂盒说明书进行连接操作。将连接产物加入到已于冰上解冻的 DH_{5 α} 感受态细胞中, 冰上放置 30 min; 42℃热击 90 s, 迅速置于冰上 5 min; 加入 SOC 培养液, 37℃、150 r/min 振荡培养 60 min, 涂布于加入氨苄青霉素并涂有 X-Gal、IPTG 的 LB 平板上; 37℃倒置培养 16~24 h。

2.4.3 摇菌培养 挑白色菌落于加入氨苄青霉素的 LB 液体培养基中, 37℃、150 r/min 培养过夜。

2.4.4 转化子的鉴定 取 1 μ L 白色菌落培养液用

相应的引物进行 PCR 转化子鉴定,若能扩增出目标条带则为阳性菌。

2.4.5 目的 DNA 片段的序列测定 将阳性菌液送华大基因科技股份有限公司进行测序。

3 结果

3.1 木香基因组总 DNA 纯度及完整性检测

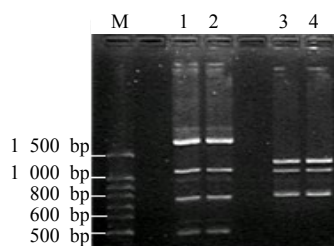
对提取的木香饮片纯化的基因组总 DNA 和新鲜药材基因组总 DNA 进行紫外检测。两种基因组 DNA 均清亮,饮片基因组总 DNA 质量浓度为 79 $\mu\text{g/mL}$, A_{260}/A_{280} 为 2.09;新鲜药材基因组总 DNA 质量浓度为 144 $\mu\text{g/mL}$, A_{260}/A_{280} 为 2.13,符合 PCR 扩增要求。

3.2 木香基因组总 DNA 的 RAPD 扩增

对 120 种 RAPD 引物 ($S_1 \sim S_{120}$) 进行 PCR 筛选,以能够同时扩增饮片和新鲜药材相似片段为标准确定引物^[9]。用筛选的 S_{31} 引物分别对木香饮片和新鲜药材进行 PCR 扩增,结果见图 1。木香饮片基因组总 DNA 分别在 700~800、1 000~1 500 bp 出现扩增条带。木香新鲜药材基因组总 DNA 分别在 500、700~800、1 000~1 500、1 500 bp 以上处出现扩增条带。其中,二者在 700~800、1 000~1 500 bp 处有两组条带长度基本一致。对木香饮片与新鲜药材 PCR 产物相似条带进行凝胶回收,2 次扩增后采用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测,结果见图 2。木香饮片与新鲜药材 DNA 分别在 700~800、1 000~1 500 bp 处出现条带,二者条带长度基本一致,与 PCR 扩增结果相符。

3.3 木香目的片段的克隆

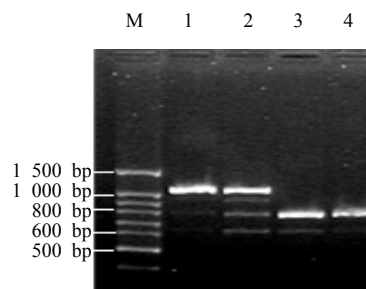
木香饮片与新鲜药材 DNA 片段克隆的蓝白斑筛选结果见图 3。其中白色单菌落为阳性菌落,由图 3 可知,转化率高。挑取饮片与新鲜药材各 4 个



M-Marker 1、2-木香新鲜药材 3、4-木香饮片
M-Marker 1 and 2-fresh roots of *S. lappa*
3 and 4-processed pieces of *S. lappa*

图 1 PCR 电泳检测图

Fig. 1 Electrophoresis of PCR



M-Marker 1、3-木香新鲜药材 2、4-木香饮片
M-Marker 1 and 3-fresh roots of *S. lappa*
2 and 4-processed pieces of *S. lappa*

图 2 凝胶回收电泳检测图

Fig. 2 Electrophoresis of recovered agarose gel

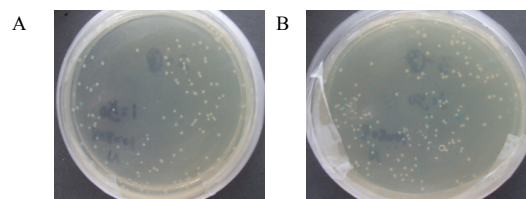


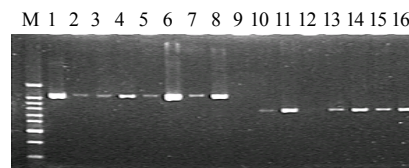
图 3 木香饮片 (A) 和新鲜药材 (B) 蓝白斑筛选图

Fig. 3 Blue-white screening of processed pieces (A) and fresh roots of *S. lappa* (B)

白色阳性菌落培养液为模板,用引物 S_{31} 进行 PCR 扩增结果见图 4。其中木香饮片与新鲜药材转化子 DNA 大部分在 700~800、1 000~1 500 bp 条带长度一致,均与凝胶回收结果一致,即所挑菌落为阳性克隆菌。

3.4 目的 DNA 片段序列测定及分析

3.4.1 目的 DNA 片段序列的测定 对木香饮片和新鲜药材各 8 份在 700~800、1 000~1 500 bp 处的 DNA 扩增结果见图 4。其中木香饮片与新鲜药材转化子条带进行测序,得到下列两组完整序列(图 5~8):以上序列分别为 794 bp 和 1 116 bp 的条带。由 DNA



M-Marker 1~4、9~12-木香新鲜药材
5~8、13~16-木香饮片
M-Marker 1—4 and 9—12-fresh roots of *S. lappa*
5—8 and 13—16-processed pieces of *S. lappa*

图 4 转化子鉴定图

Fig. 4 Identification of transformants

CAATC GCCGTCAGCA TCTCACAGAA GAGAATGTGA GCCATATTTA TGCTTCTGTT GAAGAAGAGA GCATACATTA
TGGCTAGAAT CGCTGGATGG GTCTGATCCT GGCTTCCAAT CTTGCAGGTA ATTGTTCGGT TGAGAACACT AAACATAAAG
TTCCACTTGG GAGGCAGGTA CTGATGTCTG AATTGACTTA GGCGTGTGAT CTCCTTGTTG TAGCCAAAGT GTTGGAGGAA
CTGAAGAAAG ACTTATTGAG TTGGTAGTTT CTCAAAGGTT TCTATTTGAA GATCAATTTT TGTGAGCAGG TTGAATCGGT
GAGTTAGGGT TTGTGGGGTG ATTCTTATGT TCATGCTTTG TTCACCTAGG TCAATGTACC CAACCACTCC TTCCTTTTCA
TCATCGTATT CACTTGAATA CCACCATGTG TGGACAAAAGC GTAGAGGAAT ATCTGAAGCA TGTTTGGTGA GGACATCGTT
GAGTTCACAG TTGGTCAAAA AGTCTAGTAT TGGGCGAAAC TGCTCATCGT ATTTGGTAGG GGTGACGTCC AGAAAGTAGT
TGTTACCTTT CACCGAAACA TCAAACATG CCATATTCAA GCTTGAACA AGTTTGCTGG AGTTATCTGA GGTTTGGGAA
TGAGCCGCCA TTGTTGCAGG TTTTGTAGAA AGATGAGAGC TTAGAAAGAG AGATTGGGA TTTTGGATTC TGAGAGCGTA
AAGAATAATG AGAAGAGAAA AAAAGGGTTT TTATGGACAG AAAAAAAGGT AGAGGGAGAG GTTATGGAAG CGGCGATTG

图 5 木香饮片 DNA 克隆片段 (794 bp) 的测序结果

Fig. 5 Sequence of DNA cloned segment (794 bp) from processed pieces of *S. lappa*

CA ATCGCCGTTA TAGGTTACAA TTTCTAGTA AACAGAATCT TTATCCTTTT TTTGAGGTG ATAGGTTTCA ACATGCGCGC
CACCTGCCCC GAAATAGGTT TTAGGTACGT TCTTCTTGGC CTCTCGTCG TCGTTAGAGA TCTTTTTTAT CACTTTACCG
TCCAGGTCAA AAAATAGGGT GCTTTTCTTG GTACGTACAG TAACACGCTC GGTGCCGTCG AGTTTTTCTA CCACAAAGCC
CCAAAGTTG TTTTCTCTT TTTTAGTGCT TTCTGCGGT ACTTCTTGG CATCTATTTT AGACCTGAAT TTGCCCTGGT
TAGTAAAAAT ATACACCGAA CGGTATCAT AATCAAAAA CACAAAGTGG TTTTCAACGA GCTGTAAAT ATCAATATTG
CCGAAAAGGC TTTCTTAGT GGTTCGAGG GGGATAAAT CAACCTCGCT GAATACATCG GATACGGCTG CGCCCATGGC
GTAAACAGGG TCGATACGTA ATTAAACAAG TTTTGAGCTA TCGGGAAGAT CTGACTGGGC CAATAAGGCT AACGGAAATA
AAAAAATAG AATTATTAAT ACTAAGGCTT TTTTAGGTTT CATTTAATG TGCTGGTTT GGTGCCACAA GTATATCAAA
TTAAATCAIT TATGTATGTT AAATATGGTA TCAITTAAT GACAAAAGGC CTAAATGGTA TTATGGCAT ATTGTTTTGC
CATGGTTTGA AAGCAATTIA ACCTTTTGTT AAATATCAGA TTGTTAACGC TGCTTTCGCG TCTTCTTTCT TCAATACATC
GATAAGGCCT TTTACATCTT TGCTTTCCAT CATTAGCAG GGCTTAGTA AAAAGCTTAC AAAAAAGCCC GGTTTTATAA
CGCGTTGAGC AATCAGCAGC ACATTGTCGT CAATTAGTTT AATGTGTTGG GTTTTGGTAT GGGCATCTTC ATAAGCAAGC
AGCAGGGCAT TTGCCAGGC CGCTTTGCGG GCTGCGGATA TACTGAAGTT AAGAACCACC TCTTCCCGTT TGTTACTTAT
TTGGTGAGG AAACGCAGCG GAAACCAGAT CTGGCTCAGC TTTTCTGTA TGTATTGCT AAGTACGGCG ATTG

图 6 木香饮片 DNA 克隆片段 (1 116 bp) 的测序结果

Fig. 6 Sequence of DNA cloned segment (1 116 bp) from processed pieces of *S. lappa*

CAATC GCCGTCAGCA TTTTACAGAA GAGAATGTGA GCCATATTTA TGCTTCTGTT GAAGAAGAGA GCATACATTA
TGGCTAGAAT CGCTGGATGG GTCTGATCCT GGCTTCCAAT CTTGCAGGTA ATTGTTCGGT TGAGAACACT AAACATAAAG
TTCCACTTGG GAGGCAGGTA CTGATGTCTG AATTGACTTA GGCGTGTGAT CTCCTTGTTG TAGCCAAAGT GTTGGAGGAA
CTGAAGAAAG ACTTATTGAG TTGGTAGTTT CTCAAAGGTT TCTATTTGAA GATCAATTTT TGTGAGCAGG TTGAATCGGT
GAGTTAGGGT TTGTGGGGTG ATTCTTATGT TCATGCTTTG TTCACCTAGG TCAATGTACC CAACCACTCC TTCCTTTTCA
TCATCGTATT CACTTGAATA CCACCATGTG TGGACAAAAGC GTAGAGGAAT ATCTGAAGCA TGTTTGGTGA GGACATCGTT
GAGTTCACAG TTGGTCAAAA AGTCTAGTAT TGGGCGAAAC TGCTCATCGT ATTTGGTAGG GGTGACGTCC AGAAAGTAGT
TGTTACCTTT CACCGAAACA TCAAACATG CCATATTCAA GCTTGAACA AGTTTGCTGG AGTTATCTGA GGTTTGGGAA
TGAGCCGCCA TTGTTGCAGG TTTTGTAGAA AGATGAGAGC TTAGAAAGAG AGATTGGGA TTTTGGATTC
TGAGAGCGTA AAGAATAATG AGAAGAGAAA AAAAGGGTTT TTATGGACAG AAAAAAAGGT AGAGGGAGAG
GTTATGGAAG CGGCGATTG

图 7 木香新鲜药材 DNA 克隆片段 (794 bp) 的测序结果

Fig. 7 Sequence of DNA cloned segment (794 bp) from fresh roots of *S. lappa*

CAA TCGCCGTTAT AGGTTACAAT TTTCTAGTAA ACAGAATCTT TATCCTTTT TTTGAGGTGA TAGGTTTCAA
CATGCGCGCC ACCTGCCCCG AAATAGGTTT TAGGTACGTT CTTCTTGGC TCCTCGTCG CTGTAGAGAT CTTTTTATC
ACTTTACCGT CCAGGTCAAA AAATAGGGTG CTTTCTCTGG TACGTACAGT AACACGCTC GTGCCGTCGA GTTTTCTAC
CACAAAGCCC CAAAAGTTGT TTTCTCTTT TTTAGTGCTT TCCTGCGGTA CTTTCTTGGC ATCTATTTTA GACCTGAAT
TGCCCTGGTT AGTAAAAATA TACACCGAAC GGGTATCATA ATCAAAAAAC ACAAAGTGGT TTTCAACGAG CTGTAAATTA
TCAATATTGC CGAAAAGGCT TTCTTAGTG GTTTGAGGTT GGATAAATC AACCTCGCTG AATACATCGG ATACGGCTGC
GCCATGGCG TTAACAGGGT CGATACGTAA TTTAACAAGT TTTGAGCTAT TTTGAGCTAT CGGGAAGATC TGACTGGGCC AATAAGGCTA
ACGGAATAAA AAAAAATAGA ATTATTAATA CTAAGGCTTT TTTAGGTTTC ATTTAATTGT GGCTGGTTTG GTGCCACAAG
TATATCAAAT TAAATCATTT ATGTATGTTA AATATGGTAT CATTAAATG ACAAAGGCC TAAATGGTAT TTATGGCATA
TTGTTTGGC ATGGTTGAA AGCAATTAA CCTTTTGTTA AATATCAGAT TGTTAACGCT GCTTTCGCGT CTCTTTCTT
CAATACATCG ATAAGGCCTT TTACATCTTT GCTTTCCATC ATTAGCACGG GCTTTAGTAA AAAGCTTACA AAAAAAGCCC
GTTTTATAAC GCGTTGAGCA ATCAGCAGCA CATTGCTGTC AATTAGTTAA TGTGTTGGGT TTGGTATGG CATCTCATA
AGCAAGCAGC AGGCATTG CCCAGGCCG TTTGCGGGCT CGGATATAC TGAAGTTAAG AACCGCTCT TCCCGTTTGT
TACTTATTTT GGTGAGGAAA CGCAGCGGAA ACCAGATCTG GCTCAGCTTT TCCTGTATGT TATTGCTAAG TACGCGATTG

图 8 木香新鲜药材 DNA 克隆片段 (1 116 bp) 的测序结果

Fig. 8 Sequence of DNA cloned segment (1 116 bp) from fresh roots of *S. lappa*

序列两端的前10个核苷酸分析来看,它与原随机扩增引物的核苷酸序列完全吻合。说明此4段DNA序列的确由引物S₃₁(CAATCGCCGT)扩增得到。

3.4.2 木香目的DNA序列的生物信息学分析 分别将木香饮片与新鲜药材DNA片段对应的碱基序列输入美国NCBI基因数据库(GenBank)作BLAST比对搜索及用DNAMAN软件进行相似性对比分析。结果表明,木香饮片与新鲜药材长度均为794 bp的克隆片段序列相似度达99.75%,但在碱基13 bp(新鲜药材碱基为A,饮片碱基为G)、17 bp处不匹配(新鲜药材碱基为T,饮片碱基为C),其氨基酸水平的比对相似度亦为99.75%;木香饮片与新鲜药材长度为1 116 bp的克隆片段的核苷酸水平比对及氨基酸水平比对的相似度均为100%。

4 讨论

相似性(similarity)和同源性(homology)^[10]是两个完全不同的概念。同源序列是指从某一共同祖先经过趋异进化而形成的不同序列。相似性是指序列比对过程中检测序列和目标序列之间相同碱基或氨基酸残基序列所占比例的大小。当两条序列同源时,它们的氨基酸或核苷酸序列通常有显著的一致性(identity)^[11]。序列相似性可以作为推断基因同源性的一个参考标准^[12]。本研究通过两种药材饮片与新鲜药材的序列对比分析,序列相似度99%~100%,核苷酸序列具有显著一致性,能够说明二者具有同源性的问题,即饮片与新鲜药材同属于同种属植物,来源相同。

从饮片和新鲜药材DNA碱基序列上来看,饮片DNA碱基序列出现碱基不匹配的情况。不匹配的原因可能有以下几方面:一、扩增时出现的错配现象;二、新鲜药材与饮片来自不同的产地,不匹配可能来自于碱基突变。碱基突变是生物进化的基础,突变不仅包括狭义上的碱基突变,即转换和颠换,还包括能造成移码突变的一个或多个碱基的插入及缺失。从“效应”角度来看,突变可以分为表型突变和沉默突变。从“来源”角度来看,突变还可以分为自发突变和诱导突变^[13]。本研究中饮片和新鲜药材DNA碱基上的差异应属于因产地及个体的不同而导致的沉默突变和自发突变。在大量的饮片与新鲜药材DNA片段克隆探索实验过程中,发现新鲜药材出现蓝白斑假阳性的概率更大。这种现象是否存在统计学意义,还有待进一步证实。在进行蓝白斑筛选时,假阳性的出现是不可避免的。

原因可能是质粒没有进入大肠杆菌细胞或者质粒重组,从而出现白色假阳性菌落。判断是否为假阳性,需进行多次转化子鉴定。

随着生命科学研究的不突破,采用DNA分子技术鉴定^[14-15]中药饮片,利用生物信息学对中药饮片进行鉴定分析终将成为饮片鉴定领域的发展趋势和最终目的,对中药种质资源鉴定也将具有根本性的指导意义。本研究为中药饮片鉴定提供了新的研究思路和理论支持,为中药鉴定走向成熟提供科学基础。

参考文献

- [1] 薛文礼. 中药产业国际竞争力的生产要素现状及评价[J]. 辽宁中医药大学学报, 2007, 9(3): 40-42.
- [2] 江峰. DNA指纹图谱技术及其在中药研究中的应用[J]. 海峡药学, 2005, 17(4): 183-185.
- [3] 冯尚国, 胡旭, 赵红燕, 等. DNA分子标记在铁皮石斛研究中的应用[J]. 中草药, 2010, 41(3): 499-附2.
- [4] 吴幼, 赵秦, 张晓瑜. DNA指纹图谱技术应用于中药品质鉴定的研究进展[J]. 中兽医医药杂志, 2008, 27(1): 24-26.
- [5] 胡妮娜, 田淑琴, 于景伟. 传统中药鉴定方法的研究发展概况[J]. 中医药信息, 2008, 25(3): 15-18.
- [6] Fushimi H, Komatsu K, Isobe M, et al. 18S ribosomal RNA gene sequences of three Panax species and the coresponding ginseng drugs[J]. Biol Pharm Bull, 1996, 19(11): 1530-1532.
- [7] Fushimi H, Komatsu K, Isobe M, et al. Application of PCR-RFLP and MASA analyses on 18S Ribosomal RNA gene sequence for the identification of three ginseng drugs[J]. Biol Pharm Bull, 1977, 20: 765-766.
- [8] 陈铭. 后基因时代的生物信息学[J]. 生物信息学, 2010, 2(2): 29-34.
- [9] 周延清. DNA分子标记技术在植物研究中的应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005.
- [10] Fitch W M. Homology: a personal view on some of the problems[J]. Trends Genet, 2000, 16: 227-231.
- [11] 山红艳. 形态性状、分子性状与同源性[J]. 植物学通报, 2007, 24(1): 71-79.
- [12] Patterson C. Homology in classical and molecular biology[J]. Mol Biol Evol, 1988, 5: 603-625.
- [13] 陈玲玲, 彭贵子, 张伟丽, 等. 突变在基因组进化中的意义[J]. 遗传, 2006, 28(5): 631-638.
- [14] 王清波, 鲁耀邦, 郭纯, 等. 梔子遗传多样性的ISSR研究[J]. 湖南中医药大学学报, 2009, 29(3): 80-83.
- [15] 鲁耀邦, 刘平安, 李彬, 等. 梔子DNA指纹图谱的RAPD分析[J]. 湖南中医药大学学报, 2007, 27(SI): 272-274.