

## 鼓槌石斛特异性 PCR 分子鉴定

郑司浩, 黄林芳\*, 陈士林\*

中国医学科学院 北京协和医学院药用植物研究所, 北京 100193

**摘要:** **目的** 研究能够特异性鉴别鼓槌石斛的 PCR 引物, 并优化 PCR 检测体系, 确立一种快速、准确鉴别鼓槌石斛的方法。**方法** 从 GenBank 数据库中下载石斛属 rDNA ITS 序列 170 余条, 运用 MEGA 5.0 对所有序列进行同源性比较, 找出各变异位点, 在非保守区设计 1 对特异性引物。对 35 份石斛属植物 DNA 模板进行特异性引物 PCR 扩增, 显示阳性者为鼓槌石斛。**结果** 将退火温度升至 58 °C 时, 鼓槌石斛能被该引物特异性地扩增出来, 而其他石斛属植物均为阴性, 且该引物的灵敏度可达到 0.69 ng/μL。**结论** 建立一种特异性鉴别鼓槌石斛的方法, 运用该特异性引物可实现从同源物种中快速、准确地鉴定出鼓槌石斛, 具有特异性好, 操作简便、高效、准确等优点。

**关键词:** 鼓槌石斛; 特异性; PCR; 分子鉴定; 石斛属

中图分类号: R282.21 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2013)06-0744-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.06.021

## Specific PCR molecular identification of *Dendrobium chrysotoxum*

ZHENG Si-hao, HUANG Lin-fang, CHEN Shi-lin

Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100193, China

**Abstract: Objective** To design a pair of PCR primers that could identify *Dendrobium chrysotoxum* specifically, to optimize the system of PCR detection, and to establish a method to identify *D. chrysotoxum* rapidly and accurately. **Methods** From GenBank database, rDNA 170 ITS sequences in the plants of *Dendrobium* Sw. were downloaded and compared with all sequences using MEGA 5.0; The variation sites were located, and a pair of specific primers in the non-conservative district were designed. PCR amplification was performed using the specific primers with 35 DNA templates in the plants of *Dendrobium* Sw., *D. chrysotoxum* was positive. **Results** *D. chrysotoxum* could be specifically amplified by specific primers when the annealing temperature was raised to 58 °C, while other plants of *Dendrobium* Sw. were shown as negative, and the sensitivity of the primer could reach 0.69 ng/μL. **Conclusion** This study designs a method that could identify *D. chrysotoxum* specifically. Using this specific primer could identify *D. chrysotoxum* rapidly and accurately from the homologous species. This method is well-performed in specificity, and it is more simple, convenient, efficient, and accurate than other methods, such as morphological and microscopical identification, chromatograph, and spectral method.

**Key words:** *Dendrobium chrysotoxum* Lindl.; specificity; PCR; molecular identification; *Dendrobium* Sw.

鼓槌石斛 *Dendrobium chrysotoxum* Lindl. 是《中国药典》2010 年版石斛的主要来源之一, 有益胃生津, 滋阴清热之功效<sup>[1]</sup>。在民族药中主治病后虚热、口干烦渴、肿痛, 称为南该龙。早在《神农本草经》中就已有记载。鼓槌石斛不仅是名贵中药材, 同时也具有很高的观赏价值。鼓槌石斛中主要含有毛兰素 (erianin, 3-羟基-4, 3', 4', 5'-四甲氧基联苕)、毛兰菲 (confusarin, 2, 7-二羟基-1, 5, 6-

三甲氧基菲)、β-谷甾醇等成分<sup>[2]</sup>, 现代药理研究表明, 鼓槌石斛主要成分毛兰素抗肿瘤作用显著, 特别是对肝癌的抑癌率达 50.82%<sup>[3-4]</sup>。由于盲目过度采挖、生境破坏及其自身天然更新能力差、生长缓慢等原因, 鼓槌石斛野生资源骤减, 栽培状况也由于技术不成熟、管理和采收不合理等因素导致产量较低。市场上鼓槌石斛的混伪品, 如球花石斛 *D. thyrsiflorum* Rchb.、重唇石斛 *D. hercoglossum* Rchb.

收稿日期: 2013-01-15

作者简介: 郑司浩 (1989—), 男, 硕士, 研究方向为中药质量评价与品质鉴定。Tel: 18911037217 E-mail: zshzha@163.com

\*通信作者 黄林芳 Tel: (010)57833197 E-mail: lhuang@implad.ac.cn

陈士林 E-mail: slchen@implad.ac.cn

f、流苏金石斛 *Flickingeria fimbriata* (Bl.) Hawkes、齿瓣石斛 *D. devonianum* Paxt.、束花石斛 *D. chrysanthum* Wall. ex Lindl.、美花石斛 *D. loddigesii* Rolfe、叠鞘石斛 *D. aurantiacum* Rchb. f. var. *denneanum* (Kerr) Z. H. Tsi、密花石斛 *D. densiflorum* Wall. 等越来越多, 传统的形态学鉴别方法很难准确鉴定。本实验旨在建立一种快速、准确鉴别鼓槌石斛的方法, 利用 GenBank 数据库中石斛属 ITS 序列, 运用生物学软件 MEGA、DNAMAN 在鼓槌石斛的 ITS 序列非保守区设计出一对约 20 bp 可以特异性检测鼓槌石斛的 PCR 引物, 对 35 份石斛属植物的 DNA 模板进行 PCR 扩增, 显示为阳性者即为鼓槌石斛, 并对引物的灵敏度进

行考察。本研究为鼓槌石斛的鉴别提供了一种分子检测方法, 该方法操作简便、快速, 引物灵敏度高。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

本实验所用材料产自广西、四川、云南等地, 共计 35 份, 见表 1, 其来源由中国科学院植物所郎楷永教授鉴定。引物由诺赛公司合成, 引物序列为上游引物 F: 5'-CAAAGGATGGACGAACCCA-3' 和下游引物 R: 5'-CGCAGCCAACGAGATGATT-3'。所用试剂盒购自 TianGen 公司, 型号为植物基因组 DNA 提取试剂盒 (离心柱型) 200 preps。所用 PCR 仪型号为东胜龙 ETC-811。

表 1 样品来源

Table 1 Source of samples

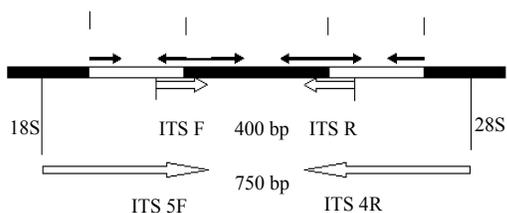
| 编号 | 材料                                 | 采集时间       | 采集地点   | 编号 | 材料                                  | 采集时间       | 采集地点 |
|----|------------------------------------|------------|--------|----|-------------------------------------|------------|------|
| 1  | 鼓槌石斛 <i>Dendrobium chrysotoxum</i> | 2011-04-29 | 云南普洱   | 19 | 铁皮石斛 <i>D. officinale</i>           | 2011-04-21 | 广西百色 |
| 2  | 鼓槌石斛                               | 2011-05-01 | 四川雅安   | 20 | 铁皮石斛                                | 2011-04-21 | 广西百色 |
| 3  | 鼓槌石斛                               | 2011-03-16 | 广西百色   | 21 | 铁皮石斛                                | 2011-05-07 | 云南普洱 |
| 4  | 鼓槌石斛                               | 2011-04-29 | 云南普洱   | 22 | 球花石斛 <i>D. thyrsiflorum</i>         | 2011-05-01 | 四川雅安 |
| 5  | 鼓槌石斛                               | 2011-05-01 | 四川雅安   | 23 | 球花石斛                                | 2011-03-16 | 广西百色 |
| 6  | 鼓槌石斛                               | 2011-03-16 | 广西百色   | 24 | 重唇石斛 <i>D. hercoglossum</i>         | 2011-05-02 | 四川雅安 |
| 7  | 金钗石斛 <i>D. nobile</i>              | 2011-05-01 | 云南瑞丽   | 25 | 重唇石斛                                | 2011-05-01 | 云南瑞丽 |
| 8  | 金钗石斛                               | 2011-05-10 | 广西百色   | 26 | 流苏金石斛 <i>Flickingeria fimbriata</i> | 2011-05-02 | 广西百色 |
| 9  | 金钗石斛                               | 2011-05-15 | 贵州赤水   | 27 | 流苏金石斛                               | 2011-05-02 | 四川雅安 |
| 10 | 金钗石斛                               | 2011-05-01 | 云南瑞丽   | 28 | 细茎石斛 <i>D. moniliforme</i>          | 2011-05-04 | 云南瑞丽 |
| 11 | 金钗石斛                               | 2011-05-10 | 广西百色   | 29 | 细茎石斛                                | 2011-05-05 | 四川雅安 |
| 12 | 金钗石斛                               | 2011-05-07 | 云南西双版纳 | 30 | 齿瓣石斛 <i>D. devonianum</i>           | 2011-05-04 | 云南瑞丽 |
| 13 | 流苏石斛 <i>D. fimbriatum</i>          | 2011-03-16 | 广西百色   | 31 | 束花石斛 <i>D. chrysanthum</i>          | 2011-03-16 | 广西百色 |
| 14 | 流苏石斛                               | 2011-05-10 | 云南瑞丽   | 32 | 美花石斛 <i>D. loddigesii</i>           | 2011-03-16 | 广西百色 |
| 15 | 流苏石斛                               | 2011-04-28 | 云南普洱   | 33 | 细叶石斛 <i>D. hancockii</i>            | 2011-03-16 | 广西百色 |
| 16 | 流苏石斛                               | 2011-03-16 | 广西百色   | 34 | 叠鞘石斛 <i>D. aurantiacum</i>          | 2011-03-16 | 广西百色 |
| 17 | 流苏石斛                               | 2011-05-10 | 云南瑞丽   | 35 | 密花石斛 <i>D. densiflorum</i>          | 2011-03-16 | 广西百色 |
| 18 | 流苏石斛                               | 2011-04-28 | 云南普洱   |    |                                     |            |      |

### 1.2 方法

**1.2.1 DNA 提取** 取各样品的叶片或根约 30 mg, 磨样机磨碎, 用试剂盒法提取样品 DNA。提取时, 先加入缓冲液 GP 1 700  $\mu$ L, 巯基乙醇 1  $\mu$ L, 65  $^{\circ}$ C 水浴 2 h (期间注意振荡次数); 取出加入氯仿-异戊醇 (24 : 1) 的混合液 700  $\mu$ L, 混合仪摇匀 5 min, 12 000 r/min 离心 5 min 后取上清液, 加入异丙醇 700

$\mu$ L, 混合仪混匀 15~20 min; 将混合液倒入吸附柱内, 放入离心管内 12 000 r/min 离心 40 s; 弃废液, 加缓冲液 500  $\mu$ L, 12 000 r/min 离心 40 s; 弃废液, 加漂洗液 700  $\mu$ L, 12 000 r/min 离心 40 s; 弃废液, 加漂洗液 500  $\mu$ L, 12 000 r/min 离心 40 s; 弃废液, 空管离心 2 min, 室温风干, 加 100  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O 洗脱, 12 000 r/min 离心 2 min。将提取的 DNA 模板-20  $^{\circ}$ C 保存。

**1.2.2 引物筛选** 首先用 ITS 通用引物 ITS 5F 和 ITS 4R 对上述提取的 DNA 模板进行 PCR 扩增, 检测 DNA 提取的质量。通过生物学软件 MEGA、DNAMAN 对 GenBank 数据库下载 170 余条石斛属 rDNA ITS 序列进行对比, 在鼓槌石斛非保守区设计出 3 对约 20 bp 长的特异性引物 (图 1), 经 DNA 合成仪合成后, 分别对所提的 DNA 模板进行特异性扩增, 筛选出的鼓槌石斛扩增条带清晰、其他种显示为阴性的引物, 即为可以特异性检测鼓槌石斛的 PCR 引物。



引物 ITS 5F 和 ITS 4R 为 ITS 通用引物, ITS F 和 ITS R 为扩增鼓槌石斛的特异性引物

ITS 5F and ITS 4R are universal primers of ITS sequence, ITS F and ITS R are specific PCR primer of *D. chrysotoxum*

图 1 ITS 区引物结构示意图

Fig. 1 Structure of primers in ITS region

**1.2.3 PCR 扩增和电泳检测** 通过反复试验, 对扩增的条件和体系参数进行优化。PCR 体系总体积为 26  $\mu\text{L}$ , 其中包含: DNA 模板 3  $\mu\text{L}$ 、ddH<sub>2</sub>O 12.3  $\mu\text{L}$ 、Mg<sup>2+</sup> 2  $\mu\text{L}$ 、缓冲液 2.5  $\mu\text{L}$ 、Dye 染料 2  $\mu\text{L}$ 、dNTPs 2  $\mu\text{L}$ 、Taq DNA 聚合酶 0.2  $\mu\text{L}$ 、引物 F/R 各 1  $\mu\text{L}$ 。PCR 反应条件为: 94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min; 94  $^{\circ}\text{C}$  变性 1 min, 58  $^{\circ}\text{C}$  复性 1 min, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 1.5 min, 共 30 个循环; 最后 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 7 min。扩增结束后以 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 凝胶成像分析系统分析并记录结果。

**1.2.4 引物灵敏度考察** 对所提鼓槌石斛的 DNA 模板进行质量浓度测定, 选取一个合适的 DNA 浓度 (20.7 ng/ $\mu\text{L}$ ), 对其进行梯度稀释, 分别稀释 10 倍 (2.07 ng/ $\mu\text{L}$ )、15 倍 (1.38 ng/ $\mu\text{L}$ )、30 倍 (0.69 ng/ $\mu\text{L}$ )。对所稀释的 DNA 模板用相同的 PCR 体系和反应条件进行特异性引物扩增, 检测该引物所能检测的 DNA 模板浓度的下限。

**1.2.5 鼓槌石斛特异性引物验证** 收集 16 份鼓槌石斛样品, 每份取约 30 mg, 按照上述方法进行 DNA 提取、ITS 通用引物检测 DNA 的质量、特异性引物 PCR 扩增、电泳检测, 反应体系和条件参照“1.2.3”项方法, 验证特异性引物的作用效果。

2 结果与分析

2.1 ITS 通用引物检测 DNA 模板质量

运用 ITS 的通用引物对模板进行扩增, 目的是确定 DNA 的提取质量。如图 2 所示, 扩增所用的 DNA Marker 为 2 000, 其从上到下的条带分别表示 2 000、1 000、750、500、250、100 bp, 可见通用引物扩增的样品 ITS 序列均约 750 bp。由图明显看出, 所提取 DNA 的质量都能达到扩增要求, 模板的杂质较少, 可以进一步筛选引物。

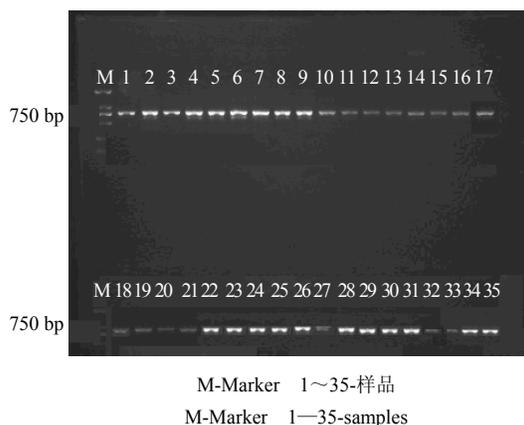


图 2 ITS 通用引物 PCR 产物电泳检测图  
Fig. 2 Electrophoresis of PCR amplification products by ITS universal primer

2.2 特异性引物 PCR 扩增

用筛选好的 PCR 引物对达到扩增要求的 DNA 模板进行扩增。结果如图 3 所示, 1~6 号鼓槌石斛样品扩增呈阳性, 条带整齐、清晰, 大小约 400 bp, 而其他样品均呈阴性, 无条带扩增。由此证明该引物具有良好的特异性。

2.3 特异性引物灵敏度考察

使用相同的 PCR 反应体系和条件, 对不同质量浓度梯度的 DNA 模板进行特异性引物 PCR。条带依

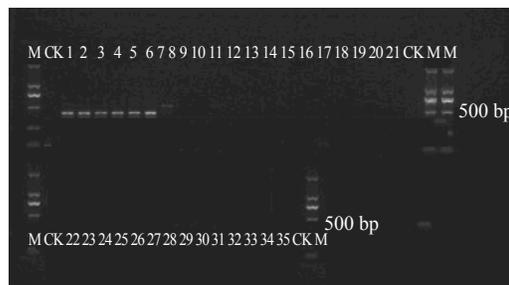
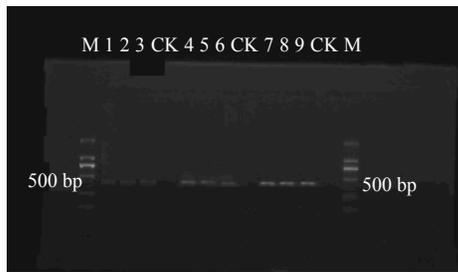


图 3 特异性引物 PCR 产物电泳检测图  
Fig. 3 Electrophoresis of PCR amplification products by specific primer

据 DNA 模板浓度的大小逐渐变暗,当浓度稀释 30 倍时,条带不明显,因此,该引物对鼓槌石斛的检测灵敏度可达 0.69 ng/μL,即可检出样品中约 2.07 ng/μL 的鼓槌石斛,检测灵敏度高,见图 4。

#### 2.4 鼓槌石斛特异性引物的验证

随机收集市售的 16 份鼓槌石斛样品,按照上述步骤,运用特异性引物进行鉴别。1~4 号和 9~12 号有扩增条带,且非常清晰,纯度高,鉴定为鼓槌石斛;其他样品扩增结果为阴性,无条带,鉴定其均不是鼓槌石斛。经鉴定,5~8 泳道对应的样品为金钗石斛,13~16 泳道对应的样品为流苏石斛,见图 5。



M-Marker 1~3-0.69 ng·μL<sup>-1</sup> DNA  
4~6-1.38 ng·μL<sup>-1</sup> DNA 7~9-2.07 ng·μL<sup>-1</sup> DNA

图 4 特异性引物灵敏度检测

Fig. 4 Sensitivity investigation of specific primer

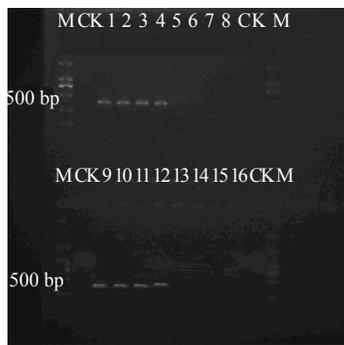


图 5 特异性引物扩增市售鼓槌石斛样品的电泳检测图

Fig. 5 Electrophoresis of PCR amplification products by specific primer for sold samples of *D. chrysotoxum*

### 3 讨论

随着分子生物学的迅猛发展,一些先进的分子鉴定技术逐渐应用到中药材的基原鉴定中,如限制性片段长度多态性(restriction fragment length polymorphism, RFLP)技术、随机扩增多态 DNA

(random amplified polymorphism DNA, RAPD) 技术、简单重复序列区间(inter-simple sequence repeat, ISSR)、扩增片段长度多态性(amplified restriction fragment polymorphism, AFLP)技术等分子标记技术<sup>[5]</sup>。它们各有优势,但缺点也非常明显,RFLP 技术稳定、重复性强,但探针的制备繁琐,且探针具有专一性;RAPD 技术对物种间的亲缘关系鉴别具有重要意义,但重复性差,反应条件多变;ISSR 技术快速、简便,但扩增条件对结果影响较大,且反应体系和条件不同;AFLP 技术则需要有较高的理论知识和试验技能,可推广性不强。Hebert 等<sup>[6-7]</sup>在 2003 年提出 DNA barcodes 技术,对于植物的分子鉴定研究是一个重大的进步。随后研究的热点围绕不同条形码序列对于不同植物的鉴定展开,虽然至今没有一个通用的序列可对所有的植物进行分子鉴定,条形码技术仍然对植物的分类和鉴定提出了新的方向和挑战。陈士林等<sup>[8-9]</sup>首次将 DNA 条形码技术引入中药鉴定体系,包括中药 DNA 条形码序列的筛选确定、中药 DNA 条形码鉴定流程和中药 DNA 条形码鉴定数据库系统构建;基于 753 个不同属 4 800 种 6 600 份药用植物测定 ITS2 序列的鉴定成功率达 92.7%,建议将 ITS2 序列作为植物鉴定的通用序列;并成功对蓼科、芸香科、锦葵科、黄芪属、金银花、麦冬、大青叶、威灵仙、砂仁、鳖甲、川木通、党参、赤芍、蒿本、金钱草、有毒中药洋金花等多种药用植物进行 DNA 条形码鉴定<sup>[10-13]</sup>;Kress 等<sup>[14]</sup>通过分析 DNA 条形码在开花植物鉴定中的应用,指出 ITS 和 trnH-psbA 联合使用,可以鉴别出大部分的植物,并在烟草和茄属植物样品中得到验证。

石斛是一种传统的名贵中药材,价格昂贵,且需求量大。鼓槌石斛是一种民族傣药,目前民族药材品种已达 8 000 多种,2007 年国家相关部门发布“关于切实加强民族医药事业发展的指导意见”<sup>[15]</sup>,鼓励发展民族药,同时,民族药同样面临质量标准控制的难题。随着野生资源的匮乏以及栽培种植中出现的越来越多的技术问题,导致市场上关于鼓槌石斛的混淆品越来越多,而传统的鉴别方法不能准确而有效的进行鉴别。分子生物学的发展让研究者把焦点聚集在对中药材的分子鉴定方面。刘石泉等<sup>[16]</sup>通过对霍山石斛及其相似种的位点特异性 PCR 研究,设计出霍山石斛的位点特异性鉴别引物,可高效、准确地鉴别霍山石斛。本研究通过运

用生物学软件对比 170 余条石斛属 ITS 序列, 在鼓槌石斛的非保守区设计出一对特异性 PCR 引物, 并优化了 PCR 反应的条件, 可以特异性地、快速准确地鉴别鼓槌石斛。本研究提供了一种操作简便、省时、准确、经济的鉴别鼓槌石斛的方法, 并为石斛属及其他种类药材的鉴定提供了依据。

#### 参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [2] 马国祥, 徐国均, 王峥涛, 等. 鼓槌石斛化学成分的研究 [J]. 药学学报, 1994, 29(10): 763-766.
- [3] 马国祥, 徐国钧, 王岱先, 等. 鼓槌石斛及其化学成分的抗肿瘤活性作用 [J]. 中国药科大学学报, 1994, 25(3): 188-189.
- [4] 张纪立, 何锦丽. 石斛药理研究进展 [J]. 时珍国医国药, 2000, 11(5): 469-470.
- [5] 陈士林. 中药 DNA 条形码分子鉴定. [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2012.
- [6] Hebert P D N, Cywinska A, Ball S L, *et al.* Biological identifications through DNA barcodes [J]. *Proc Biol Sci*, 2003, 270: 313-321.
- [7] Hebert P D N, Ratnasingham S, de Waard J R. Barcoding animal life: Cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species [J]. *Proc Biol Sci*, 2003, 270: S96-S99.
- [8] 陈士林, 庞晓慧, 姚 辉, 等. 中药 DNA 条形码鉴定体系及研究方向 [J]. 世界科学技术—中药现代化, 2011, 13(5): 747-754.
- [9] Chen S L, Yao H, Han J P, *et al.* Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species [J]. *PLoS One*, 2010, 5, e8613.
- [10] Han J P, Liu C, Shi L C, *et al.* Relationship between DNA barcoding and chemical classification of salvia medicinal herbs [J]. *Chin Herb Med*, 2010, 2(1): 16-29.
- [11] Song J Y, Yao H, Li Y, *et al.* Authentication of the family polygonaceae in *Chinese Pharmacopoeia* by DNA barcoding technique [J]. *J Ethnopharmacol*, 2009, 124: 434-439.
- [12] Sun Z Y, Gao T, Yao H, *et al.* Identification of *Lonicera japonica* and its related species using the DNA barcoding method [J]. *Planta Med*, 2011, 77: 301-306.
- [13] 韩建萍, 李美妮, 罗 焜, 等. DNA 条形码鉴定洋金花及其伪品 [J]. 药学学报, 2011, 46(11): 1408-1412.
- [14] Kress W J, Wurdack K J, Zimmer E A, *et al.* Use of DNA barcodes to identify flowering plants [J]. *PNAS*, 2005, 102(23): 8369-8374.
- [15] 陈 佳, 金红宇, 田金改, 等. 民族药质量标准现状概述 [J]. 中国药事, 2012, 26(2): 191-193.
- [16] 刘石泉, 李小军, 余庆波, 等. 霍山石斛及其相似种的位点特异性 PCR 鉴别 [J]. 中草药, 2006, 37(1): 111-115.