

不同产地连翘的 DNA 指纹图谱构建与聚类分析

吴婷, 魏珊, 米丽华, 李敏, 张淑蓉*

山西中医学院, 山西 晋中 030619

摘要: 目的 以不同产地的 14 批连翘 *Forsythia suspensa* 为材料, 运用 RAPD 技术对其进行遗传多样性研究并构建 DNA 指纹图谱。方法 采用 RAPD 技术, 从 45 条 RAPD 随机引物中进行筛选, 以 14 批连翘进行 DNA 指纹图谱的分析研究。结果 从 45 条 RAPD 随机引物中筛选出 11 条多态性好的引物, 利用这 11 条 RAPD 引物进行 PCR 扩增, 共获得 80 条谱带, 平均每个引物扩增出 7.27 条谱带, 其中多态性谱带 67 条, 多态性条带比率为 83.8%, 是连翘药材资源研究的一种有效分子标记。14 批连翘药材间的遗传相似系数 (genetic similarity, GS) 在 0.487 5~0.962 5, 表明遗传多样性比较丰富。聚类结果显示遗传多样性与连翘药材来源地有明显的相关性, 而且与其亲缘关系较近有关, 符合植物种群分布的一般规律。结论 以 14 批不同产地连翘药材资源的 RAPD 扩增谱带为基础, 构建连翘药材资源的 DNA 指纹图谱并进行聚类分析。

关键词: 连翘; DNA 指纹图谱; 遗传多样性; 聚类分析; RAPD

中图分类号: R282.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2016)05-0816-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.05.022

DNA fingerprint library construction and cluster analysis of *Forsythia suspensa* from different origins

WU Ting, WEI Shan, MI Li-hua, LI Min, ZHANG Shu-rong

Shanxi College of Traditional Chinese Medicine, Jinzhong 030619, China

Abstract: Objective RAPD technique has been used to construct DNA fingerprints and analyze the genetic diversity in 14 batches of *Forsythia suspensa* from different origins. **Methods** Primers with good polymorphism were screened from 45 RAPD primers combinations by PCR, and the DNA fingerprints for 14 batches of *F. suspensa* were constructed by RAPD technique. **Results** Eleven RAPD primers with good polymorphism were screened from 45 RAPD primers by PCR amplification, and 80 bands were amplified by the 11 RAPD primers with average 7.27 bands for each primer, of which 67 were polymorphic and PPB was 83.8%. The genetic similarity (GS) ranged from 0.487 5 to 0.962 5 in 14 batches of *F. suspensa* from different origins, which showed they had rich genetic diversity. The result of cluster analysis showed that *F. suspensa* was correlated with sample origin and was consistent with species distribution. **Conclusion** The DNA fingerprints for 14 batches of *F. suspensa* are established based on the RAPD amplified bands.

Key words: *Forsythia suspensa* (Thunb.) Vahl; DNA fingerprint; genetic diversity; cluster analysis; RAPD

连翘 *Forsythiae Fructus* 是木犀科 (Oleaceae) 植物连翘 *Forsythia suspensa* (Thunb.) Vahl 的干燥果实, 味苦, 性微寒, 具有清热解毒、散结消肿之功效^[1]。连翘主产于山西、河南、陕西等地, 山西是连翘的道地产区, 资源丰富, 而且不同产地连翘药材在产量、质量、有效成分种类和量等有一定差异^[2]。近年来, RAPD 技术广泛应用于中药材的鉴定分析等研究中^[3-9], 但应用 RAPD 技术研究连翘药用植物遗传多样性的工作很少

见文献报道。本研究以 14 批不同产地连翘药材, 以山西道地产区为主要研究对象, 运用 RAPD 技术分析不同产地连翘的遗传多样性, 并进行聚类分析, 建立其特征性的 DNA 指纹图谱, 为连翘的道地性、繁育栽培、遗传育种和 GAP 种植等提供理论依据和方法措施。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 药材样品 连翘新鲜果实在 2012 年 7~8 月

收稿日期: 2015-06-09

基金项目: 山西省科技攻关项目 (20120313015-4)

作者简介: 吴婷 (1986—), 女, 硕士在读, 研究方向为中药质量控制及活性成分分析。Tel: 18205166367 E-mail: wutingyaya@163.com

*通信作者 张淑蓉 (1962—), 女, 教授, 硕士生导师, 从事中药质量控制及活性成分分析研究。Tel: 13935110348 E-mail: zhangsr62@163.com

采集于山西、陕西、河北及河南产地，经山西医学院中药鉴定教研室裴香萍副教授鉴定均为连翘 *Forsythia suspensa* (Thunb.) Vahl (-76 °C 冷存)^[10]，见表 1。

表 1 14 批连翘药材的来源

Table 1 Sources of 14 batches of *Forsythiae Fructus*

编号	采收地区	采收时间	编号	采收地区	采收时间
1	山西左权	2012-07-27	8	山西临汾	2012-07-25
2	山西太原 1	2012-07-18	9	山西晋城	2012-07-10
3	山西太原 2	2012-07-23	10	河南卢氏	2012-07-23
4	山西安泽	2012-07-25	11	山西绛县	2012-07-23
5	山西长治 1	2012-07-21	12	河北涉县	2012-07-25
6	山西长治 2	2012-08-04	13	陕西商洛	2012-07-18
7	山西平顺	2012-07-26	14	陕西韩城	2012-07-21

1.1.2 试剂 随机引物(Sangon), Taq 酶(TaKaRa), dNTP (TaKaRa), AgaroseVI (BBI), CTAB (Amresco), PVP (Amresco), EDTA-Na₂ (BBI), Tris (BBI), β-巯基乙醇 (BBI), 其余试剂均为分析纯。

1.1.3 仪器设备 TC-XP 型基因扩增仪(杭州博日科技有限公司); BIOSpectrumAC 凝胶成像系统(美国 UVP); EPPENDORF BioPhotometer 核酸蛋白测定仪(德国 Eppendorf); BIO-RAD 电泳仪; Sigma3K-30 型高速冷冻离心机(德国 Sartorius); LMQ.R-3260B 立式灭菌器(山东新华医疗器械股份有限公司); PHS-3C 数显酸度计(上海宇隆仪器有限公司); 数显恒温水浴锅(上海申腾生物技术有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取与检测 采用本实验室建立的 DNA 提取方法^[10]。取冷存的连翘药材，迅速加入液氮研磨成细粉，精取 30 mg 置于 2.0 mL EP 管中，分别加入 1 mL 的 Tris-HCl (1.0 mol/L)、NaCl (5.0 mol/L)、EDTA-Na₂ (0.5 mol/L)、β-巯基乙醇、PVP-40T 与 dH₂O 混合制备的预冷提取液 1，65 °C 水浴 10 min，离心 10 min (10 000 r/min)，去除上清液，直到上清液不黏稠为止；再分别加入 1 mL Tris-HCl (1.0 mol/L)、NaCl (5.0 mol/L)、EDTA-Na₂ (0.5 mol/L)、PVP-40T、CTAB、β-巯基乙醇、抗坏血酸、硫酸氢钠与 dH₂O 制备的提取液 2，65 °C 水浴 1 h，每隔 20 min 轻摇 1 次；取出加入异戊醇-氯仿 (1 : 24) 700 μL，离心 10 min (10 000 r/min)，取上清液于干净的 EP 管中，重复此方法，直到两

液面无沉淀，迅速加入提前预冷的异丙醇 500 μL、95%乙醇 500 μL 与 NaCl 溶液 100 μL，轻摇混匀后放置冰箱中 1 h(-20 °C)，12 000 r/min 离心 20 min，去除上清液，用 75%乙醇反复洗涤 3 次 (12 000 r/min，离心 5 min)，放置于超净台，直到乙醇完全风干，100 μL TE 溶解用于电泳检测及核酸蛋白测定仪检测其浓度，挑选出条带清晰可见的，于冰箱中保存备用 (-76 °C)。

1.2.2 PCR 扩增与引物筛选 1 μL LDNA 原液、0.5 μmol/L Primer、5 U Taq、10×buffer、110 μmol/L dNTP、2.5 mmol/L MgCl₂ 混合而成的 15 μL 反应体系进行扩增。采用本实验室所建立的扩增反应程序^[10]：94 °C 预变性 5 min，94 °C 变性 1 min，36 °C 退火 105 s，72 °C 延伸 90 s，40 个循环，72 °C 延伸 5 min，4 °C 降温 10 min。其产物用 1.0%琼脂糖凝胶电泳进行分离，凝胶成像系统拍照并分析。

RAPD 随机引物选用上海 Sangon 生产的 10 个碱基随机引物 (S81~S125)，共计 45 个引物。每个引物以不同产地连翘 DNA 为模板进行 RAPD 引物筛选，产物以 1.0%琼脂糖凝胶电泳检测，筛选出扩增条带多、稳定、清晰及多态性好的引物共 11 条，见表 2。

1.2.3 数据处理与分析 统计筛选出的 11 条 RAPD 随机引物扩增出的清晰可读条带，将每个条带看做是一个遗传位点，用数字“1”“0”表示扩增片段的有无，所得数据用 NTSYS-pc2.1 软件计算材料间的遗传相似系数，应用 UPGMA 法进行聚类分析。

表 2 RAPD 引物序列和扩增结果

Table 2 Sequences of RAPD primers and amplification results

引物	碱基序列	总扩增带数	多态性条带数	多态性条带率/%
S90	5'-AGGGCCGTCT-3'	11	11	100.0
S94	5'-GGATGAGACC-3'	5	3	60.0
S95	5'-ACTGGGACTC-3'	7	7	100.0
S99	5'-GTCAGGGCAA-3'	6	5	83.3
S103	5'-AGACGTCCAC-3'	7	6	85.7
S105	5'-AGTCGTCCCC-3'	9	7	77.8
S106	5'-ACGCATCGCA-3'	11	11	100.0
S107	5'-CTGCATCGTG-3'	7	6	85.7
S108	5'-GAAACACCCC-3'	5	3	60.0
S112	5'-ACGCGCATGT-3'	4	3	75.0
S113	5'-GACGCCACAC-3'	8	5	62.5
总计		80	67	83.8

2 结果与分析

2.1 不同产地连翘 DNA 指纹图谱构建与多态性分析

从 45 条随机引物中共筛选出 11 条适合于 14 批连翘药材的 RAPD 随机引物, 以筛选出的 11 条引物对 14 批连翘药材进行 RAPD 扩增, 其扩增结果见图 1。用 11 条 RAPD 引物扩增 14 批连翘药材, 共获得 80 条谱带, 平均每个引物扩增出 7.27 条谱

带, 其中多态性谱带 67 条, 多态性条带比率为 83.8%, 表明供试的 14 批连翘药材遗传多样性比较丰富, 是连翘药材遗传多样性与亲缘关系的一种有效分子标记, 见表 2。利用筛选出的 11 条引物扩增的多态性指纹位点数据, 建立起不同产地连翘药材的 DNA 指纹数据库, 进行 14 批不同来源连翘药材的鉴别分析。

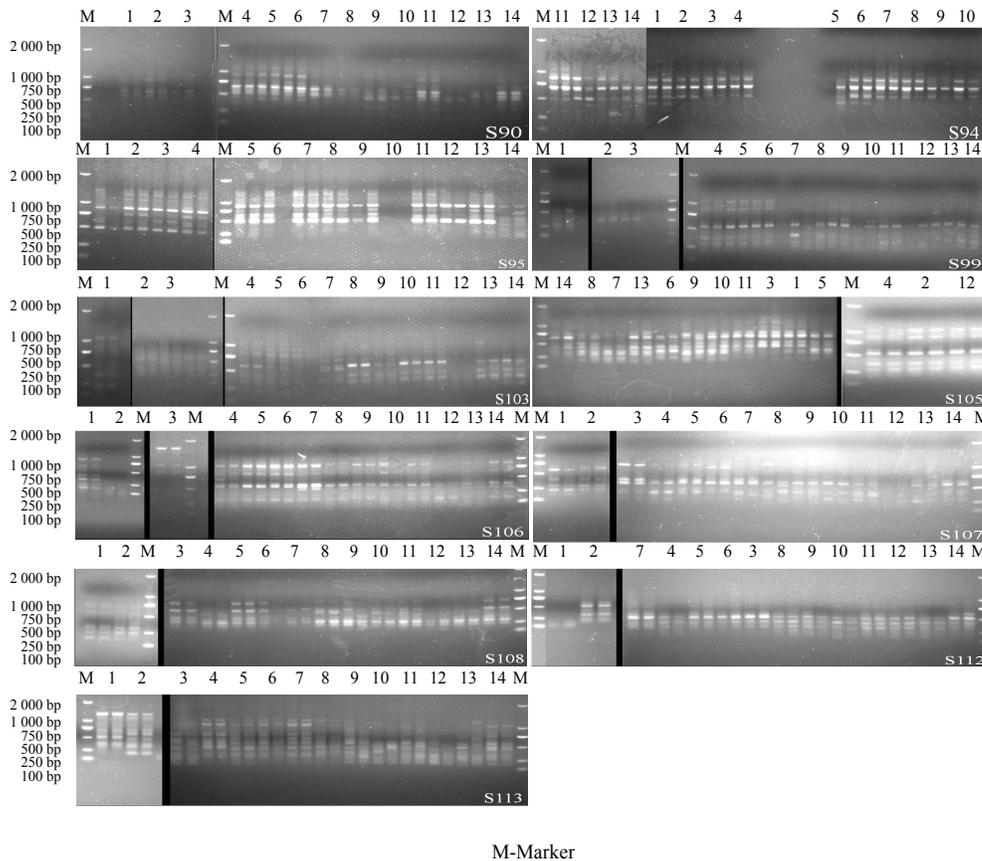


图 1 11 条引物对 14 批连翘药材的扩增图谱

Fig. 1 Fourteen batches of *Forsythiae Fructus* RAPD patterns amplified by 11 primers

2.2 不同产地连翘分子聚类与遗传多样性分析

基于 RAPD 扩增谱带, 用 UPGMA 聚类分析方法对 14 批次连翘药材进行聚类分析。从聚类结果看, 说明 14 批连翘药材间的遗传多样性比较丰富, 结果见表 3 和图 2。

2.2.1 遗传相似统计 药材间的遗传相似系数 (genetic similarity, GS) 越小, 表明亲缘关系越远, 14 批不同产地连翘药材间的 GS 在 0.487 5~0.962 5, 遗传距离 (GD=1-GS) 在 0.037 5~0.512 5, 其中 5 号与 6 号样品 GS 为 0.962 5, 说明这 2 个批次亲缘关系最近; 6 号与 12 号样品 GS 为 0.487 5, 说明两者的亲缘关系最远。

2.2.2 聚类分析 在遗传相似系数 0.672 处划分,

可将 14 批连翘药材分成 2 大类, 其中第 1 类 10 批连翘药材来源于山西, 说明遗传亲缘关系较密切; 第 2 类 4 批连翘药材来源于河北、河南、陕西, 与第 1 类山西连翘药材亲缘关系远、遗传差异性大。在遗传相似系数 0.74 处划分, 可将 14 批连翘药材分成 5 大类, 具有比较明显的来源地分布特征, 河北涉县独聚一类, 可明显区分其他产地, 河南与陕西有 2 个分支也可区分, 说明不同来源地连翘药材遗传分化比较明显; 而全部来源于山西连翘药材又分为 3 大类, 分类为左权、太原及其余 7 批山西连翘药材, 左权与太原连翘药材可明显区别于其他山西产地药材, 而其余 7 批连翘药材又有明显的分支, 可见同产于晋南的连翘药材遗传分化相对也明显。

表 3 14 批连翘药材的遗传相似系数

Table 3 Genetic similarity of 14 batches of *Forsythiae Fructus*

样品	14	13	12	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1
14														
13	0.800 0													
12	0.650 0	0.750 0												
11	0.787 5	0.762 5	0.662 5											
10	0.775 0	0.750 0	0.675 0	0.712 5										
9	0.712 5	0.737 5	0.662 5	0.850 0	0.712 5									
8	0.637 5	0.762 5	0.662 5	0.775 0	0.687 5	0.800 0								
7	0.737 5	0.687 5	0.537 5	0.800 0	0.612 5	0.750 0	0.775 0							
6	0.712 5	0.637 5	0.487 5	0.775 0	0.587 5	0.700 0	0.675 0	0.900 0						
5	0.750 0	0.675 0	0.525 0	0.812 5	0.625 0	0.737 5	0.712 5	0.887 5	0.962 5					
4	0.687 5	0.687 5	0.537 5	0.800 0	0.587 5	0.775 0	0.750 0	0.850 0	0.875 0	0.887 5				
3	0.700 0	0.675 0	0.625 0	0.712 5	0.675 0	0.662 5	0.687 5	0.712 5	0.662 5	0.700 0	0.687 5			
2	0.687 5	0.637 5	0.662 5	0.700 0	0.612 5	0.675 0	0.700 0	0.725 0	0.675 0	0.712 5	0.725 0	0.812 5		
1	0.700 0	0.700 0	0.625 0	0.662 5	0.650 0	0.662 5	0.737 5	0.737 5	0.687 5	0.700 0	0.712 5	0.600 0	0.712 5	

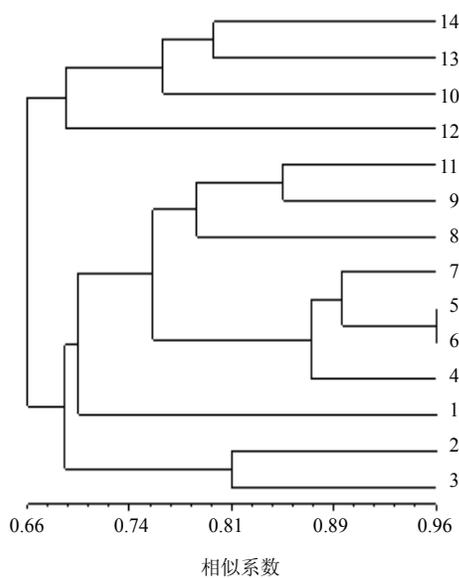


图 2 14 批连翘药材的 UPGMA 聚类图

Fig. 2 Dendrogram of cluster of 14 batches of *Forsythiae Fructus* analyzed by UPGMA

3 讨论

RAPD 分子标记技术广泛应用于中药来源及品质的鉴定,具有方便快捷、DNA 需要量少、显性遗传等优点,但也存在扩增条带稳定性差、重复性低等问题^[11]。为了保证实验的精确性,本实验严格控制反应条件的标准性,每个引物多次重复,统计稳定出现、重复性高的条带并进行遗传分析,获得可靠的实验数据,最终得出能真实反映各来源连翘药

材的遗传特征。

顾华等^[12]研究发现山西连翘栽培的品系间在 DNA 水平上存在明显的多样性变异,而且 DNA 分子多样性差异与化学指标成分量差异有关,表明连翘的遗传基础可能对化学指标成分的形成和积累有显著的影响,运用 RAPD 技术进行连翘药材道地性研究具有可行性。本研究运用 RAPD 标记技术对 14 批不同产地连翘药材进行遗传多样性分析并构建指纹图谱,GS 在 0.487 5~0.962 5,结果显示不同产地药材间的遗传多样性比较丰富。实验结果表明山西产地连翘亲缘关系相对较近,且能与河南、河北、陕西产地连翘药材进行区分,但其遗传特征又有分支并出现遗传关系的相对分化。筛选出的 11 条 RAPD 随机引物基本可以区分不同省份或不同市区产地的连翘药材,其构建的指纹图谱可用于不同产地连翘药材的分类和鉴定。若要鉴定大范围来源的连翘药材时,可能会出现同一引物在不同来源中扩增出相同谱带的现象,对此要结合不同分子标记和增加引物数等方法来区分不同来源连翘药材。这些结果为进一步研究山西连翘药材遗传信息与活性成分、生物效应之间的相关性奠定基础,进而建立体现山西连翘“道地性”特色的品质评价新方法。

参考文献

[1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.

- [2] 支旭然, 苑霖, 生宁, 等. HPLC-MS/MS 法测定不同采收期连翘叶中 9 种成分 [J]. 中草药, 2013, 44(22): 3231-3235.
- [3] 周佐斌, 葛刚. 中药材道地性的 DNA 分子鉴别 [J]. 江西科学, 2008, 26(3): 507-510.
- [4] 杨飞, 张敏彭, 兴扬. 金银花五个品系的 RAPD 分析及 DNA 指纹图谱的建立 [J]. 武汉植物学研究, 2007, 25(3): 235-238.
- [5] 严奉坤, 许兴, 杨亚亚, 等. 同一品种不同产地宁夏枸杞 DNA 指纹图谱特征研究 [J]. 海峡药学, 2007, 18(10): 2385-2386.
- [6] 陈刚, 刘津, 马志刚, 等. 甘肃枸杞属植物的 RAPD 分析 [J]. 安徽农业科学, 2013, 41(4): 1459-1461.
- [7] 刘文生, 朱建明, 何斌, 等. 中药材厚朴的随机扩增多态性 DNA 指纹图谱研究 [J]. 中药材, 2004, 27(3): 164-168.
- [8] 卢家仕, 卜朝阳, 吕维莉, 等. 不同产地石斛属种质资源的 ISSR 遗传多样性分析 [J]. 中草药, 2013, 44(1): 96-100.
- [9] 徐朝晖, 杨松松, 康廷国. 同种不同产地牛蒡子 DNA 指纹图谱特征研究 [J]. 中药材, 2001, 32(6): 541-542.
- [10] 吴婷, 米丽华, 张淑蓉. 不同产地连翘新鲜果实 DNA 提取方法和质量评价研究 [J]. 世界中西医结合杂志, 2014, 9(7): 720-722.
- [11] 魏瑜. RAPD 技术在中药材道地性鉴定中的应用 [J]. 海峡药学, 2008, 20(10): 148-150.
- [12] 顾华, 盖玲, 周铜水, 等. 中药材连翘道地性的分子生物学探讨 [J]. 复旦学报, 2002, 41(6): 664-668.