

中药材黄芪的 DNA 指纹图谱鉴别

□张曦 徐青 (中国科学院大连化学物理研究所 大连 116023)
 黄璐琦 (中国中医科学院中药研究所 北京 100700)
 刘娟 (佳木斯大学化学与药学院生药教研室 佳木斯 154002)
 肖红斌* 梁鑫森 (中国科学院大连化学物理研究所 大连 116023)

摘要:为鉴别中药材黄芪的品种及其代用品,采用高盐低 pH 值法提取药材的基因组 DNA,利用随机扩增多态 DNA(RAPD)技术扩增药材基因组 DNA 样品。结果表明,高盐低 pH 值法较适用于黄芪类药材基因组 DNA 的提取,其中 2 个引物可作为高特异性引物,根据琼脂糖凝胶上显示的 DNA 带型差异准确鉴别黄芪和红芪。RAPD 方法可以准确、快速地鉴定黄芪及其代用品。

关键词:黄芪 红芪 RAPD 技术 DNA 指纹图谱

黄芪药材的植物来源较为复杂,《中华人民共和国药典》收录了 2 种原植物—膜荚黄芪 [*A. membranaceus* (Fisch.) Bge.] 和蒙古黄芪 [*A. membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao] 作为正品。中药黄芪是指这两种黄芪的干燥根部。同时药典中还收录了为地方习用作黄芪的同科不同属植物红芪。由于黄芪是极其常用的中医临床要药,商品需求量大,导致药材被无控制采挖,野生资源已近枯竭,目前药材黄芪几乎全部来源于栽培。受多种因素影响,药材的质量参差不齐,为此一些学者在黄芪的品质评价中做了一定量的工作^[1-2],鉴定手段也从原植物鉴别、性状鉴别、显微鉴定发展到应用色谱、光谱技术。传统的鉴定技术多需要新鲜植株材料,需有一定的植物分类学专业知识和经验,而市面上销售的黄芪多为加工过的药材,其表面性状及显微特征均

会发生变化,且近缘种的形态、性状特征乃至化学成分的种类都极为相似,这些均给鉴定工作带来很大的困难。本文采用随机扩增多态 DNA(RAPD)技术从基因水平探讨黄芪药材的遗传本质,以期为黄芪的鉴别提供参考。

一、材料

1. 样品

本实验采用山西、内蒙古和黑龙江三个产区的黄芪药材以及甘肃的红芪药材(药材来源见表 1,由中国中医研究院中药研究所何希荣教授鉴定),旨在探讨同科不同属、同属不同种以及同种不同产地药材的 DNA 指纹图谱特征。

2. 主要仪器

Micro-MB centrifuge(IM-3411, IEC 公司,美国); Eppendorf 低温冷冻离心机(5810R 型,基因有限公司); HZQ-XL 振荡培养箱(中国哈尔滨东联电子技术

收稿日期:2005-10-20

修回日期:2006-04-03

* 联系人:肖红斌,研究员,主要研究方向:药物化学、分析化学, Tel: 0411-84379756, E-mail: hbxiao@dicp.ac.cn.

[World Science and Technology/Modernization of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica] 33

开发有限公司);GeneQuant II RNA/DNA Caculator (Pharmacia Biotech,英国);DYY-III 5 型电泳仪(北京市六一仪器厂);PROGENPCR 基因扩增仪(FPROG050 型,基因有限公司);GeneGenius 凝胶紫外成像系统(SYNGENE 公司)。

3. 试剂

三羟甲基氨基甲烷 (Tris)、十二烷基硫酸钠 (SDS)、乙二胺四乙酸 (EDTA)、聚乙烯吡咯烷酮 (PVP) 为北京鼎国生物技术发展中心生产;琼脂糖 (Promega 公司);十六烷基三甲基溴化铵 (CTAB; Sigma 公司);溴化乙锭 (EB, Fluka 公司);寡核苷酸引物 (上海生工生物工程技术有限公司);4×dNTP 混合物 (Promega 公司);TaqDNA 聚合酶,10×PCR 缓冲液 (MgCl₂-Free),MgCl₂ (25mM),均产自华美生物工程公司;其余均为北京化工厂生产的分析纯试剂。

二、方法

1. 药材基因组 DNA 的提取

(1) 样品处理。

每个样品取样 3~5 株,混合提取总 DNA。将药材

表 1 药材来源

样品编号	样品名称	来源
1	膜荚黄芪	黑龙江佳木斯四丰山(半野生)
2	蒙古黄芪	黑龙江佳木斯大学药园(栽培)
3	蒙古黄芪	山西浑源大川岭村(半野生)
4	蒙古黄芪	内蒙古固阳县银号乡田义公村
5	蒙古黄芪	内蒙古固阳县忽鸡兔村
6	蒙古黄芪	内蒙古固阳县银号乡碾房村
7	蒙古黄芪	内蒙古固阳县新建乡白洞渠村(栽培)
8	膜荚黄芪	黑龙江汤原(野生)
9	膜荚黄芪	黑龙江汤原(栽培)
10	蒙古黄芪	山西浑源(半野生)
11	膜荚黄芪	内蒙古赤峰巴林右旗(野生)
12	蒙古黄芪	内蒙古赤峰巴林右旗(饮片)
13	蒙古黄芪	山东东营(饮片)
14	红芪	甘肃兰州

注:其中 1-7 号样品为新鲜药材,8-14 为干燥药材

根部依次用 70%乙醇 (5 min/次,2 次)、无菌水 (1 min)、无水乙醇 (5 min) 清洗,置于洁净工作台中干燥。采用高盐低 pH 值法^[3]提取药材总 DNA。

(2) 高盐低 pH 值法。

①称取 0.05 g 各中药材样品分别用液氮研成粉末,转移至 EP 管 (1.5 mL) 中;

②加入 500 μL、56℃预热的缓冲液 [100 mmol/L NaAc (pH 5.2), 50 mmol/L EDTA (pH 8.0), 500 mmol/L NaCl, 2.5% PVP, 3% SDS, 1% β-巯基乙醇], pH 5.6, 于 56℃摇床温育 30min;

③取出 EP 管,10 000 r 离心 10 min, 吸取上清液至另一新 EP 管中, 加入 2/3 倍体积的醋酸钾缓冲液 (2.5 mmol/L, pH 4.8), 4℃放置 15 min, 再 10 000 r 离心 10 min;

④吸取上清液,移入另一新离心管中,加入等体积氯仿-异戊醇 (24:1) 抽提,反复颠倒混匀,放入低温冷冻离心机中 4℃、10 000 r 离心 15 min;

⑤吸取上清液,移入另一新离心管中,加入 2 倍体积的 95%乙醇,混匀后放入 -20℃冰箱 60 min;

⑥0℃,12 000 r 离心 20 min,弃上清液。沉淀物分别用 70%乙醇和无水乙醇各洗一次。室温放置挥发乙醇,加入 30 μL TE 溶解,保存于 -20℃冰箱中。

2. DNA 定性定量检测

(1) DNA 分子长度。

分别取总 DNA 溶液 4.0 μL 与 1.0 μL 溴酚蓝 (0.25%溴酚蓝,40%蔗糖水溶液)混匀点入 2.0%琼脂糖凝胶上,紫外透射仪下观察并在凝胶成像系统中照相保存。DNA 分子长度与 λHind III 标记物比较。

(2) DNA 溶液纯度及浓度。

取一定量 DNA 溶液用 GeneQuant II RNA/DNA Caculator 测定 A260 值、A260/A280 之比值及浓度。DNA 纯度按 A260/A280 之比值判断。

(3) 随机引物 PCR 扩增。

PCR 扩增条件:预变性 96℃、5 min,1 循环;94℃、45 s,37℃、1 min,72℃、90 s,40 循环;72℃、5 min,4.0℃、5 min,1 循环。部分引物序列见表 2。反应产物经琼脂糖凝胶电泳,结果在紫外透射仪上观察并照相保存。

三、结果与讨论

1. 黄芪药材总基因组 DNA 提取方法探讨

在本研究中,提取到高质量的 DNA,是成功构建 RAPD 指纹图谱的先决条件。据文献报道,CTAB 法^[4-5]已较成熟地应用于植物新鲜幼叶 DNA 提取,高盐低 pH 值法可用于干燥药材的 DNA 提取。本文研究结果显示(见表 3),高盐低 pH 值提取方法可以从黄芪药材中提出一定纯度的 DNA,且纯度均大多在 1.70~1.90 之间,说明无 RNA 与蛋白质的干扰。经浓度检测,本法可以得到较高的 DNA 浓度,且 DNA 降解程度较低。由表 3 可见,所提新鲜材料 DNA 的浓度多为 1650.0~2544.9 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,而干材料的 DNA 浓度较低为 546.6~1931.1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,出现这种情况的原因可能与中药材中的 DNA 部分降解有关。综上所述,高盐低 pH 值法可以用于提取黄芪总基因组

表 2 RAPD 分析所用的部分引物序列及扩增谱带

引物号	序列 5'→3'	扩增条带数	多态性条带数
S21	CAGGCCCTTC	10	10
S24	AATCGGGCTG	7	5
S34	TCTGTGCTGG	10	10
S464	GTGTCTCAGG	9	8

表 3 14 个样品总 DNA 纯度(A260/A280)和浓度(A260,OD 值)

样品编号	A260 值	A260/A280 的比值	DNA 浓度 ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
1	2.580	1.797	2544.9
2	2.168	1.801	2146.0
3	1.693	1.805	1652.9
4	2.595	1.773	2574.6
5	0.506	1.805	507.5
6	2.281	1.821	2210.5
7	2.391	1.814	2333.4
8	0.580	1.857	546.6
9	1.274	1.893	1216.5
10	1.493	1.909	1461.1
11	0.694	1.798	645.5
12	0.877	1.904	853.8
13	1.808	1.902	1817.7
14	1.965	1.888	1931.1

DNA。

2. 黄芪的种属鉴别

(1) 黄芪及其近缘属植物红芪的指纹差异。

经琼脂糖凝胶电泳检测,成功构建出多态性丰富、重现性好的黄芪和红芪的 DNA 指纹图谱。采用 31 个 10 碱基随机引物对供试材料进行扩增筛选,选出 15 个稳定性好、条带清晰、具有多态性的引物的反应结果做实验分析。从随机引物扩增的结果可见,可鉴别红芪与黄芪的引物仅有 4 条,分别是 S21, S24, S34, S464。图 1 是引物 S34 和 S464 扩增出的结果。从 S34 扩增的图谱看,所有黄芪样品均有 587.97bp 条带,红芪在此处没有扩增条带;采用引物 S464 重复实验,在黄芪样品中均扩增出 585.00bp 条带,而在红芪样品中扩增出 610.00bp、500.00bp、380.00bp、200.00bp 条带,说明实验条件具有可重复性,且由扩增出的条带可见,黄芪与红芪之间存在着

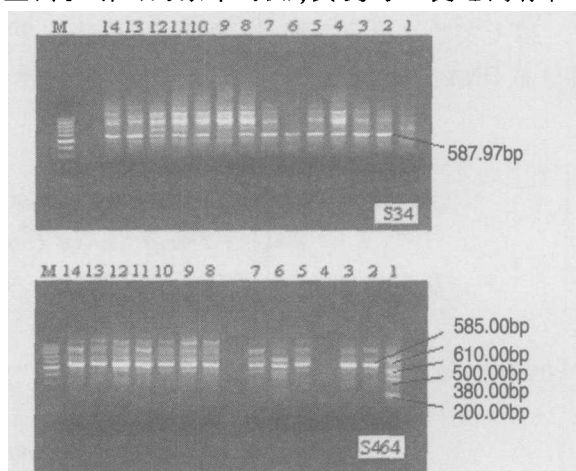


图 1 引物 S34 和 S464 扩增出的结果

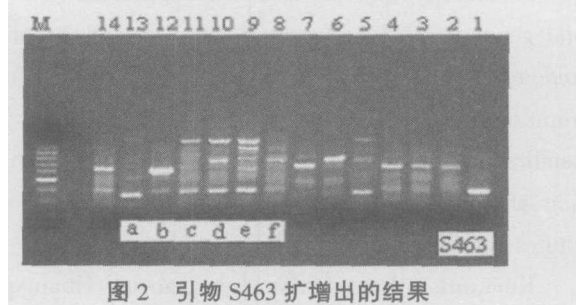


图 2 引物 S463 扩增出的结果

注:a、b、c、d、e 和 f 为同种不同产地蒙古黄芪;图中从左至右为 Marker、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2 和 1 号样品

明显的 DNA 谱带差异,根据这些差异可以鉴别岩黄芪属植物红芪和黄芪属植物膜荚黄芪与蒙古黄芪。

(2)同属不同种以及同种不同产地黄芪的 DNA 指纹差异。

由于实验所采用的样本和引物有限,在筛选引物时发现,蒙古黄芪和膜荚黄芪的 DNA 指纹基本一致(图 1)。在本实验所用的引物产生的 RAPD 指纹谱中,仅从琼脂糖凝胶的扩增谱带上难以明确地区别二者的差异,但将 RAPD 结果进行聚类分析,可以区别蒙古黄芪和膜荚黄芪(将于另文报道)。由图 2 引物 S463 扩增的图谱可以看出,同种不同产地的黄芪(样品编号 a-f)DNA 指纹虽然基本一致但也存在着差别,这可能是受环境等因素的影响而导致基因发生了变化。

四、结 论

以上实验结果可表明,高盐低 pH 值法作为黄芪药材总 DNA 的提取方法,可以得到高质量的基因组

DNA。采用 RAPD 标记这一技术评价黄芪及其近缘属植物之间的遗传关系,程序简单、快捷,只需很少量的样品就可完成。此外,研究结果显示,引物 S34 和 S464 可作为中药材黄芪与红芪的高特异性引物,用这两种鉴别引物对样品的 DNA 进行 PCR 反应,经琼脂糖凝胶电泳,与标准指纹谱对照,就可以准确鉴别样品的品种及真伪。

参考文献

- 1 Q.Ma, J.A.Duan, D.Y.Zhu, et al. Chemical Comparison of Astragali Radix (Huangqi) From Different Regions of China. *Natral Medicines*, 2000, 54(5):213~218.
- 2 姚美村, 毕开顺. 柱前衍生化 HPLC 法测定黄芪中黄芪甲苷的含量. *天然产物研究与开发*. 2000, 4(12):17~23.
- 3 王培训, 黄丰, 周联, 等. 植物中药材总 DNA 提取方法的研究. *中药新药与临床药理*, 1999, 10(1):8~20.
- 4 黄璐琦主编. *分子药理学*. 北京:北京医科大学出版社, 2000, 5, 23~24.
- 5 黄璐琦, 王敏, 付桂芳, 等. 中药白芷种质资源的 RAPD 分析. *中国中药杂志*, 1999, 24(8):457~510.

Study on Authentication of Astragalus membranaceus by DNA Fingerprints

Zhang Xi, Xu Qing, Xiao Hongbin, Liang Xinmiao

(Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, China)

Huang Luqi

(Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100700, China)

Liu Juan

(College of Chemistry and Pharmacy, Jiamusi University, Jiamusi 154002, China)

To identify Chinese traditional medicine (TCM) "Huangqi" (*Astragalus membranaceus*) and its substituents, the total genomic DNA of fourteen samples was obtained using high saline-low pH value method, and was amplified by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD). The result indicated that the method of high saline-low pH value is propitious to extract high-quality total genomic DNA from *Astragalus membranaceus*. The samples of *Astragalus membranaceus* and *Hedysarum polybotrys* could be distinguished by two primers according to the banding patterns of their amplified DNA on agarose gel after electrophoresis. Therefore, RAPD is able to identify Huangqi and its substitutes quickly and correctly.

Keywords: *Astragalus membranaceus* (Huangqi), *Hedysarum polybotrys* (Hongqi), RAPD DNA Fingerprints

(责任编辑:左 向, 责任编辑:张志华, 英文译审:秦光道)