

DNA 分子标记技术在 中药石斛类药材鉴定中的应用*

□应 依 徐 红** 王峰涛**

(上海中医药大学中药研究所/教育部中药标准化重点实验室 上海 201203)

摘要:本文总结了 AP-PCR 与 RAPD 技术、AFLP 技术、基于 DNA 序列分析的分子标记技术、基因芯片等 DNA 分子鉴定技术,并介绍了近年来这些技术在中药石斛类药材鉴定中的应用。

关键词:分子生物学 中药鉴定 石斛

我国中药材种类繁多,资源丰富且来源复杂,目前一直用经典的性状鉴定、显微鉴定及理化鉴定等方法研究中药材。这些方法的鉴定标识建立在个体形态和客观观测水平上,在生物学上为物种的遗传表现型,受到遗传因素、生物体的生长发育阶段、环境条件、人类活动如引种驯化、加工炮制等影响,具有很大的变异性,存在主观性强、重复性和稳定性差等缺点。随着生命科学的不断发展,分子生物学技术在中药学领域的日益渗透,在分子水平上检测基因多态性分子标记的中药鉴定方法得到不断的发展与应用。DNA 分子作为遗传信息的直接载体,信息含量大,具有相对高的遗传稳定性、不受外界环境因素制约等优点,因此从分子水平提高鉴定技术,对于保证中药质量,促进中药材标准化、国际化具有重要的科

学意义和应用价值^[1-2]。

石斛属(*Dendrobium* Sw.)是兰科第二大属,作为名贵中药被收录于《本草纲目》,在《神农本草经》中列为上品,具有益胃生津、滋阴清热、明目利嗓等作用^[3]。石斛类药材按中医不同的习惯用法可分为金钗石斛、黄草石斛、鲜石斛、枫斗等四类。不同种类石斛药用成分及含量差异较大,药理活性也不尽相同。由于石斛属植物经长期的异花授粉和自然选择,植物类群高度进化,在遗传背景方面表现出丰富的遗传多样性,某些种形态非常相似,而在基因型上表现出多态性。因此,在石斛属植物的系统学研究方面,从形态特征等表征分析,较难判断其种系关系。另外,由于野生资源紧缺,野外能采集到的石斛均作药用,不但使野生资源遭到毁灭性的破坏,而且造成商品石斛的基源十分复杂,混乱现象严重,植物形态差异小,目前市场上流通的商品石斛^[4]中,药典收载种类

收稿日期:2005-10-20

修回日期:2005-03-25

* 国家自然科学基金资助项目(30472150);中国 APEC 科技产业合作基金—珍稀濒危药用植物石斛类、野山参的 DNA 分子标记鉴定研究;上海市科委中药现代化科技专项项目(04DZ19835),负责人:王峰涛。

** 联系人:王峰涛,本刊编委,教授,博士生导师,上海中医药大学中药研究所所长,主要从事中药质量标准研究;徐红,博士,上海中医药大学中药研究所副研究员,主要从事中药质量标准研究,Tel:021-51322507, Fax:021-51322519, E-mail: wangzht@shutom.com。

〔World Science and Technology/Modernization of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica〕 65

较少,主流品种大多为非药典收载种,有 30 余种石斛属及部分石仙桃属(*Pholidota* Lindl.ex Hook)、金石斛属(*Flickingeria* Hawkes)和石豆兰属(*Bulbophyllum* Thou)植物在市场上流通做石斛用,这些植物的茎加工成药材后,外形相似,对其进行性状及显微鉴定、形态鉴别不能很好的解决鉴定问题。不仅如此,石斛属植物种间化学成分差异较大,且化学成分研究也不够深入,用理化方法鉴定石斛药材种类十分困难。因此建立有效的中药石斛鉴定方法,研究我国石斛植物的种系关系十分必要。

一、基于 PCR 方法的 DNA 分子标记技术

20 世纪 80 年代中期建立的聚合酶链式反应(Polymerase Chain Reaction, PCR)技术引入中药研究领域后,以其简便、快速、特异灵敏的特点为中药质量的研究提供了更加准确可靠的手段。

目前应用于石斛药材鉴定的主要有 70 年代发展起来的 DNA 片段分析技术—限制性内切酶切片长度多态性(Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP)、随机扩增多态 DNA(Random Amplified Polymorphic DNA, RAPD, 或 Arbitrary Primer-PCR, AP-PCR)、扩增酶切片长度多态性(Amplified Restriction Fragment Length Polymorphism, AFLP)、PCR-RFLP 等几项典型技术。

1. AP-PCR 与 RAPD 技术

AP-PCR 与 RAPD 方法是于 1990 年由美国杜邦公司的科学家 Williams JGK^[5]和加利福尼亚生物研究所 Welsh J^[6]领导的两个研究小组同时发展起来的一种 DNA 分子标记技术,分别称为 RAPD 技术和 AP-PCR 技术。利用 PCR 技术从不同生物中人工合成 DNA 片段,而这种 DNA 片段的大小、数目可因不同的生物而异,因而称为“DNA 分子指纹图谱”。

由于预先不需要知道 DNA 序列的情况,对 DNA 模板的需求量少,质量要求低,具有快速、灵敏、通用性好等特点,迅速渗透到生物学的各个领域,成为目前应用最为广泛的 DNA 指纹图谱技术,该方法有许多优点:①无需使用同位素,不受同位素半衰期的限制,并减少实验室污染。②不需提纯 DNA,省去基因

克隆步骤。③不需经过测序却能得到相似的结果^[7]。已被成功的用于遗传指纹作图、基因定位、系统进化以及动植物、微生物物种及中药材鉴别等各个领域。张铭^[8]等用 PCR 技术对石斛属内 26 个种和金石斛属的 1 个种进行了基因组 DNA 多态性分析,特别对铁皮石斛特异性条带进行测序,从而设计出一对长度大于 15 bp 的高度特异性引物。该引物只能与铁皮石斛基因组中的某一区域特异性结合,具有很高的特异性,该设计的特异性引物能方便快捷地鉴别出铁皮石斛。此技术为药材的分子鉴定提供了一个新思路。

彭锐等^[9]研究利用 10 个引物对 15 种石斛属植物进行了鉴定共产生 99 条带,有 15 条扩增带为公共带,表明了石斛属丰富的遗传多样性,这一点与形态分类结果基本一致。在种间亲缘上,本研究分析结果与形态分类存在差异,如在茎节上膨大而呈串珠状的肿节石斛(*D.pendulum*)和串珠石斛(*D.faluneri*)与程串珠状的迭鞘石斛(*D.denneanum*)、马鞭石斛(*D.fimbriatum*)、叉唇石斛(*D.stuposum*)的相似系数为 0.835,比同为不呈串珠状的细茎石斛(*D.moniliforme*)、紫瓣石斛(*D.parishii*)、喇叭唇石斛(*D.lituiiflorum*)与迭鞘石斛、马鞭石斛、叉唇石斛的相似系数 0.701 更近,而和环草石斛(*D.loddigesii*)、铁皮石斛(相似系数 0.642)相差更远。一般来说,RAPD 扩增反应产生 1 条带即可代表基因组中的 1 个位点。这就意味着对参试种的 99 个位点进行了检测。这种效率是利用形态性状、细胞学特征、显微鉴定和生化标记等方法所无法比拟的。但由于 RAPD 检测到的仅是石斛基因组的某些位点,仅根据被检测到的位点研究石斛属植物种间亲缘关系是不全面的,有关其系统分类与亲缘关系的研究尚需积累更多的 RAPD 检测位点并结合其他 DNA 分析手段做出更科学的评价。

尽管 RAPD 技术自问世以来一直就很受欢迎,但在其应用中,人们对共迁移 PCR 扩增产物的序列同源性、实验重复性及系统学研究等可靠性问题也提出了很多质疑^[10-11]。该技术存在一些缺点如该方法稳定性受模板、扩增条件等诸多因素的影响。故每次试

验都必须设立阳性对照,需要筛选许多引物,选择不具种内和产地多态而具种间或属间多态的引物,建立遗传标记,结论需经计算方能得出,而不是直接得出;带型判断具一定的主观性,需有一定的经验;当样品掺伪时,不能得出准确结果。

2. AFLP 技术

1995年,Vos^[12]等在 Zabeau^[13]的基础上发展了 AFLP(Amplified fragment-length polymorphism)技术,是一种 RFLP 与 RAPD 相结合而又不使用分子杂交技术的分子标记手段,被誉为新一代的分子标记技术。它的原理是,用一人工接头(adapter)与限制酶切的基因组 DNA 片段进行连接,制 AFLP 模板 DNA,合成一系列 3'末端随机改变各碱基的 PCR 引物进行 PCR 指纹图谱。

由于 AFLP 预先不需要知道 DNA 序列的情况,但获得的指纹信息位点要比 RAPD 技术更为丰富。相比之下,最后完成 AFLP 实验的成本比用 RAPD 方法的成本低,更省时间、更方便,而且准确性更高,数据更可靠,技术难度也不大。目前已广泛的用于各类生物体的研究中,如植物的遗传图谱的构建、目的基因的定位、作物品种鉴定,植物分类、系统发育及中药材的鉴定等领域。AFLP 技术是在 RAPD 和 RFLP 技术上发展起来的 DNA 多态性检测技术,具有 RFLP 技术高重复性和 RAPD 技术简便快捷的特点,不需像 RFLP 分析一样必须制备探针,且与 RAPD 标记一样对基因组多态性的检测不需要知道其基因组的序列特征,同时弥补了 RAPD 技术重复性差的缺陷。AFLP 方法较之 RAPD 方法在可信度、灵敏度和经济实用等方面具有较大的优势。

虞泓等^[14]用扩增片段长度多态性(AFLP)技术对石斛属内石斛组 4 个种和 1 个外类群种进行基因组 DNA 多态性分析,从 64 对引物组合中选出 5 对引物组合构建了 5 个种的 DNA 指纹图谱。实验采用 AFLP 技术对石斛属 4 个种(共 20 个样品)和 1 个外类群种(共 5 个样品)进行了基因组 DNA 多态性分析,构建了药用石斛的 DNA 分子指纹图谱,该技术对石斛属种的鉴定及彼此亲缘关系的分析具有快速、准确、可信度高的特点。

二、直接测序—基于 DNA 序列分析的分子标记技术

由于中药在加工、储存过程中不利于 DNA 保存,会发生不同程度的降解,影响模板质量,因此采用 DNA 指纹图谱和 AFLP 等技术进行中药分析比较困难。DNA 序列分析(DNA Sequencing)的发明使 DNA 分子鉴定技术取得了突破性进展。首先测定目的基因片段核苷酸序列,然后通过比较序列间的差异来确定各分类群有鉴别意义的特异性位点。它的研究对象主要是短片段的 DNA,因此模板的降解程度对扩增及测序结果的影响不大,具有较好的稳定性和重复性。但是经典的 DNA 分析技术基本上以分子克隆为基础,制备测序 DNA 费时费力,由于克隆的是单个分子,难应用于大量的基因研究,也不适用于杂合等位基因的研究分析。近年来发展起来的基于 PCR 技术的 DNA 直接测序法,克服了传统分子克隆测序烦琐的试验步骤,大大提高了该方法的效率。

目前用于该测序的基因主要有叶绿体基因组的 *rbcL*、*matK*、*rpoC* 与核基因组的 *rRNA*、*ITS* (植物类),线粒体基因组的 *cyt-b* (动物类)。*RbcL* 基因分辨率高,变异较均一分布,进化速率差异大,一般用于科级以上分类群研究。*matK* 基因变异较均一,一般用于种一级分类群亲缘关系研究。*ITS* (内转录间隔区)在核糖体 DNA 中位于 18S 与 26S 基因之间,由 5.8S 基因分两段 *ITS1* 和 *ITS2*,由于在被子植物中 *ITS* 存在于高重复的核糖体 DNA 中,进化速度快且片段长度仅 700 bp (*ITS1* 和 *ITS2* 各为 350 bp),加上协同进化使该片段在基因组不重复单元之间非常一致,等位基因间甚至 *ITS* 的不同拷贝之间都可能存在序列上的差异,所以一般用于种以下一级分类群亲缘关系研究。同时,核基因是双亲遗传,不同于叶绿体基因单亲遗传,能反映真正的进化历程,使得核基因在中药鉴定中具有重要的意义。

丁小余等^[15]运用光镜解剖比较分析了广西、贵州、云南 3 省的铁皮石斛(*D. Candidum*)主要居群形态结构的差异,将采集到的我国铁皮石斛主产区的主要居群分为 H 型和 F 型,后者适宜加工成铁皮枫斗;丁小余^[16-18]等运用 PCR 直接测序法对广西、贵州、云

南铁皮石斛主要居群的 rDNA ITS 区进行碱基序列测定,首次报道了铁皮石斛 ITS 区的碱基序列,该区总长为 634 bp,其中 ITS1 为 231 bp,5.8S 为 163 bp;ITS2 为 240 bp。研究表明,铁皮石斛各居群中 F 型和 H 型的 rDNA ITS 区碱基序列分别在 ITS1 及 5.8S 区有位点差异,居群内部 rDNA ITS 区差异与植物活性的差异有一定相关性,H 型是 F 型的变种,在两居群间其 5.8S rDNA 区存在单核苷酸多态(SNP)现象。

另有报道^[19],对 16 种石斛内转录间隔区 ITS2 进行了 DNA 测序,结果表明,种间差异百分率平均为 12.4%,与外类群(石仙桃属)及杂质(掺杂物)的差异百分率分别为 29.8%和 18.8%,而种内的差异百分率只有 1%,认为 ITS2 区可作为区分石斛种间、石斛与外类群的分子标记。

徐红等^[20]对中药黄草石斛(*D.chrysanthum*)序列进行分析,发现 ITS1、ITS2 两段序列在石斛种内保守种间差异较大,可以作为黄草石斛分子鉴定的标记。丁小余等^[21]对曲茎石斛与同属近似种进行外形和 rDNA ITS 序列比较,并选用了 7 个碱基位点用作鉴别的 DNA 证据,可根据药材形态特征及 rDNA ITS 碱基序列差异准确鉴别曲茎石斛与同属近似种。同时,对束花石斛与同属近似种进行外形和 rDNA ITS 序列比较,并选用了 15 个碱基位点用作鉴别的 DNA 证据,可根据药材形态特征及 rDNA ITS 碱基序列差异准确鉴别束花石斛与同属近似种^[22]。

丁小余等^[23]在铁皮石斛和其他 37 种石斛的 rDNA ITS 序列的基础上,设计了一对位点特异性 PCR 鉴别引物 TP-JB01S 和 TP-JB01X 鉴别铁皮石斛,当退火温度降到 66℃,只有铁皮石斛有阳性反应。另有报道,丁小余等^[24]设计出齿瓣石斛的位点特异性 PCR 鉴别引物 JB-Chiban-01S 和 JB-Chiban-01X 和兜唇石斛^[25]的位点特异性 PCR 鉴别引物 DC-JB01S 和 DC-JB01X。徐红等^[26]设计出金钗石斛的位点特异性 PCR 鉴别引物分别为上游引物 PJ-NF 和下游引物 PJ-NR。与 DNA 测序鉴别方法比,位点特异性 PCR 易于重复,不但简单实用而且具有高效、准确、简便、省时等优点。

滕艳芬等^[27]用 matK 基因序列比较了几种药典收

载石斛与常见市场混淆品种,用 PAUP4.0 软件分析,得到了非石斛属的混淆品与正品间差异大于正品石斛间差异,因而可以将两者区别开来。

张婷等^[28]用 rDNA ITS 作为分子标记对中药石斛的基源植物进行分子标记鉴定的技术。用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)方法获得 ITS 片段的限制性图谱。束花石斛及其形态相似种的 PCR 扩增产物用 Cla I 和 ApoL I 酶切,流苏石斛及其形态相似种的 PCR 扩增产物用 Sph I 酶切。根据预测的 PCR-RFLP 图谱,能够对束花石斛、流苏石斛及其它的形态相似种进行鉴别。同时,用这种方法鉴定了市场上收集的商品束花石斛、流苏石斛新鲜药材的原植物,结果表明,该方法具有简便、费用低的优点。

另外,还有采用 IZF-1 寡核苷酸探针和限制性内切酶 HinfI,检测兰属 23 样株和石斛属 1 样株的 DNA 酶解片段,获得了清晰易读的由 6~15 条带组成有特异性的遗传指纹图谱^[29]。张婷等^[30]扩增并测定 9 种石斛属植物线粒体中 NADH 脱氢酶亚基 1 编码基因(nad1)内含子 2(intron 2)的全长序列。比对后的 nad1 intron 2 序列长 872 bp。其中,有 17 个变异位点,可以鉴别到除粉花石斛以外的 8 种植物。该结果表明,nad1 intron 2 序列可作为一种新的分子标记用于石斛属植物的鉴定。

三、基因芯片(gene chip)技术

近年来,随着基因技术的迅速发展,人类正从结构基因组学(structural genomics)进入功能基因组学(functional genomics)和功能蛋白组学(functional proteomics)时代(即后基因组时代),基因芯片技术是后基因组时代一项重要技术。生物芯片包括基因芯片(gene chip)、蛋白质芯片(protein chip)、组织芯片(tissues chip)3 种,目前最完善的是基因芯片(又称基因微阵列)。

1995 年斯坦福大学的 Schens 等^[31]发表第一篇基因微阵列论文,用于基因表达谱研究。基因芯片^[32]是在一块指甲大小的有多聚赖氨酸包被的硅片或其他固相支持物(如玻璃片、硅片、聚丙烯膜、硝酸纤维

膜、尼龙膜等)上将寡核苷酸或 cDNA 在芯片上做成点阵,采用机器人或点样头以大规模阵列的形式排步,形成可与目的分子(如基因)相互作用,并进行反应的固相表面,在激光的顺序激发下标记荧光,根据实际反应情况,分别呈现不同的荧光发射谱征,数码相机(CCD)或激光共聚焦显微镜根据其波长及波幅特征收集信号,作出比较和检测,从而迅速得出所要的信息。该技术^[33]基本过程包括:①DNA 分子阵列集成,包括基因芯片的制作和探针的设计。②芯片的样品制备与分子杂交。与常规方法类似,将纯化后的 RNA 或 DNA,或人工合成的寡核苷酸进行荧光、生物素或地高辛标记。标记好的样品与基因芯片进行杂交,使杂交效率极大地提高。③杂交信号的检测与分析,通过杂交,与探针互补的样品与之结合,从而呈现阳性荧光信号或生物素阳性信号,进而通过激光共聚焦显微镜、CCD 相机等技术对杂交信号进行并行采集,并将信号传至计算机系统进行处理。鉴定其中的可能生物信息。

有报道根据 16 种石斛的 ITS1-5.8S-ITS2 序列,用 DNA 微阵列方法检测石斛药材,用荧光标记的 ITS2 序列为探针,鉴别药典下所列 5 种石斛属药材^[34]。李同详等^[35-36]介绍了利用筛选 gDNA 种特异性探针的抑制性差减微阵列“SSH-array”新技术,对名贵中药材石斛 5 个品种作为实验材料,首先用抑制性差减杂交获得 2 个品种之间的 gDNA 差异片段,然后用这些 gDNA 差异片段与由所有研究品种的 gDNA 制备成的微阵列杂交筛选到某一个品种的特异性 gDNA 片段。这些种特异性 gDNA 探针作为种特异性探针进行物种鉴定。

由于基因芯片是从遗传学角度来鉴别中药的物种,但中药药效的作用成分大多是多次代谢产物,基因芯片鉴定的是中药的真伪而不是针对中药的优劣而进行鉴定,因而它不能取代中药化学成分指纹图谱等的鉴定,须和其他技术有机结合才能在中药学现代化这系统中发挥最佳作用。

总之,传统的鉴别方法仍然不失为鉴定石斛的重要依据。但随着现代分子生物技术的迅猛发展,PCR 扩增 DNA 的直接测序资料将成为分子数据的

主流。分子标记种类繁多、各有利弊,目前在石斛鉴定方面应用最多的是 rDNA 的 ITS 序列,其他诸如 RAPD、cpDNA/mtDNA RFLPs、ISSRs、AFLPs 以及共显性 SSRs 等都可以用于种间的鉴定研究。更直接的方法需要在建立基因组文库的基础上,进行单核苷酸多态性分析,从而获得迅速而可靠的鉴定结果。随着分子标记技术的日益成熟,有可能在基因组上寻找多态位点,用以揭示属间、种间、居群间甚至个体间的遗传变异,从而指导人们在植物居群生物学、保护生物学、系统生物学等领域开展研究,并在良种培育以及遗传资源研究、保护和利用过程中采取积极有效的措施。

参考文献

- 1 徐红,王峥涛,胡之璧. 中药 DNA 分子鉴定技术的发展与应用. 世界科学技术-中药现代化, 2003, 5(2): 24~30.
- 2 李晓波,伏见裕利,王峥涛,等. 基于 PCR 技术的中药 DNA 分子标记鉴别. 中草药, 2002, 33(8): 760~762.
- 3 林萍,毕志明,徐红,等. 石斛属植物药理活性研究进展. 中草药, 2003, 34(11): 附 19~22.
- 4 魏小勇,方花. 石斛属药用植物生物工程研究. 中医药通报, 2004, 3(6): 45~47.
- 5 Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, et al. DNA Polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucl Acids Res, 1990, 18: 6531~6535.
- 6 Welsh J, McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. Nucl Acids Res, 1990, 18: 7213~7218.
- 7 曹晖,刘玉萍,邵鹏柱,等. DNA 分子指纹图谱与测序技术在中药品质研究中的现状及展望. 中国中药杂志, 1998, 23: 643~646.
- 8 丁小余,徐璐珊,王峥涛,等. 铁皮石斛居群差异的研究(I)-植物体形态结构的差异. 中草药, 2001, 32(9): 828~831.
- 9 彭锐,李泉森,李隆云. 石斛的分子生物学鉴定—基于 RAPD 分析. 西南农业大学学报(自然科学版), 2004, 26(4): 437~440.
- 10 姜自锋,林乃铨,徐梅. RAPD 及其应用中的一些问题. 福建农林大学学报, 2002, 31(3): 356~360.
- 11 YONG Bi-fu, AXEL D, RICHARDS K, et al. Genetic diversity within a range of cultivars and landraces of flax as revealed by RAPDs. Genetic Resources and Crop Evolution, 2002, 49: 167~174.
- 12 P Vos, R Hogers, M Bleeker, et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Res, 1995, 23(21): 4407~4414.
- 13 Hosokawa K, Minami M, Kawahara K, et al. Discrimination among three species of medicinal Scutellaria plants using RAPD markers. Planta Med, 2000, 66(3): 270~272.

- 14 虞泓,和锐,倪念春,等.石斛属4种植物的 AFLP 分析.中草药, 2004, 35(7): 808~810.
- 15 丁小余,王峥涛,徐红,等.枫斗类石斛 rDNA ITS 区的全序列数据库及其系列分析鉴别.药学学报, 2002, 37(7): 567~573.
- 16 丁小余,王峥涛,徐璐珊,等.F 型、H 型居群的铁皮石斛 rDNA ITS 区序列差异及 SNP 现象的研究.中国中药杂志, 2002, 27(2): 85~89.
- 17 Ding XY, Xu LS, Wang ZT, et al. Authentication of Stem of *Dendrobium officinale* by rDNA ITS region Sequences. *Planta Medica*, 2002, 68: 191~192.
- 18 Lau DT, Shaw PC, Wang J, et al. Authentication of medicinal *Dendrobium* species by the internal transcribed spacer of ribosomal DNA. *Planta Med*. 2001, 67(5):456~60.
- 19 徐红,李晓波,丁小余,等.中药黄草石斛 rDNA ITS 序列分析.药科学报, 2001, 36(10): 777~783.
- 20 丁小余,徐璐珊,徐红,等.曲茎石斛及其近似种鉴别的形态和 DNA 分子证据.药科学报, 2001, 36(11): 868~873.
- 21 丁小余,徐璐珊,王峥涛,等.束花石斛及其近似种的 DNA 分子鉴别.中国中药杂志, 2002, 27(6): 407~411.
- 22 张铭,黄华荣,廖苏梅,等.石斛属 RAPD 分析及鉴定铁皮石斛的特异性引物设计.中国中药杂志, 2001, 26(7): 442~447.
- 23 Ding XY, Wang ZT, Zhou KY, et al. Allele-specific primers for diagnostic PCR authentication of *Dendrobium officinale*. *Planta Med*, 2003, 69(6): 587~588.
- 24 丁小余,徐璐珊,王峥涛,等.齿瓣石斛的位点特异性 PCR 鉴别.药科学报, 2002, 37(11): 897~901.
- 25 丁小余,徐璐珊,常俊,等.兜唇石斛的位点特异性 PCR 鉴别.南京师大学报(自然科学版), 2002, 25(4): 71~76.
- 26 徐红,王峥涛,丁小余,等.金钗石斛的位点特异性 PCR 鉴别研究.中草药, 2005, 36(10):1540~1544.
- 27 滕艳芬,吴晓俊,徐红,等.石斛及其常见混淆品的 matK 基因序列比较.中国药科大学学报, 2002, 33(4): 280~283.
- 28 张婷,徐璐珊,王峥涛,等.药用植物束花石斛、流苏石斛及其形态相似种的 PCR-RFLP 鉴别研究.药科学报, 2005, 40(8): 728~733.
- 29 谭文澄,方盛国,谢海,等.兰属植物 DNA 指纹图的研究.四川师范大学学报(自然科学版), 2000, 23(4): 407~411.
- 30 张婷,王峥涛,徐璐珊,等.线粒体 nad1 内含子 2 序列在石斛属植物分子鉴定中的应用.中草药, 2005, 36(7): 1057~1062.
- 31 Schena M, Shalon D, Dais RW, et al. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science*, 1995, 270(20): 467~470.
- 32 杨忠,张亚鹏,黄文秀,等.基因组学与生物芯片技术在中药研究与开发中的应用.药科学报, 2002, 37(6): 490~496.
- 33 Fodor SP, Hava HP, Huang XC, et al. Multiplexed biochemical assays with biological chips. *Nature*, 1993, 364(6437): 555~556.
- 34 Zhang YB, Wang J, Wang ZT, et al. DNA microarray for identification of the herb of *Dendrobium* species from Chinese medicinal formulations. *Planta Med*, 2003, 69(12): 1172~1174.
- 35 李同详,王进科,王小兰,等.一种中药鉴定 gDNA 芯片的制备与展望.中草药, 2005, 36(7): 961~964.
- 36 Tong XL, Jin KW, Yun FB, et al. A novel method for screening species-specific gDNA probes for species identification. *Nucleic Acids Res*, 2004, 32 (4): e45.

Application of DNA Molecular Biological Technology in Identification of Traditional Chinese Medicine *Dendrobium*

Ying Yi, Xu Hong, Wang Zheng Tao

(Key Laboratory of standardization of Chinese medicines of Education, Institute of Chinese Materia Medica, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai, 201203;
(2. Shanghai R&D Centre for Standardization of Chinese Medicines, Shanghai, 201203)

We summarized the application of DNA molecular biological technology in identification of traditional Chinese medicine *Dendrobium* in recent years, including Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) technology, Arbitrary Primer-PCR (AP-PCR) technology, Amplified fragment-length polymorphism (AFLP) technology, DNA Sequencing technology, gene chip technology, and so on.

Keywords: Molecular biological technology TCM identification *Dendrobium*

(责任编辑:林木,责任编审:张志华,英文译审:凌仰之)