

· 资源与鉴定 ·

柴胡及其常见伪品的 DNA 指纹鉴定

迟莹¹, 周琳¹, 张丽华^{1*}, 李明成², 王冰梅²

(1. 北华大学药学院, 吉林 吉林 132013; 2. 北华大学医学检验学院, 吉林 吉林 132013)

[摘要] 目的: 建立柴胡及其伪品 DNA 指纹鉴别方法。方法: 采用改良的 CTAB 法提取柴胡及常见伪品的干根基因组 DNA, 设计鉴别正品柴胡及其伪品的特异性引物, 利用 PCR 扩增技术对正品柴胡及其伪品进行 DNA 指纹鉴定。结果: 改良的 CTAB 法提取出大小为 23 kb 的基因组 DNA 条带, 纯度在 (1.71 ± 0.11) , 且经特异引物 PCR 扩增, 只有正品柴胡能扩增出 173 bp 大小的片段, 而伪品未能扩增出目的片段。结论: 柴胡 DNA 具有特异性指纹特征, 可作为市售柴胡的真伪鉴定依据。

[关键词] 柴胡; 特异性引物; DNA 指纹特征; 内转录间隔区

[中图分类号] R282 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)15-0143-05

[doi] 10.11653/syjf2013150143

Identification of *Bupleurum chinese* and Common Adulterants by DNA Fingerprint

CHI Ying¹, ZHOU Lin¹, ZHANG Li-hua^{1*}, LI Ming-cheng², WANG Bing-mei²

(1. Pharmacy College, Beihua University, Jilin 132013, China;

2. Medical College, Beihua University, Jilin 132013, China)

[Abstract] **Objective:** To establish DNA fingerprint method for the identification of *Bupleurum chinese* and adulterants. **Method:** The improved CTAB method was used to extract genomic DNA from *B. chinese* and common adulterants, designing the specific primer that identifies the *B. chinese* and common adulterants, and using DNA fingerprint Technology to identify the *B. chinese* and common adulterants by PCR. **Result:** The 23 kb DNA was separated from the *B. chinese* and common adulterants by the improved CTAB, which purity was (1.71 ± 0.11) , the diagnostic results of PCR with specific primer showed that a 173 bp fragment was only amplified from the *B. chinese*. **Conclusion:** *B. chinese* DNA fingerprint has specific characteristics, it can be used for the crude drugs in the current market.

[Key words] *Bupleurum chinese*; specific primer; DNA fingerprint; internal transcribed spacer

柴胡为我国传统常用中药, 是一种多来源药材, 在中国应用已有 2 000 多年历史^[1]。《中国药典》(2010 年版) 规定伞形科植物柴胡 *Bupleurum chinese*

DC. 和狭叶柴胡 *B. scorzonifolium* Willd. 的干燥根为正品^[2]。按其性状不同, 前者习称“北柴胡”, 后者习称“南柴胡”, 具有疏肝解郁、升举清气之功效^[3]。目前, 中药市场上的柴胡品种繁多, 因其药用价值高、地理分布广, 用传统的性状鉴别及理化鉴别具有一定困难。

随着分子生物学技术的不断发展, 以中药材基因为鉴定目标的 DNA 分子标记技术以其特异性强、准确可靠等优点被广泛应用于中药鉴定领域。如叶绿体基因与核基因结合的 DNA 条形码技术, 因其强大的物种鉴定与发现新种的能力而受到广泛关

[收稿日期] 20121019(012)

[基金项目] 吉林省科技发展计划项目(20090906)

[第一作者] 迟莹, 硕士, 从事中药 DNA 指纹技术研究与应用研究, Tel: 18650877921, E-mail: chiying05@tom.com

[通讯作者] * 张丽华, 教授, 硕士生导师, 从事现代分析技术在药物质量控制中的应用研究, Tel: 18604498619, E-mail: bhdzlh@sina.com

注,是目前常用的物种鉴定技术手段^[4]。高等植物的 rDNA 作为遗传信息的载体,是研究植物的系统发育及分类的理想对象。其中 ITS (internal transcribed spacer) 是更精确的分子标记,它是 18S ~ 26S 核 rRNA 基因的内转录间隔区,全长 600 ~ 700 个 bp,被 5. 8S rDNA 间隔成 ITS1 和 ITS2 两个区段,长度保守且核苷酸序列变异较大^[5]。可以提供较丰富的变异位点和信息点,有研究表明柴胡属的 ITS 序列种间同源性低于 75%,而种内序列同源性高于 87%,这种序列之间的差异说明 ITS 是柴胡分种的有效分子标记^[6-7]。

本实验对传统的 CTAB^[8-10]法提取柴胡干根基因组 DNA 进行研究且改良,建立了一种高效简便的植物干根 DNA 提取方法,利用 ITS 序列独特的变异优势,设计可特异性扩增部分 ITS 片段的引物,建立中药柴胡的指纹特征鉴定方法,为中药柴胡及其常见伪品的鉴定提供了可靠的科学依据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 UV WHITE-2020D 型凝胶成像分析系统(美国 Bio-Rad 公司)、GL-20G-II 型变速冷冻离心机(上海安亭科学仪器厂)、ABI9700 型聚合酶链式反应扩增仪(美国 Cold spring 公司)、紫外凝胶成像自动分析仪(美国 Cold spring 公司)、JY600C 型双稳定时电泳仪(北京市君意东方电泳设备有限公司)。

1.2 样品与试剂

1.2.1 样品 柴胡对照品(批号 120992-200504,吉林市食品药品检验所鉴定)、柴胡(吉林市药品检验所鉴定)、狭叶柴胡 1(吉林市药品检验所鉴定)、狭叶柴胡 2(采自河北安国药材基地)、大叶柴胡、银柴胡、银州柴胡、小叶黑柴胡、锥叶柴胡(吉林市药品检验所鉴定)。

1.2.2 试剂 十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)、β-硫

基乙醇、10 × 聚合酶链式反应(PCR)缓冲液、聚乙烯吡咯烷酮(PVP)、Taq DNA 聚合酶、游离脱氧核苷三磷酸 dNTPs、琼脂糖(购自 Genetech company limited)、无菌双蒸水(自制),其他化学试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 基因组 DNA 提取 采用传统 CTAB 法提取柴胡及其常见伪品的干根基因组 DNA。

采用改良 CTAB 法提取柴胡及其常见伪品基因组的干根基因组 DNA。

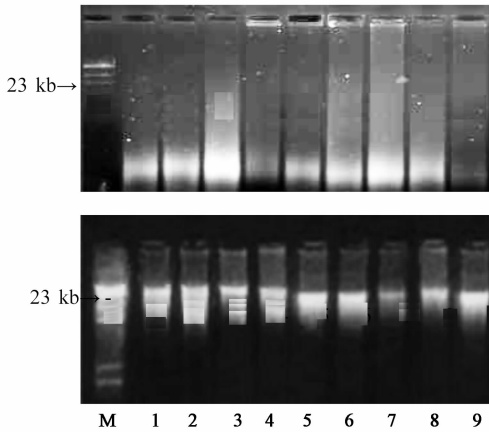
取 0.07 g 各干根样品,液氮研磨成粉末转移至离心管中,加入 1 mL 2 × CTAB (100 mmol · L⁻¹ Tris pH 8.0, 1.4 mol · L⁻¹ NaCl, 4% β-巯基乙醇, 0.20 mmol · L⁻¹ EDTA pH 8.0, 2% CTAB, 2% PVP) 提取液浸泡,置于 65 °C 水浴锅中温浴,震荡摇匀 1 h,转速 130 r · min⁻¹,各样品煮沸冷冻处理。11 000 r · min⁻¹, 4 °C 离心 15 min。吸取上清液,加入等体积的氯仿-异戊醇(24:1),缓慢上下翻转 10 次,9 000 r · min⁻¹ 4 °C 离心 10 min。吸取上清液,加入等体积氯仿-异戊醇(24:1),9 000 r · min⁻¹ 4 °C 离心 10 min 抽提 3 次。吸取上清液,加入其 2 倍体积的 -20 °C 预冷无水乙醇,混匀后于 -20 °C 放置 2 h 沉淀核酸。10 000 r · min⁻¹ 4 °C,离心 10 min,弃上清液,收集 DNA 絮状沉淀。沉淀用 80% 乙醇、无水乙醇各洗涤 2 次,室温晾干,用 100 μL TE 溶解,既得纯净 DNA。于 -20 °C 保存备用。

2.2 DNA 纯度及浓度检测 将改良 CTAB 法提取的基因组 DNA 经适当稀释,用紫外分光光度仪测定其吸光度 A₂₆₀, A₂₈₀。以 A₂₆₀/A₂₈₀ 鉴定模版 DNA 纯度并计算浓度。测得 DNA 样本的 A₂₆₀/A₂₈₀ 在 (1.71 ± 0.11),说明此样本无 RNA 和蛋白质污染。结果见表 1。

表 1 柴胡及其常见伪品的 DNA 浓度检测

样品	A ₂₆₀	A ₂₈₀	纯度	质量浓度/μg · L ⁻¹
柴胡标准对照品 (<i>Bupleurum chinese</i>)	0.370	0.204	1.814	1.85
北柴胡 (<i>B. chinese</i>)	0.375	0.207	1.763	1.82
狭叶柴胡 1 (<i>B. scorzonerifolium</i>)	0.341	0.208	1.639	1.71
狭叶柴胡 2 (<i>B. scorzonerifolium</i>)	0.347	0.210	1.652	1.74
大叶柴胡 (<i>B. longiradiatum</i>)	0.326	0.203	1.606	1.79
银柴胡 (<i>Stellaria dichotoma</i> L. var. <i>lanceolata</i> Bunge)	0.345	0.209	1.651	1.73
银州柴胡 (<i>B. yinchowense</i>)	0.328	0.204	1.608	1.64
小叶黑柴胡 (<i>B. smithii</i> wolf var <i>parvifolium</i>)	0.328	0.202	1.624	1.64
锥叶柴胡 (<i>B. bicaule</i>)	0.322	0.201	1.602	1.61

2.3 琼脂糖凝胶电泳 将两种方法提取的基因组 DNA 样品分别与 $6 \times$ Loading Buffer (3:1) 溶液混匀,点样于 0.8% 琼脂糖凝胶 (内含 EB $0.5 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$) 板上, $10 \text{ V} \cdot \text{cm}^{-1}$ 凝胶电泳 80 min, 经紫外检测拍照。采用传统 CTAB 法提取的柴胡及其常见伪品基因组 DNA 条带不明显并存在拖尾现象,而改良的 CTAB 法可提取出单一亮带,相对分子质量大小为 23 kb,琼脂糖凝胶电泳条带清晰明亮,结果见图 1。



a. 传统 CTAB 法; b. 改良 CTAB 法; M. Marker; 1. 柴胡标准对照品; 2. 柴胡; 3. 狭叶柴胡 1; 4. 狭叶柴胡 2; 5. 大叶柴胡; 6. 银柴胡; 7. 银州柴胡; 8. 小叶黑柴胡; 9. 锥叶柴胡

图 1 传统与改良的 CTAB 法提取柴胡及其常见伪品基因组 DNA 琼脂糖凝胶电泳

2.4 引物设计 在 Genbank 中下载正品柴胡 (AM711597.1), 狭叶柴胡 (HQ687959.1) 及其常见伪品大叶柴胡 (EU001341.1), 银州柴胡 (HQ687967.1), 小叶黑柴胡 (HQ687962.1), 锥叶柴胡 (HQ824723.1) 18S ~ 26S 核 rRNA 基因的内转录间隔区 (internal transcribed spacer, ITS) 序列, 经过 DNA Star7.0 软件比对, 采用 Primer premier 5.0 软件设计柴胡的特异性引物, 再通过 NCBI 网站中 Primer-BLAST 在线软件对该引物进行评估, 最后得到一对能特异性扩增柴胡部分 ITS 序列的鉴定引物, 送往上海生工生物工程技术服务公司合成。上游引物: 5'-TCTGCCCTGGGTGTCA-3'; 下游引物: 5'-GCAAGAGGTGCGTAA-3'。

2.5 PCR 扩增反应 PCR 反应体系: dNTPs ($12.5 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$) $2.4 \mu\text{L}$, $10 \times$ PCR buffer (含 Mg^{2+}) $3 \mu\text{L}$, 引物 ($12.5 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 各 $1 \mu\text{L}$, *Taq* DNA 聚合酶 $1 \mu\text{L}$, 模板 DNA $1 \mu\text{L}$ ($10 \sim 30 \text{ ng}$), 总反应体积为 $30 \mu\text{L}$ 。循环参数: $94 \text{ }^\circ\text{C}$ 预变性 5 min, $94 \text{ }^\circ\text{C}$ 变性 30 s, $56 \text{ }^\circ\text{C}$ 退火 30 s, $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 延伸 45 s, 30 个循环后 $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 延伸 7 min, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存。

将 PCR 扩增产物与 $6 \times$ Loading Buffer (3:1) 溶液混匀, 点样于 2% 琼脂糖凝胶 (内含 EB $0.5 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$) 板上, $10 \text{ V} \cdot \text{cm}^{-1}$ 凝胶电泳 50 min, 经紫外检测拍照。用特异性引物分别对柴胡及其伪品的 DNA 进行 PCR 扩增实验, 仅有柴胡和狭叶柴胡与引物有特异性结合位点, PCR 扩增出分子片段为 173 bp 的 DNA 产物, 与预期片段大小一致, 结果见图 2。

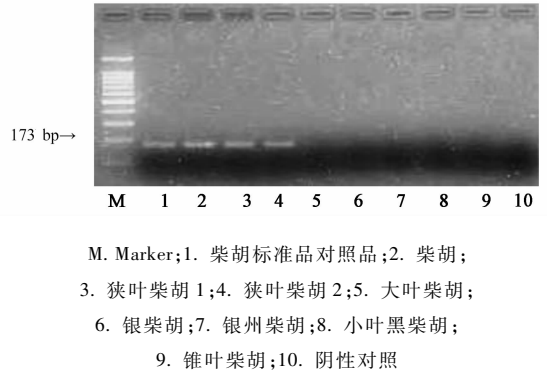


图 2 柴胡及其常见伪品 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳 (图 3 同)

2.6 PCR 扩增反应的重复性 分别 3 次在相同条件下使用改良的 CTAB 法从正品柴胡及其常见伪品中提取基因组 DNA, 进行 PCR 扩增, 结果表明均在相同位置上扩增出正品柴胡的特异性片段, 证明方法的可行性。见图 3。

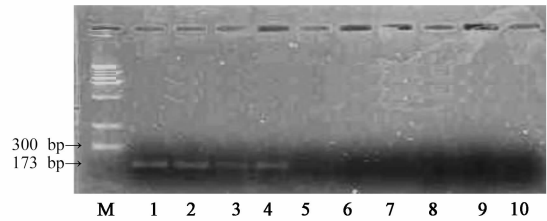


图 3 柴胡及其常见伪品 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳

2.7 PCR 扩增反应的稳定性 分别选取 Fermentas 公司、上海生工公司、华美公司、北京鼎国公司、天根公司的 *Taq* DNA 聚合酶, 使用相同的 PCR 扩增仪进行 PCR 扩增反应, 结果显示: 使用不同公司的 *Taq* DNA 聚合酶进行 PCR 扩增实验均得到相同的鉴定结果。

2.8 PCR 扩增产物检测与蓝白斑筛选 将模板 DNA 的 PCR 扩增产物与 pGM-T vector 连接, 连接产物转化为感受态宿主 (DH-5 α), 经蓝白斑筛选与特异性 PCR 扩增技术鉴定重组质粒, 结果见图 4。

2.9 PCR 扩增产物的序列分析 上述重组质粒送往上海生工生物工程技术服务公司测序后, 将所测的柴胡 PCR 扩增片段结果通过“blast” (NCBI 网站) 进行序列检索, 进行同源比较, 结果表明: 所测样品柴胡基因组 DNA 相对的 173 bp 片段与柴胡基因

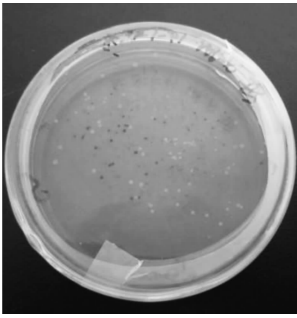


图 4 柴胡 PCR 基因片段重组质粒的蓝白斑筛选

序列 (AM711597.1) 的同源性为 100%, 结果见图 5。

Score = 320 bits (173), Expect = $1e^{-103}$

Identities = 173/173 (100%), Gaps = 0/173

(0%) Strand = Plus/Minus

```

Query 1   TCTGCCTGGGTGTACGCTAAAGCATTGCCCTCCGACGCTCGCTCAAAGCGAGTGGTTGC 60
Sbjct 360  TCTGCCTGGGTGTACGCTAAAGCATTGCCCTCCGACGCTCGCTCAAAGCGAGTGGTTGC 419
Query 61  TGTTCCGGGGGACGGAAAAGTGACCTCCCGTGCCTCGTGGCGGTGGTTTAAAGAGAG 120
Sbjct 420  TGTTCCGGGGGACGGAAAAGTGACCTCCCGTGCCTCGTGGCGGTGGTTTAAAGAGAG 479
Query 121 TCACCGGAGATCGGAAAACGCAACATTGGTGGAAAGTGGTTACGCACCTCTTGC 173
Sbjct 480  TCACCGGAGATCGGAAAACGCAACATTGGTGGAAAGTGGTTACGCACCTCTTGC 532

```

图 5 柴胡基因片段 PCR 扩增产物序列 blast

3 讨论

本研究关键在于采用改良的 CTAB 法从中药柴胡干根中提取基因组 DNA, 筛选并设计了柴胡的 ITS2 特异性引物。改良 CTAB 法的优点是在传统的 CTAB 法基础上进行了煮沸冷冻处理, 利用热胀冷缩这一原理使细胞壁胀裂更完全, 使 DNA 得到充分释放, 保证了基因组 DNA 的完整性。

DNA 在提取过程中可能会受到试剂、pH 等因素的影响, 极易发生降解, 而 β -巯基乙醇具有良好的抗氧化性, 能有效阻止酚的氧化且能避免 DNA 降解。为了从柴胡干根样品中得到高质量的基因组 DNA, 笔者对 β -巯基乙醇的浓度做了调整, 结果表明提取的 DNA 完整、浓度高。

文献中报道^[11], 提取基因组 DNA 时多选用植物的新鲜叶茎, 而柴胡主要是以干根入药, 而采用 CTAB 法提取干品柴胡的基因组 DNA 鲜有报道。故选取中药柴胡干根提取 DNA 进行研究。柴胡干根中富含多糖、蛋白质、色素等杂质, 严重干扰琼脂糖凝胶电泳结果, 出现拖尾等现象。十六烷基三甲基溴化铵具有与多聚糖和蛋白质形成复合物这一特性。改良的 CTAB 法调整了有机溶剂对 DNA 的抽提次数, 利用 CTAB 的这一特性, 通过多次有机溶剂抽提, 有效除去柴胡干根中富含的大量多糖、蛋白质及色素等杂质, 使琼脂糖凝胶电泳结果条带更加清晰。

研究表明, 改良的 CTAB 法适用于从中药柴胡及其常见伪品干根中提取基因组 DNA。该方法提取的 DNA 具有相对分子质量大而完整, 条带明亮且无拖尾现象, DNA 纯度、浓度高等优点, 优于传统的 CTAB 法。

本研究选择柴胡及其常见伪品的 ITS 序列, 查找它们不同的变异位点, 设计出了柴胡的特异性引物并进行 PCR 扩增实验, 当退火温度为 56 °C 时, 仅有柴胡及狭叶柴胡等 4 个样品扩增出 173 bp 的目的片段, 为正品。而大叶柴胡、银柴胡、银州柴胡、小黑叶柴胡、锥叶柴胡等 7 个样品均未扩增出现目的片段, 为伪品。PCR 扩增产物测序结果通过“blast”序列检索显示, 其与药典规定的正品柴胡的同源性为 100%, 且表明该目的片段属于 ITS2 序列, 其长度比较保守, 为 187 ~ 252 bp, 核苷酸序列变化较大, 最大差异率为 14.2%^[12]。研究表明, 利用 ITS 序列之间的差异设计特异引物并进行 PCR 扩增, 可对柴胡种间及种以下的等级做出有效鉴别。

本研究建立了中药柴胡干根及其常见伪品的基因组 DNA 指纹鉴定方法, 能对药典规定的正品柴胡及其常见伪品做出有效鉴别, 为柴胡及其伪品的指纹鉴定研究提供了可靠的科学依据。

【参考文献】

- [1] 森立之. 神农本草经 [M]. 上海: 上海科技卫生出版社, 1959: 35.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部 [S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010.
- [3] 黄幼异, 黄伟, 孙蓉. 柴胡皂苷对肝脏的药理毒理研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17 (17): 298.
- [4] 许亮, 谷丽艳, 赵丹玉, 等. DNA 条形码 (DNA Barcoding) 用于动物类中药鉴定的应用与展望 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(14): 229.
- [5] 孟杰, 姚入宇, 陈兴福, 等. 柴胡属植物分类研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2012, 37(11): 1523.
- [6] Xie H, Huo K K, Chao Z, et al. Identification of crude drugs from chinese medicinal plants of the genus *bupleurum* using ribosomal dna its sequences [J]. *Planta Med*, 2009, 75(1): 89.
- [7] Yang Z Y, Chao Z, Huo K K, et al. Its sequence analysis used for molecular identification of the *bupleurum* species from northwestern china [J]. *Phytomedicine*, 2007, 14(6): 416.
- [8] 谭莹, 张丽华, 李明成, 等. 中药材川贝母 DNA 指纹鉴定研究 [J]. 中国药学杂志, 2011, 46(1): 14.

牻牛儿苗种质资源遗传多样性的 ISSR 研究

郝东,尹海波*,赵晓雨,杨小乐

(辽宁中医药大学药学院,辽宁 大连 116600)

[摘要] 目的:研究牻牛儿苗亲缘关系和遗传多样性。方法:23 个样品进行简单序列重复区间 (ISSR) 分析,利用 NTSYS 软件计算材料间遗传相似系数,并用 UPGMA 方法聚类,构建亲缘关系系统图。结果:从 100 条 ISSR 引物中筛选出 14 条多态性明显、反应稳定的引物,在 23 份供试材料 DNA 中共扩增出 185 条谱带,其中多态性条带 142 条,占 76.8%。材料间 ISSR 标记遗传相似性系数 (GS) 在 0.458~0.916。聚类分析结果显示,所有供试材料均可区分开,并聚为 6 组。结论:分子标记研究结果与牻牛儿苗的地理位置、形态性状存在显著的相关性,较好地揭示了牻牛儿苗种源间的遗传关系,可为牻牛儿苗资源划分和良种选育提供科学依据。

[关键词] 种源; 牻牛儿苗; 简单序列重复区间; 遗传关系

[中图分类号] R282 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)15-0147-04

[doi] 10.11653/syjf2013150147

Genetic Diversity of *Erodium stephanianum* Based on ISSR Analysis

HAO Dong, YIN Hai-bo*, ZHAO Xiao-yu, YANG Xiao-le

(Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China)

[Abstract] **Objective:** This article assessed the genetic relationship and genetic diversity in *Erodium stephanianum*. **Method:** Twenty-three germplasmic resources of *E. Stephanianum*. were analyzed by inter simple sequence repeat (ISSR) molecular markers. Genetic similarities were calculated by using NTSYS software and the dendrogram was constructed by using UPGMA method. **Result:** Fourteen ISSR primers were selected from 100 ISSR primers, and 185 DNA fragments were amplified from 23 samples. Of which, 142 fragment were polymorphic (percentage of polymorphic bands was 76.8%). The genetic similarity among all accessions ranged from 0.458 to 0.916. Clustering analysis showed that the 23 samples of *Fritillaria* could be distinctively classified into 6 groups. **Conclusion:** Results from the cluster analysis were correlated significantly with the morphological characteristics and geographical location of 23 samples. The data indicate that ISSR technique is useful to determine genetic diversity and genetic relationship among *E. stephanianum*. provenances, providing a scientific basis for

[收稿日期] 20120112(002)

[基金项目] 辽宁省教育厅项目(2009A498);杏林青蓝工程杰出青年基金

[第一作者] 郝东,硕士,从事中药品质评价研究,Tel:0411-87586012,E-mail:haodong454@sina.com

[通讯作者] *尹海波,教授,硕士生导师,从事中药资源及药材的品质评价研究,Tel:15998530628,0411-87586003;E-mail:yhb0528@sina.com

[9] 杨飞,徐延浩. 温度对菘蓝基因组 DNA 甲基化的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(6):113.

[10] 朱田田,晋玲,杜骏,等. 中麻黄基因组 DNA 不同提取方法的比较[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(10):72.

[11] 林淑芳,帅凌飞,袁媛,等. 黄芩延长因子 1a 基因全长

cDNA 的克隆及其功能[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(20):126.

[12] 武莹,阎玉凝,刘春生. 柴胡 ITS 序列研究、药源调查及商品鉴定[D]. 北京:北京中医药大学,2005.

[责任编辑 邹晓翠]