

研究论文 ·

石斛属 RAPD 分析及鉴定铁皮石斛的特异性引物设计

张 铭¹, 黄华荣¹, 廖苏梅¹, 高江云²

(1. 浙江大学生命科学学院, 浙江 杭州 310012;

2. 中国科学院西双版纳热带植物园, 云南 昆明 650223)

[摘要] 目的:对石斛属植物亲缘关系进行分析,并设计一对能方便准确地鉴别铁皮石斛的特异性引物。方法:用随机扩增多态性 DNA(RAPD)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,并构建聚类树状图。根据筛选到的 DNA 片段序列,将 Sangon18 引物从 3' 端延长至 20 bp,得到所要的特异性引物。结果和结论:设计成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。

[关键词] 石斛属;铁皮石斛;RAPD;特异性引物

[中图分类号] R 282.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1001-5302(2001)07-0442-06

石斛属 *Dendrobium* Sw. 是兰科植物中的第二大属,全世界约有 1 500 ~ 1 600 种,我国近 80 种^[1],其中 30 多种可入药^[2],而铁皮石斛 *Dendrobium candidum* Wall. ex Lindl. 是其中的上品,早在《神农本草经》上就已把它作为传统的珍稀野生中药材加以记载。近年来,国内外药学研究者对其化学和药理的研究还发现它具有更为重要的药用价值^[3,4]。

石斛的生境十分独特,资源稀少,加之人为滥采和生境破坏,不少名贵品种特别是铁皮石斛已近濒危。因此,目前石斛药材市场上出现大量假冒的铁皮石斛。由于不同来源的石斛其药用成分如石斛碱、石斛多糖的种类和含量差异较大,药理活性亦不同^[5]。而加工成的石斛生药仅仅依靠颜色、形状、气味、味道和质地等感官特征难以区分其真伪。为此一些学者在商品石斛药材的鉴定研究中作了大量的工作^[6~8],其鉴定标准也从传统的性状、显微方法发展到应用色谱、光谱等较新的技术,但这些鉴定方法多数是以鲜植株为材料,且需一定的分类学专业知识和经验。显微粉末鉴定虽可以借助于导管、

筛管、内含物等性状来鉴别,但加工成品其表面性状已发生极大变化,同时相近种又非常相似,这都给鉴定带来了很大的困难。

DNA 分子标记技术的应用使中药鉴定深入到分子水平,提高了鉴定的准确性,也能解决上述的一些难题。1994 年香港中文大学 Cheung 率先用 AP-PCR 方法对西洋参、人参的鉴别进行了研究^[9]。随后出现许多用 DNA 分子标记方法鉴定中药材的报道^[10,11]。但仍因其操作复杂,成本过高,难以作为快速的常规方法应用于中药材的鉴定。

本文在对 26 种石斛进行 RAPD 聚类分析的基础上,对铁皮石斛某些特异性的 DNA 片段序列进行分析,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的某一区域特异性结合,这就提高了鉴定的准确度。同时还因提高了复性温度,从而能在一定程度上消除非样品 DNA 污染所造成的干扰,而有望成为高效准确鉴定铁皮石斛的新方法。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料的名称与来源列表 1,其来源除特别注明外均由中国科学院西双版纳热带植物园高江云先生提供。高江云、傅承新鉴定。

[收稿日期] 2000-09-22

表 1 供试材料和来源

编号	材料名称	编号	材料名称	编号	材料名称
1	<i>Dendrobium hancockii</i> 细叶石斛	11	<i>D. wardianum</i> 大苞鞘石斛	21	<i>D. pendulum</i> 肿节石斛
2	<i>D. nobile</i> 金钗石斛	12	<i>D. candidum</i> 铁皮石斛 Y	22	<i>D. chrysotoxum</i> 鼓槌石斛
3	<i>D. exile</i> 景洪石斛	13	<i>D. jenkinsii</i> 聚石斛	23	<i>D. terminale</i> 刀叶石斛
4	<i>D. denneanum</i> 迭鞘石斛	14	<i>D. williamsonii</i> 黑毛石斛	24	<i>D. linawianum</i> 矩唇石斛
5	<i>D. bellatulum</i> 矮石斛	15	<i>D. capillipes</i> 短棒石斛	25	<i>D. crepidatum</i> 玫瑰石斛
6	<i>D. salaccense</i> 竹枝石斛	16	<i>Ephemerantha. fimbriata</i> 流苏金石斛 ¹⁾	26	<i>D. falconeri</i> 串珠石斛
7	<i>D. fimbriatum</i> 流苏石斛	17	<i>D. acinaciforme</i> 剑叶石斛	27	<i>D. aphyllum</i> 兜唇石斛
8	<i>D. cariniferum</i> 翅萼石斛	18	<i>D. devonianum</i> 齿瓣石斛	28	<i>D. candidum</i> 铁皮石斛 G
9	<i>D. aduncum</i> 钩状石斛	19	<i>D. loddigesii</i> 美花石斛	29	<i>D. candidum</i> 铁皮石斛 A
10	<i>D. moniliforme</i> 细茎石斛	20	<i>D. chrysanthum</i> 束花石斛		

注:表中铁皮石斛 Y,G,A 分别产自云南、广西和安徽 ¹⁾为金石斛属

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取 选择不同植株的适宜叶片数张,剪碎后液氮研磨,取 0.5 g 粉末置于 Eppendorf 管中,加入 500 μ l 抽提缓冲液(100 mmol L^{-1} Tris-HCl, pH 8.0; 100 mmol L^{-1} EDTA; 500 mmol L^{-1} NaCl; 100 mmol L^{-1} β -巯基乙醇; 2 % SDS; 总 pH 7 ~ 7.5) 和 0.05 g VC, 充分混匀后, 65 $^{\circ}\text{C}$ 水浴保温 20 min。冷却至室温, 加入 1/3 体积 5 mol L^{-1} 的 KAc, 再次剧烈振荡混匀后 4 $^{\circ}\text{C}$ 放置 5 min, 4 12 000 g 离心 5 min, 取上清液加入等体积的酚-氯仿-异戊醇(25:24:1), 缓慢颠倒混匀, 4 $^{\circ}\text{C}$ 静置 5 min。4 15 000 g 离心 5 min。取上清液并定量, 加入等体积异丙醇和 1/10 体积的醋酸饱和液, 最后加入 1/10 体积的乙醚。混匀后, 静置 5 min, 待分层后弃去下层多糖, 上清液于 55 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 15 min, 充分挥发乙醚。在 -20 $^{\circ}\text{C}$ 放置 1 h, 4 1 2000 g 离心 10 min, 所得沉淀用 70 % 乙醇洗涤 2 次, 风干后溶于 100 μ l TE 中。UV-265 型紫外分光光度计 (Shimadzu 公司产) 检测并定量。

1.2.2 引物的筛选 用上述样品 DNA 对上海生物工程有限公司 (Sangon) 的 S 序列引物 (S1-S100) 共计 100 条进行筛选, 3 个样品筛选 10 个引物后更换另外 3 个样品继续筛选, 依次类推, 直至 100 个引物筛选完毕, 从中选择扩增谱带清晰且呈多态性的引物用于所有实验样品的扩增。

1.2.3 PCR 扩增和电泳检测 在前期实验中我们对石斛 RAPD 的反应条件和反应参数进行了优化。总反应体积为 25 μ l, 其中含有 60 ng 模板 DNA, 0.6 μ mol L^{-1} 引物 (上海生物工程公司), 2.5 mmol L^{-1} Mg^{2+} , 1 单位 Taq 酶 (进口分装); 100 μ mol L^{-1} dNTP。PCR 扩增仪型号为 Robocycler Gradient 40

(Stratagene 公司产), 反应参数为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 50 sec, 38 $^{\circ}\text{C}$ 复性 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 2 min, 循环 40 次; 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min。扩增完毕, 以 1.8 % 琼脂糖凝胶 (含 EB 0.5 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) 电泳分离, 用 Kadar 数码相机和 ID 凝胶分析系统照相记录结果。

1.2.4 聚类分析 电泳扩增图谱的每一条带 (DNA 片段) 均为一个分子标记, 并代表引物的一个结合位点, 根据各分子标记在相同电泳迁移率下 (相同分子量片段) 的有无统计得到所有位点的二元数据: 有 DNA 扩增带 (显性) 为 1, 无带记 0, 强带和可分辨的弱带均赋值为 1^[13]。应用浙江大学唐启义等编制的 DPS 数据处理系统进行统计分析^[14], UPGMA 建立亲缘关系树状图。

1.2.5 铁皮石斛特异性条带的筛选 分析 20 种引物所得的电泳图谱, 从中挑选出具有铁皮石斛特异性条带的 5 种引物, 重复 RAPD 反应, 筛选出特异性条带能稳定扩增的几种引物。再用顾其华的方法分离并纯化出所需的特异性片段^[15], 然后将纯化好的 DNA 片段用同种引物进行 RAPD 扩增 (复性温度提高至 40 $^{\circ}\text{C}$), 电泳检测后, 用《Molecular Clone: A Laboratory Manual》中的方法进行纯化、测序。

1.2.6 铁皮石斛探针的设计 用双向测序法测定的片段序列, 用 Primer Premier 5.0 (PREMIER Biosoft International 开发) 软件设计出一对约 20 bp 碱基的引物, 进行合成。

1.2.7 铁皮石斛探针的验证 取本实验的 29 种样品为模板, 加入特异性引物, 反应体系和反应参数主要参照 1.2.3, 复性温度为 51 $^{\circ}\text{C}$ 。

2 结果与分析

2.1 DNA 多态性分析

用筛选出的 20 个引物对石斛属 26 个种和金石斛属 1 个种的样本 DNA 进行 RAPD 扩增,共获得 216 条 DNA 扩增带,扩增片段长度在 0.3~2 Kb 之间,引物 S50 获得 21 条带,引物 S2, S69 分别获得 5 条带。平均每个引物产生约 11 条带;其中 20 条带(约占 9.3%)在所分析的石斛属 26 个种都存在,197 条(占 91.2%)为多态性带,如表 2 和图 1 所示。这表明石斛属植物遗传进化背景复杂性,同时也表现出其丰富的遗传多样性。

2.2 石斛属种间亲缘关系分析(图 2)

图 2 表示的是 27 种样品用类平均法聚类后的结果,在遗传距离 0.84 处作结合线 l_1 ,可将 27 种样本分为 2 类,类包括 1,3,5,6,7,8,13,14,15,20,22 等 11 个种,类包括 2,4,9,10,11,12,18,19,21,24,25,26,27 等 13 个种,17,23 归为类,16 号样本单独聚为类。80 年代初,在植物形态分类方面吉占和曾把我国石斛属的 57 个种划分为 9 个组,它们分别为剑叶组、圆柱叶组、禾叶组、心叶组、基肿石斛组、草叶组、黑毛组、顶叶组、大花石斛组^[16]。而从本文绘制的 27 种石斛聚类图可见,类中的 13 个样品全部属于大花石斛组,类 2 个样品均为剑叶组,单独聚为类的 16 号样品为金石斛属的流苏金石斛。这表明本研究在分子水平上的 RAPD 聚类结果与经典的形态分类学结果基本一致。不过,也存在与经典分类学结论不完全吻合的

情况,类的情况较复杂,它包括大花石斛的 4 个种,黑毛组的 3 个种,顶叶组的 3 个种及基肿石斛组和禾叶组各 1 个种,这需要进行进一步的探讨。但若将结合线 l_2 划在 0.74 处时,类可细分为 3 类,从而把顶叶组的 3 个样本(13,15,22)和黑毛组的 3 个样本(5,8,14)区分开来。

表 2 20 种随机引物的 RAPD 标记统计结果

引物	总扩增带	多态性带	多态性带比例/%
S2	5	5	100
S5	15	14	93.3
S12	10	8	80.0
S13	14	12	85.7
S18	12	11	91.7
S21	10	9	90.0
S26	9	9	100
S31	11	10	90.9
S35	8	8	100
S38	17	15	88.2
S48	9	8	88.9
S50	21	20	95.2
S55	11	10	90.9
S62	10	8	80.0
S65	9	9	100
S69	5	4	80.0
S77	10	9	90.0
S80	8	7	87.5
S87	13	12	92.3
S90	9	9	100
总计	216	197	91.2

注:多态性带不包括金石斛属的流苏金石斛

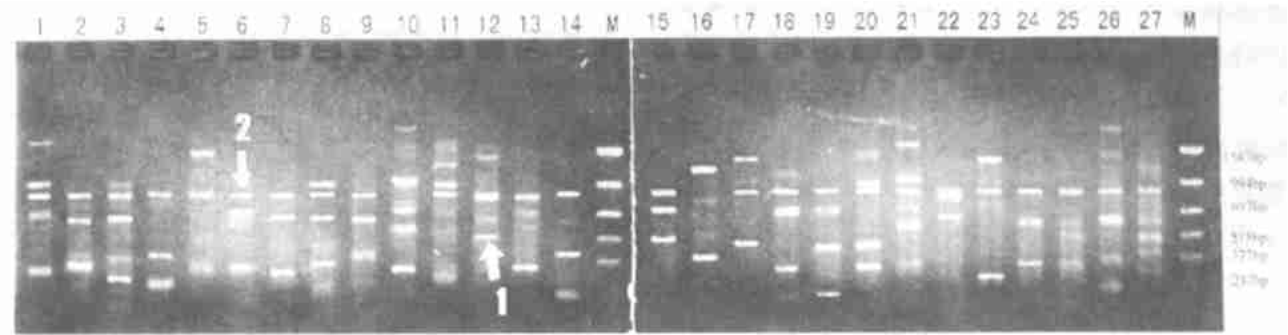


图 1 用引物 S18 扩增得到的 RAPD 图谱

箭头 1 所指的条带为铁皮石斛的特异性带 箭头 2 所指的条带为单一性带,它为石斛属共有
M 为 Marker(图 3,图 4 同) 1~27.与表 1 所列石斛种类的编号相对应(图 2,图 4 同)

2.3 铁皮石斛特异性条带的筛选

在不同引物的扩增产物中,在某一片段长度处仅个别种出现的条带,即其它种不具有的条带可作为该种的特殊标记。铁皮石斛 Y 在引物 S18 的 510 bp(简称 S18/510,以下同),S26/800,S38/980,S44/

450,S22/540 处有清晰的多态性带,而其它种石斛在该处都不扩增,因此这些条带可作为铁皮石斛的特异标记。经过进一步筛选,发现只有 S18/510 处的片段和 S26/800 处的片段能稳定扩增,且 3 个产地的铁皮石斛均有此带。如图 3 所示,继而将铁皮

石斛 Y 箭头处的条带回收后,再用引物扩增(复性温度升至 40) ,结果如图 3 的 a 泳道,这进一步证

明了此片段的特异性,然后将同次 PCR 产物纯化、测序。

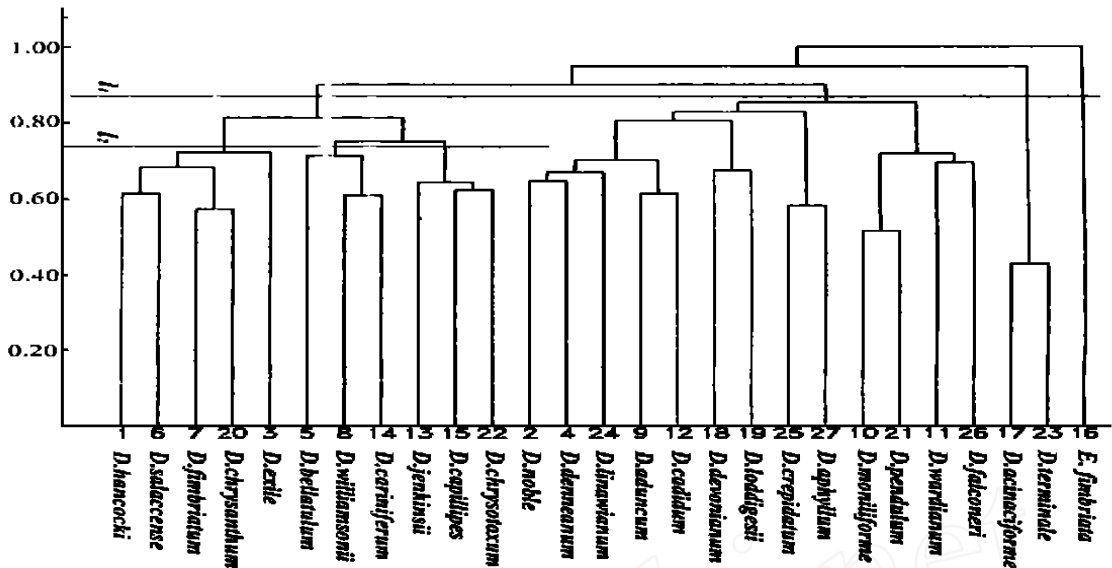


图 2 根据 RAPD 标记绘制分析的 27 种石斛的亲缘关系聚类图

2.4 铁皮石斛特异性引物的设计

S18 样品测序结果显示,片段的长度为 503 bp,与 Marker 标定的长度基本一致。两端的序列和引物序列完全对应。我们采用 Primer Premier 5.0 软件进行引物序列设计,发现在二十个碱基处设计引物最佳,一条引物的 Tm 为 60.6 ,另一条为 61.2 ,它们比较接近且引物内及引物间的碱基配对均不超过 3 对。合成此引物。

2.5 铁皮石斛特异性引物的验证

从图 4 中可以看出,只有 Y,G,A 3 种铁皮石斛均有一条 510 bp 左右的带,其余 25 种石斛无任何扩增产物,说明此特异性引物设计已经成功。

3 讨论

石斛经长期的异花授粉和自然选择,其遗传背景非常复杂,事实上,某些种之间的形态特征相差甚远。本研究结果表明,供试种的基因组 DNA 扩增谱带的多态性高达 91.2 %。远高于濒危植物银松 (21.5 %) [17] 和矮牡丹 (22.5 %)、紫斑牡丹 (27.6 %) [18],而与兰花 [19]、桑属植物 [20] 相当。说明我国石斛属形成较早或变异率较高,因而具有丰富的遗传多样性。

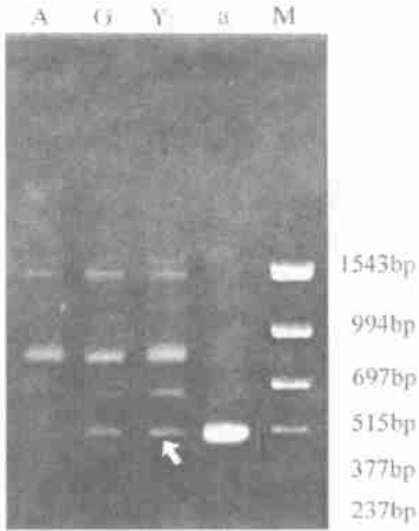


图 3 特异条带的筛选(S18)

A,G,Y 对应的石斛种见表 1(图 4 同)

a. 510 条带的扩增产物

此外,本研究中,绝大多数种间亲缘关系分析的结果与经典分类学的结果十分一致。如美花石斛 *D. loddigesii* 与齿瓣石斛 *D. devonianum*;串珠石斛 *D. falconeri*、大包鞘石斛 *D. wardianum* 与肿节石斛 *D. pendulum*;翅萼石斛 *D. cariniferum* 与黑毛石斛 *D. williamsonii* 在形态分类上十分相近,两者

的亲缘关系 RAPD 分析结果也是如此。但在少数种间关系分析中 RAPD 分析与经典分类学的结论不完全一致,竹枝石斛 *D. salaccense* 和细叶石斛 *D. hancocki* 在经典分类中将前者列入禾叶组,而将后

者列入大花石斛组,我们 RAPD 分析的结果却显示两者的亲缘关系较近。这有待于经典分类学和分子生物学对兰科植物分类的进一步共同研究。

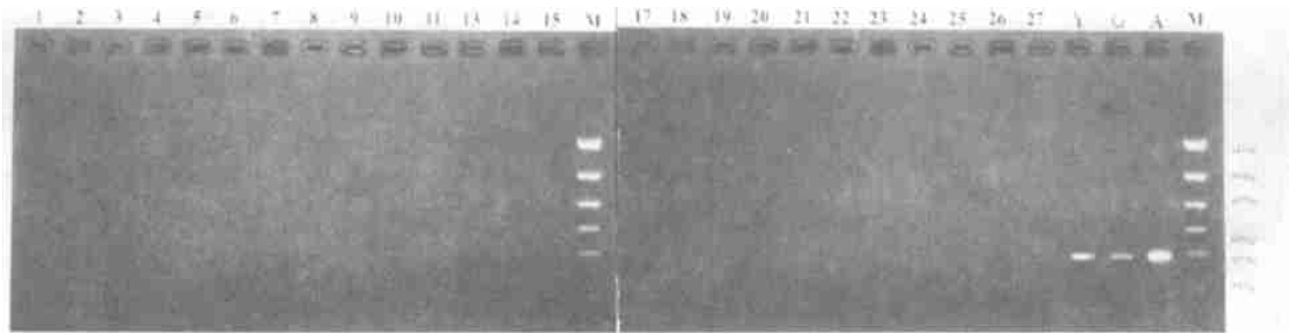


图 4 铁皮石斛特异性引物的验证

本文在对石斛属 26 个种的 RAPD 图谱聚类分析的基础上,挑选出铁皮石斛特异性条带,进行测序,在符合 PCR 引物设计的原则下,将原 RAPD 引物向 3' 端延长至 20 bp 碱基。当有样品需要鉴定时,提取样品 DNA 后,再用探针对它进行一次 PCR 反应,经电泳检测便可达到准确鉴别样品真伪,所以,用此特异性引物进行鉴别时不需再用铁皮石斛作对照实验,只要电泳图谱上出现条带即为真品。由于鉴别 PCR 所用的是高特异性 PCR 引物,扩增反应的复性温度高、特异性强,一般 DNA 的污染不会影响鉴定结果,对实验操作的要求也不如 RAPD 苛刻,所以这种鉴别技术较易掌握,具有很大的实用价值。此方法可克服其它 DNA 分子标记鉴别技术进行药材鉴定时存在的成本高、重现性不好、程序繁琐等问题,使 DNA 分子标记鉴别技术推广应用于药材鉴别成为可能。

生物的遗传信息不随个体的发育阶段的变化而变化,同一个体的不同组织器官都具有相同的遗传信息。生物种属特异性的遗传信息也不会因新鲜活体或干枯样本而发生生物差异。本文介绍的鉴定方法就是基于生物种属特异性和遗传稳定性而设计出精确识别铁皮石斛与其他石斛的方法。

[参考文献]

[1] 唐振缙,程式君. 广东石斛属(兰科)的研究. 中国科学院华南植物研究所集刊. 第二集. 1986. 7.
[2] 李满飞,徐国钧,吉占和. 广西产石斛属植物两新种. 中国药科大学学报,1989,20(2):67.
[3] 王天山,陆跃鸣. 鼓槌石斛中化学成分对 K562 肿瘤细胞株生长抑制作用体外试验. 天然产物研究与开发,1997,9(2):1.

[4] 马雪梅,李满飞. 云南石仙桃及石斛总生物碱和多糖含量的分析. 中草药,1997,28(9):561.
[5] 李满飞,徐国钧,徐珞珊,等. 商品石斛的调查及鉴定(). 中草药,1991,22(4):173.
[6] 刘学平,汤明辉,戴涌,等. 中药石斛类粉末的显微鉴定研究. 中国药科大学学报,1992,23(3):148.
[7] 马国祥,徐国钧,徐珞珊,等. 商品石斛的调查及鉴定(). 中草药,1995,26(7):370.
[8] 马国祥,徐国钧,徐珞珊,等. 中药石斛显微鉴定研究. 中国药科大学学报,1995,26(3):134.
[9] Cheung K S, Kwan H S, But P P H, et al. Pharmacognostical Identification of American and Oriental Ginseng Roots by Genomic Fingerprinting Using Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction (AP-PCR). J Ethnopharmacol, 1994,42:67.
[10] 陈林姣,赖小平. RAPD 技术在溪黄草类原植物鉴别中的应用. 中国中药杂志,1998,23(6):328.
[11] Ozeki Y, Wake H, Yoshimatsu K, et al. A Rapid Method for Genomic DNA Preparation from Dried Materials of Genus Panax for RCR Analysis. Natural Medicines, 1996,50(1):24.
[12] 黄璐琦,王敏,周长征,等. RAPD 方法在药材鉴定研究中的问题及其对策. 药学报,1998,33(10):778.
[13] Yang X, Quiros C. Identification and Classification of Celery Cultivars with RAPD Markers. Theor Appl Genet, 1993,86:205.
[14] 唐启义,冯明光. 实用统计分析及计算机处理平台. 北京:中国农业出版社,1997. 174.
[15] 顾其华,李玲芝,舒畅,等. 用普通琼脂糖代替低熔点胶回收 DNA 片段. 遗传,2000,22(2):103.
[16] 吉占和. 中国石斛属的初步研究. 植物分类学报,1980,18(4):427.
[17] 汪小全,邹喻苹,张大明,等. 银杉遗传多样性的 RAPD 分析. 中国科学(C 辑),1996,(26):436.
[18] 裴颜龙,邵喻苹,尹秦,等. 矮牡丹和紫斑牡丹 RAPD 分析初报. 植物分类学报,1995,33(4):350.

[19] 梁红健, 刘敏, 钟志宇, 等. 中国部分兰花品种 RAPD 分析. 园艺学报, 1996, 23(4): 365.

[20] 冯丽春, 杨光伟, 余茂德, 等. 利用 RAPD 对桑属植物种间亲缘关系的研究. 中国农业科学, 1997, 30(1): 52.

Cluster Analysis of *Dendrobium* by RAPD and Design of Specific Primer for *Dendrobium candidum*

ZHANG Ming¹, HUANG Hua-rong¹, LIAO Su-mei¹, GAO Jiang-yun²

(1. College of Life Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310012, Zhejiang, China;

2. Xishuangbanna Tropical Botanical Garden, CAS, Kunming 650223, Yunnan, China)

[Abstract] Objective : To analyze the genetic relationship of *Dendrobium* and design a specific primer to differentiate *Dendrobium candidum* effectively. **Method :** Random amplified polymorphic DNA (RAPD) technique was used to analyze the genetic relationships of 26 species of *Dendrobium* and one species of *Ephemerantha*. Dendrogram was constructed by UPGMA. According to the sequence of DNA fragment selected, Sangon 18 primer had been extended from 3' extreme to 20 bp in order to form a specific primer. **Result and Conclusion :** This primer can be used to distinguish *Dendrobium candidum* from other *Dendrobium* effectively. Such a technique provides a new way for the identification of Chinese traditional medicines.

[Key words] *Dendrobium*; *Dendrobium candidum*; RAPD; specific primer

[责任编辑 袁桂京]

高效液相法测定八角属部分植物果实中莽草酸的含量

王晓强, 郭亚健, 杨春澍

(北京中医药大学 中药学院, 北京 100029)

[摘要] 目的:建立莽草酸含量测定方法。方法:采用 NH₂ 键合相硅胶柱, 乙腈-2% H₃PO₄ (95:5) 为移动相, 检测波长 213 nm, HPLC 法。结果:平均回收率为 98.5%, RSD 为 1.67% (n=5)。结论:适用于含莽草酸药材及制剂的质量控制。

[关键词] 二极管阵列高效液相色谱法; 莽草酸; 八角属

[中图分类号] R 284.1 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1001-5302(2001)07-0447-03

八角茴香和地枫皮为《中国药典》2000 年版收载的品种, 我国为八角属植物的主要分布区^[1]。八

角属植物果实普遍含有莽草酸, 为莽草酸的丰富资源之一。现代药理学研究证明, 莽草酸具有较强的镇痛和抑制血小板聚集作用^[2~4], 但其高效液相色谱含量测定方法未见文献报道。本文建立八角属植物果实中莽草酸的高效液相含量测定方法, 测定了

[收稿日期] 2000-07-18

[基金项目] 国家科委课题 (96-901-01-35)