基于 DNA 水平的中国药用植物分子鉴定方法

毛帅,刘朝奇,向婷婷,袁丁*
(湖北三峡大学化生学院天然产物国家重点实验室,宜昌 443002)

[摘要] 通过对近年来国内外基于 DNA 水平分子鉴定方法研究的文献回顾,作者整理了几种经典的基于 DNA 水平的中药分子鉴定方法,包括 RFLP,DNA microarray,RAPD,CAPS,ISSR,SSR 等。随着分子生物学的迅速发展,DNA 分子标记技术日趋成熟,该领域出现了诸多分子标记技术,并且已经能够很好的应用到中药基源鉴定中。最近兴起的 DNA barcoding 和 DNA chip 技术在 DNA 分子标记领域亦显示出了极大的优越性和潜力,结合即将出现的新的分子生物学分析方法笔者做了相应的阐述。任何一种药材的鉴定方法都存在局限性,重要的是要充分了解和应用其优势,从而合理和有效地对现有方法进行补充和改进,随着生物分子领域的迅速发展,有理由相信 DNA 分子鉴定方法值得进一步的研究和开发。

[关键词] 分子标记; DNA; 中药鉴定; 分子生物学
[中图分类号] R282 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2014)05-0238-05
[doi] 10.11653/syfj2014050238

DNA-based Authentication of TCM by Molecular Biological Techniques

*MAO Shuai, LIU Zhao-qi, XIANG Ting-ting, YUAN Ding**
(*Hubei Key Laboratory of Natural Products Research and Development, China Three Gorges University, Yichang* 443002, *China*)

[**Abstract**] Recently, molecular biotechnology has provided sophisticated molecular techniques for authentication of botanical materials at the DNA level and DNA technology provides a powerful tool to complement chemical analyses for authentication of Chinese medicinal plants and to ensure that herbal materials are not

[收稿日期] 20130805(005)
[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(30873383;31070314)
[第一作者] 毛帅,硕士研究生,从事鄂西中药材研究与开发,Tel:15071726179,E-mail:947161858@qq.cm
[通讯作者] *袁丁,博士,教授,从事中药药理研究,Tel:15572799866,E-mail:yxyyd@ctgu.edu.cn

[26] 秦素红,章津铭,何宇新,等.基于化学组分动态变化的附子配伍甘草煎煮条件研究[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(24):20.
[27] 陈建萍,谭炳炎,吴伟康,等.四逆汤中附子甘草配伍规律研究[J].中国实验方剂学杂志,2001,7(3):16.
[28] 沈红,朱玲英,姚楠,等.甘草与附子配伍对乌头碱、新乌头碱、次乌头碱大鼠药动学的影响[J].中药材,2011,34(6):937.
[29] 张锦楠,李亚伟,徐艳霞,等.甘草和五味子对大鼠肝微粒体 CYP450 诱导作用的研究[J].中国药学杂志,2002,37(6):424.
[30] 潘英伟,袁冬平,陈卫平,等.以 HPLC 法测定附子甘草配伍对丙咪嗪血药浓度的影响[J].辽宁中医杂志,2009,36(1):102.
[31] 杨明,刘小彬,黄庆德.附子甘草配伍减毒增效机理探析[J].时珍国医国药,2003,14(4):197.
[32] 越皓,皮子凤,宋凤瑞,等.附子不同配伍药对中生物碱成分的电喷雾质谱分析[J].药学学报,2007,42(2):201.
[33] 韩天娇,宋凤瑞,刘忠英,等.附子配伍过程中二萜类生物碱在 Caco-2 小肠吸收细胞模型中吸收转运的 UPLC/MS 研究[J].化学学报,2011,69(15):1795.
[34] 展海霞,彭成.附子与干姜配伍对心衰大鼠血流动力学的影响[J].中药药理与临床,2006,22(1):42.
[35] 向云亚.蒋苏贞,黄兆胜.姜酚对小鼠肝药酶活性的影响[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(20):208.

[责任编辑 邹晓翠]

contaminated with ineffective or potentially harmful substitutes or adulterants. this review provides an account of commonly used DNA-based technologies [ex: RFLP, AFLP, ISSR, SSR, CPS, RAPD] for TCM plants. Recent achievements in the field of DNA barcoding and DNA chip technology that offer great potentials for detecting of DNA and emerging new developments for future identification of species are briefly outlined.

[**Key words**] molecular marker; DNA; TCM authentication; molecular biology

植物的物种多样性极其丰富,就维管植物来说在中国有近 31 500 个种,占世界该类植物物种的 1/8,有超过 5 000 个种被当做药用植物应用于临床治疗[1]。传统中药已经有近千年的历史,在西方国家乃至世界范围内,对中药的认识和使用程度也越来越广泛。中药贸易已经成为我国经济发展不可或缺的一部分[2]。所以对中草药的准确鉴别是保证药物品质与治疗效果的先决条件。

在实际运用中,植物药主要针对其组织形态和化学成分进行鉴定分析。药典[3]规定了基于组织形态学(主要靠肉眼观察和显微观察)和化学成分分析(主要有 TLC,HPLC 和 GC-指纹图谱)的鉴定方法,对生药和炮制饮片实现了一定程度的质量控制。然而受生长周期、贮存条件、炮制方法和生长环境等多方面的影响,同一药材的化学成分含量会有明显变化,形态学鉴定又需要较高的专业技能和操作经验,加上植物药存在较多的近缘种,肉眼与显微观察难以对其进行精确的区分[4]。所以仅靠形态特征和化学特征的分析已经不足以对某些植物药材进行准确的鉴定。

随着分子生物学与植物基因学的发展,基因工具被认为在 DNA 分子水平上可以为中草药提供可靠的鉴别方法。DNA 分子是一种相当稳定的生物大分子,它不受物种外界因素的影响,它可以从新鲜样本,干燥样本甚至泡制过的材料中提取得到。它也不受样本组织部位的影响,我们可以从样本任何组织部位提取到 DNA 加以分析,并且需要的量很小。基于此,多种 DNA 分子标记技术被运用到多个领域,尤其在药用植物的鉴别方面,取得了显著的效果[5-6]。

DNA 分子鉴定主要可分为基于 DNA 杂交的分子标记技术,依赖于 PCR 的分子标记技术和基于核酸序列分析的 DNA 分子技术。除去较为主流的以上 3 类 DNA 分子鉴定技术外,在物种系统发育研究及分类方面,MLSA(multilocus sequenceanalysis)[7]多基因位点分析技术显示出了极大的潜力,同时可以进行高通量分型的 DNA microarray (DNA 微阵列)技术也因其极高的敏感度和准确率而作为新的分子技术发展起来[8]。

本文将介绍多种常用的 DNA 分子标记技术,这些技术的优劣将由其自身的辨别度、准确度、重复性以及成本等决定。

1 基于 DNA 杂交的分子标记技术

1.1 RFLP(restriction fragment length polymorphism)分子标记 单链 DNA 分子在合适的条件下会遵循碱基配对原则形成双链脱氧核糖核酸分子,这个过程称为 DNA 分子杂交。基于以上原理,RFLP(限制性片段长度多态性)分子标记法通过将人工 DNA 探针与基因组酶切分子片段进行杂交,得到杂合 DNA 条带,从而获得含同源序列的酶切片段在长度上的差异[9]。

首先,基因组 DNA 用一个或两个限制性内切酶酶切,得到的酶切片段经琼脂糖凝胶电泳加以分离,然后通过 southern blotting 转移至固体支持物上(尼龙膜或硝酸纤维素滤膜),再用经过同位素或显色剂标记的 DNA 探针与这些片段在膜上进行 DNA-DNA 杂交,显示出的图谱就可以反映出基因组 DNA 碱基序列组成是否存在差异。这一技术的基础是通过限制性核酸内切酶酶切片段长度多态性来揭示 DNA 碱基序列组成的异同,这种 DNA 分子水平上的差异,可能是由于内切酶识别序列的改变,也可能涉及到部分片段的缺失、插入、易位和倒位等。

RFLP 标记可以检测出较多的多态性,并能对多态性产生的原因加以分析,重复性高。该技术还可以同时分析多个样本,杂交产生的 DNA 印记也可以剥离下来,再采用不同的探针进行更多的研究分析。但 RFLP 标记也因其需要进行不同内切酶设计,探针制备和 southern 杂交而耗时耗力,成本高昂,对提取到的 DNA 数量和质量要求也较高。这在一定程度上限制了 RFLP 技术的推广。

1.2 DNA microarray(DNA 微阵列) 尽管 DNA 微阵列技术涉及到对样品进行 PCR 和 DNA 测序,但严格来说,该技术还是是基于 Southern 杂交或斑点杂交技术原理发展而来的。该方法通过在固体表面(玻璃片或尼龙膜)固定大量已知序列的特异性 DNA(DNA 芯片),将该 DNA 作为探针与样品扩增

后的 DNA 进行杂交,通过杂交与否而获得 DNA 序列的变异信息[10]。

DNA 微阵列技术快速,准确,信息扫描量大,但其芯片制作繁琐,扫描技术复杂,仪器价格昂贵,所以阻碍了该技术现阶段的普及,但作为高通量分型的新一代分子标记技术,DNA 微阵列依然有极大的发展潜力,该方法已用于中药的鉴定[11]。

2 基于 PCR 的分子标记法

基于 PCR 技术的分子标记法可以通过特异性或任意性引物,在热稳定 DNA 聚合酶下实现对目的 DNA 的扩增,其优势在于只需要极少量的 DNA 模板就可以在短时间内扩增出大量的标记分子片段,进而分析多态性。根据扩增时使用的引物不同,PCR 法又可分为任意引物扩增技术(如 AP-PCR,DAF,RAPD,AFLP,ISSR)和特异性引物扩增技术(如 CAPS,SSR,SCAR,STS)。前者可实现对未知序列的分析,后者需针对模板 DNA 序列设计特异性引物。

2.1 RAPD(Random amplified polymorphic DNA)

随机扩增多态性 DNA,该技术通过低严谨聚合酶链式反应(退火温度在 45 ℃左右),用一寡聚核酸单链随机引物(长度一般为 9-10bp)在短时间内扩增出大量的 DNA 片段,扩增产物由琼脂糖凝胶电泳分离,EB 染色后呈现扩增 DNA 条带信息。通过分析随机引物识别位点的有无或识别位点之间被扩增区域的长度来分析样本 DNA 的基因差异信息。

RAPD 标记主要缺点是其显性本质及较低的等位基因数量,90% 以上的 RAPD 标记是显性遗传的[12],对于异交植物来说,试图从一条带的存在来区分位点的杂合性和纯合性,是不可能的。所以为了验证样本的杂合性,RAPD 结束后,往往需要其他的实验补充验证。又由于琼脂糖凝胶电泳是根据相对分子质量大小来分离片段的,不能分离核苷酸序列有差异但长度相同的片段,所以 RAPD 存在共迁移现象,同时 RAPD 也因其自身扩增时的低严谨性,使得结果重复性不高。尽管如此,RAPD 技术也因其低廉的成本,高检出率,同时不需要设计特异性引物,无须做 southern 印记等繁琐步骤等优点,而在中药材鉴定领域得到了越来越广泛的应用[13]。

基于 RAPD 分子技术的成熟,同时为了弥补 RAPD 在分子鉴定中的不足,科研工作者相继建立了基于 RAPD 原理的分子标记技术,AP-PCR(arbitrary polymerase chain reaction)和 DAF(DNA amplify fingerprinting),这两种技术的出现,弥补了 RAPD 技术对某些样品多态性检测不足的缺陷。由 RAPD、AP-PCR、DAF 一起组成的多态性分析方法统称任意扩增多带谱,但应用最广的还是 RAPD 标记。

2.2 AFLP(amplified fragment length polymorphism)

扩增片段长度多态性,该技术是建立在 PCR 技术和 RFLP 标记技术基础上的,通过限制性内切酶片段的不同长度检测 DNA 多态性的一种 DNA 指纹分析技术。由于它具有重要的实用价值,所以在 1992 年刚出现,就被 Key gene 公司以专利形式买下。

区别于以上几类以任意引物扩增的分子标记,AFLP 为特异性扩增[14]。其原理是基于对植物基因组的双酶切(如 EcoRI;MseI),再经 PCR 扩增后选择限制片段。由于不同物种其基因组 DNA 的大小不同,基因组 DNA 经限制性内切酶酶切后产生的片段相对分子量大小不同。使用特定的双链接头与酶切 DNA 片段链接作为扩增反应的模板,用含有选择性碱基的引物对模板 DNA 进行扩增,选择性碱基的种类、数目和顺序决定了扩增片段的特殊性。所以,只有那些限制性位点侧翼的核苷酸与引物的选择性碱基相匹配的限制性片段才可以被扩增。

AFLP 分子标记方法可靠,结果稳定,可同时对分布于基因组的多个位点进行多态性扫描,对模板浓度的变化不敏感,该方法可以揭示种间甚至种内的多态性差异。然而方法中对 DNA 的酶切和降解可能导致假阳性结果的出现。AFLP 已作为较成熟的标记技术用于中药材的鉴定[15-16]。

在 AFLP 技术的基础上,衍生出了大量高效,精确的分子标记技术。如 SADF-AFLP(单限制性酶切 AFLP),SD-AFLP(二次消化 AFLP),TE-AFLP(三限制性酶切 AFLP),Substracted AFLP(差减 AFLP),Microsatellite AFLP(微卫星 AFLP)以及 cDNA AFLP 等,这些联合技术的出现极大的推进了 AFLP 技术的进一步完善。

此外,基于简单 PCR 扩增发展起来的指纹技术还有 ISSR(inter simple sequence repeat),DALP(direct amplification of length polymorphism),SRAP(sequence related amplified polymorphism),TRAP(target region amplified polymorphism)等,这些技术的区别点,主要是引物设计的原理不同。

3 基于 DNA 序列分析的分子标记法

DNA 测序技术在物种分类、系统发生学、群体遗分析以及物种进化研究领域,是一项不可或缺的分子鉴定手段[17]。核酸序列是遗传信息的最基本载体,DNA 序列能够最直接的反应遗传特征;理论

上来说能够利用的 DNA 序列信息是巨大的,能够提供用于鉴别的变异信息的数量也是巨大的;随着测序技术的迅猛发展,测序的速度加快和价格大幅度下降,利用直接测序的方法可以快速获得大量的序列信息,具有很高的重复性[18]。

目前,核基因组、叶绿体基因组和线粒体基因组的序列均可以用于 DNA 鉴定,使用较多的是间隔区序列,内含子序列和叶绿体的部分功能基因序列。在植物药材鉴定中使用最多的是基因组的 ITS(ITS2)序列,叶绿体基因组中使用较多的序列有 psbA-trnII,tmL-F,matK,rbcI 等序列,此外核基因组 5S rDNA 间隔区及 18S rRNA 基因、叶绿体基因组的 chlB 基因序列及 tmK 基因序列等也有报道[19-20]。

3.1 DNA barcoding(DNA 条形码) 该技术利用相对通用的、有足够变异的、易扩增且相对较短的 DNA 片段来创建一种新的生物身份识别系统,进行物种的快速鉴定。自 2003 年被加拿大科学家 Hebert 提出后,DNA 条形码已成为生物学领域发展最迅速的前沿学科之一[21]。该技术具体方法为,利用通用引物对所研究物种的多个 DNA 序列进行扩增和测序,通过比较分析挑选出合适的 DNA 条形码序列,并构建 DNA 序列条形码数据库,再通过特定软件进行生物信息学分析,从而实现物种的鉴定[22]。常用的分析方法有 BLAST、最近遗传距离法(nearest genetic distance)及系统进化关系分析等。和其他鉴定技术相比,DNA 条形码序列具有通用性,在不同物种之间从方法到结果均具有可比性,数据可以集成为全球物种鉴定的统一数据库和鉴定标准。

DNA 条形码技术尚处在初级发展阶段,该技术在植物物种鉴定中推广还受到一些限制。如在较大范围内通用的条形码序列还未确定,条形码技术需要具有海量 DNA 信息的数据库,基于数据库的基础上才有可能对生物体进行检测和鉴定,但数据库还远不够完善。目前从实用性角度而言,其结果分析方式和显示方式仍过于复杂,不够直观,成本也较高,所以 DNA 条形码想在中药鉴定领域大范围推广尚有难度[23]。

3.2 SCAR(sequence characterized amplified region)标记 序列特征化扩增区域,该技术通过对目的 RAPD 或 ISSR 片段的克隆和测序,设计一对互补于原来 RAPD 片段两端序列的 24 聚体的引物,扩增原来的模板 DNA,产生单位点的 SCAR DNA 片段,通过直接染色或电泳分离检测片段的多态性。该方法产生的指纹可与 RFLP 图谱进行比较研究或种间同源性分析,可以将显性 RAPD 标记转化为共显性的 SCAR 标记,如果是显性标记,则在检测中可以直接染色,而不需要进行电泳检测。该方法使用较长的引物和高退火温度,因此可靠性高,重复性好,对反应条件不敏感,可以揭示的信息量更大。该技术在植物材料的基因鉴定中已得到重要应用[24-25]。

除此之外,基于 DNA 序列测定的分子标记技术还有 SAMPL(selective amplification of microsatellite polymorphic loci),DAMD(directed amplification of minisatellite-region DNA),ARMS(amplification refractory mutation system)等诸多技术,尽管这些技术测序过程繁琐,操作复杂,成本相对高昂,但在一定程度上基于序列测定的分子技术极大的弥补了分子鉴定领域的不足。

4 总结与展望

按时间顺序,基于 DNA 水平的生物学鉴定方法经历了以 RFLP 为主的第一代分子标记技术,以 RAPD 为主的第二代分子标记技术以及以核酸序列分析为主的第三代分子标记技术,每个时代的分子标记法都各有其自身的特点[26]。但总的来说,DNA 分子鉴定存在无法区分不同部位的尴尬缺陷。如某种药材的药用部位为根部,若药材中掺杂了茎叶等其他部位,靠 DNA 标记是无法准确鉴定的。很多 DNA 分子标记法都比较复杂耗时,如引物、探针、序列的克隆测序等,所以对实验室的硬件条件及人员素质要求也较高。

随着 minisequencing、纳米级 DNA sequencing,微形态悬浮点阵测量技术等新一批高自动性,高特异性 DNA 分析技术的出现,DNA 分子标记将迎来新的时代。纳米探针可极大的提高 DNA 分子鉴定的可靠性,同时与阵列引物扩增反应(APEX)联合应用可在一次复杂反应中同时检测出基因组上百乃至上千个多态性[27]。除此之外,适用于高通量分析检测的寡核苷酸链接测定技术(OLA)还能够在高多态性基因分析中对等位基因进行高精确的区分[28]。

以上这些新兴技术在将来的物种分类,基因形态分析中都具有极大的应用潜力。任何一种药材的鉴定方法都存在局限性,重要的是要充分了解和应用其优势,从而合理和有效地对现有方法进行补充和改进,随着生物分子领域的迅速发展,有理由相信 DNA 分子鉴定方法值得进一步的研究和开发。

[参考文献]

[1] Jordi López-Pujol, Fu-MinZhang, Song Ge. Plant biodiversityin China: Richly varied, endangered, and in needof conservation [J]. Biod Conserv, 2006, 15(12):3983.

[2] World Health Organization Traditional Medicine. Fact Sheet N134 [C]. Geneva: World Health Organization, 2008.

[3] 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,2010:1.

[4] 迟莹,周琳,张丽华,等. 柴胡及其常见伪品的 DNA 指纹鉴定[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(15):143.

[5] 袁庆军,张文婧,姜丹,等. 论中药分子鉴定的方法和原则[J]. 植物分类与资源学报,2012,34(6):607.

[6] WU L, Wang C. Application of molecular marker assisted slelection in gene pyramiding and selection of new cultivars [J]. J Northeast Agr Uni, 2011, 18(6):79.

[7] Leclerque A, Kleespies R G, Schuster C, et al. Multilocus sequence analysis (MLSA) of 'Rickettsiella costelytrae' and 'Rickettsiella pyronotae' intracelluar bactrial entomopathogens from New Zealand[J]. J Appl Microbiol, 2012, 113(5):1228.

[8] Trau Dieter, Lee Thomas M H, Lao Alex I K, et al. Genotyping on a complementary metal oxide semiconductor silicon polymerase chain reaction chip with integrated DNA microarray [J]. Analytical chemistry, 2002, 74 (13):3168.

[9] Sharafi H, Pouryasin A, Alavian Sm, et al. Development and validation of a simple, rapid and inexpensive PCR-RFLP method for genotyping of common IL28B polymorphisms: A useful pharmacogenetic tool for prediction of hepatitis C treatment response [J]. Hepatitis Monthly, 2012, 12(3):190.

[10] 刘思言,沈铖武,王丕武. 基因芯片技术在植物中的应用研究进展[J]. 广东农业科学,2013,08(2):136.

[11] Carles M, Cheung M K L, Mogan ti S. A DNA microarray for the authentication of toxic traditional Chinese medicinal plants [J]. Planta Planta medica, 2005, 71(6):580.

[12] Chester K, Tamboli E T, Parveen R, et al. Genetic and metabolic diversity in Stevia rebaudiana using RAPD and HPTLC analysis[J]. Pharm Biol, 2013, 51(6):771.

[13] 吴玉泓,吴迪,崔治家,等. 不同产地秦艽的质量和遗传多样性研究[J]. 中药材,2011,34(14):517.

[14] 李珊,赵桂仿. AFLP 分子标记及其应用[J]. 西北植物学报,2003,23(5):830.

[15] Hong ZHOU, J in LIAO, Yi-ping XIA, et al. Determination of genetic relationship between evergreen azalea cultivars in China using AFLP markers[J]. J Zhejiang University-SCIENCE B, 2013, 14(4):299.

[16] 关萍,石建明,陈放. 不同分布区天麻的 AFLP 分析[J]. 植物遗传资源学报,2013,14(1):71.

[17] 占爱瑶,罗培高. DNA 测序技术概述[J]. 生物技术通讯,2011,22(4):584.

[18] 崔占虎,李辉,袁庆军,等. 基于 DNA 条形码技术鉴别 4 种龙胆科"地格达"类蒙药基原植物[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(10):72.

[19] Guo Y H, Tsuruga A, Yam aguchi S, et al. Sequence analysis of chloroplast chlB gene of medicinal *Ephedra* species and application to authentication of *Ephedra herb* [J]. Biol Pham Bull, 2006, 29(6):1207.

[20] Sasaki Y, FushimiH, Cao H, et al. Sequence analysis of Chinese and Japanese Curcuma drugs on the 18S rRNA gene and tmK gene and the application refractory mutation system analysis for their authentication[J]. Biol Pham Bull, 2002, 25(12):1593.

[21] 陈士林,庞晓慧,姚辉,等. 中药 DNA 条形码鉴定体系及研究方向[J]. 世界科学技术——中医药现代化,2011,13(5):747.

[22] 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.

[23] 王川易,郭宝林,肖培根. 中药分子鉴定方法评述[J]. 中国中药杂志,2011,36(3):237.

[24] Marieschi M, Torelli A, Bruni R. Quality control of saffron: development of SCAR markers for the detection of plant adulterants used as bulking agents[J]. J Agric Food Chem, 2012, 60(44):998.

[25] Usha Kiran, Salim Khan, Khanda Jabeen Mirza, et al. SCAR markers: A potential tool for authentication of herbal drugs[J]. Fitoterapia, 2010, 81(8):969.

[26] 黄璐琦,肖培根,郭兰萍,等. 分子生药学:一门新兴的边缘学科[J]. 中国科学 C 辑:生命科学,2009,39(12):1101.

[27] Tavanti, Landi S, Senesi S. APEX DNA microarray for the identification of pathogenic fungi[J]. Methods Mol Biol, 2013, 968:63.

[28] Kurg A, TõnissonN, Georgiou I, Shumaker J, et al. Arrayed primer extension: solid-phase four-color DNA resequencing and mutation detection technology [J]. Genet Testing, 2000, 4(1):1.

[责任编辑　邹晓翠]