

几种分子标记技术的比较及其在中药材鉴定中的应用*

杨宁¹ 白雪¹ 刘效瑞² 刘建丽¹ 李盼盼¹ 李巧峡¹ 文蕾¹

(1 西北师范大学生命科学院 甘肃兰州 730070 2 定西市旱作农业科研推广中心 甘肃定西 743000)

摘要 分子标记技术是指能够反映生物个体或种群之间基因组中某种差异的特异性片段,是 DNA 水平上遗传多态性的反映,大多数 DNA 分子标记是以电泳谱带的形式表现个体之间的 DNA 差异。对几种分子标记技术进行了比较,并就其在中药材鉴定方面的应用以及意义做以综述。

关键词 分子标记 中药材 鉴定

中国图书分类号:Q946;Q255 文献标示码:A

我国中药材资源丰富,药用动植物达1万多种,是中药材的主产国,对中药材的研究有几千年的历史。中药材的品质关系到临床用药的安全有效,发展道地药材是实现中药现代化的关键,然而道地药材与非道地药材在形态和生药性状等特征上的差别并不明显,给应用传统方法鉴别道地药材带来了极大的困难,要实现中药现代化,保证用药的安全性和有效性,寻求准确、便捷的中药材鉴别方法成为当务之急。

分子标记技术是指能够反映生物个体或种群之间基因组中某种差异的特异性片段,是 DNA 水平上遗传多态性的反映,大多数 DNA 分子标记是以电泳谱带的形式表现个体之间的 DNA 差异。分子标记技术以其准确性高、重复性好等特点在农作物种属鉴定、遗传多态性等方面广泛应用,但其中在中药研究中的应用仍十分有限,本文介绍了随机扩增多态性 DNA (RAPD),限制性片段长度多态性 (RFLP),扩增长度片段多态性 (AFLP),相关序列扩增多态性 (SRAP),微卫星 DNA (SSR) 等多种分子标记技术并进行了比较,而且就其在中药材鉴定中的应用以及意义做以综述,以期分子标记技术在中药研究中的应用提供部分资料支持。

1 几种分子标记技术

1.1 RAPD(random amplified polymorphism DNA)

RAPD 即随机扩增多态性 DNA,是 1990 年由 Williams 和 Welsh 发展起来的一项分子标记技术。它是人工合成的随机寡聚核苷酸序列为引物,以

基因组总 DNA 为模板,利用 PCR 技术随机扩增得到一系列的多态性 DNA 片段,通过凝胶电泳将长短不同的 DNA 片段分开,溴化乙锭染色后在紫外灯下观察扩增产物的多态性。因为在 RAPD 中筛选出的引物都各不相同,所以每一个引物在基因组 DNA 序列中都有其特定的结合位点,如果与其结合的位点发生突变等,就可能引物的结合位点在基因组中的分布发生变化,那么扩增出的产物就相应地会发生变化,从而表现出多态性。

该技术操作简便快速,省时省力, DNA 用量少,同时无需设计特定的引物,扩增产物具有丰富的多态性,如果使用一系列随机引物(20~40个),其检测区域可扩大到整个基因组,能反映整个基因组的变化,所以该技术被广泛应用于遗传多样性、种群遗传、数量遗传和特定基因的标记和定位等许多领域。汪小全^[1]等用随机扩增多态性 DNA (RAPD) 标记方法对来自湖南和四川的 75 个银杉个体进行了遗传多样性的检测。由于 RAPD 分子标记一般表现为显性遗传,其 PCR 易受到实验条件的影响,对反应条件要求很严格,并且 RAPD 的稳定性与重复性较差,不太令人满意,反应中的诸多因素都对扩增结果有一定的影响,为了得到较稳定的结果,各种反应参数,例如温度、Mg²⁺、dNTP、引物、模板 DNA、TaqDNA 聚合酶的浓度都必须事先进行优化,以得到令人满意的结果。2005 年盛丽^[2]等进行了当归 RAPD 反应条件的优化,确定了 7 个试验因子的最适条件。有时可将

* 基金项目:甘肃省自然科学基金项目(0803RJZA038);甘肃省农牧厅项目(GYC09-10);西北师范大学科技与创新基金(NWNU-KJCXGC-03-58,NWNU-KJCXGC-03-49);西北师范大学学生科研资助金项目

RAPD转化为 SCAR(sequence characterized amplified region) 标记, SCAR 通常为显性标记, 通过转化可以增加 RAPD 的稳定性和信息量。因此, RAPD 技术是一种需要不断完善、不断发展的分子标记技术。

1.2 RFLP(restriction fragment length polymorphism) RFLP 即限制性片段长度多态性, 1980 年 Botstein 等首先提出利用 RFLP 作为标记构建遗传图谱。RFLP 是以 Southern 杂交为核心, 应用最早的分子标记技术之一。其原理为: 碱基的改变与染色体结构的变化导致生物个体或种群之间 DNA 片段酶切位点的变化, 用限制性内切酶切割 DNA, 将产生长短、种类、数目不同的限制性片段, 这些片段经聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后就会呈现出不同的带状分布, 而具有较大差异的 DNA 片段就可通过 Southern 杂交检测出来。

RFLP 呈共显性遗传, 可靠性高, 不受环境、发育阶段或植物器官的影响; RFLP 数量大, 在 DNA 病毒和高等真核生物中普遍存在; 标记结果稳定可靠, 重复性好, 同时 RFLP 通常可检测到 1~4 个基因座位数。但是该技术所需 DNA 样品的量较大, 灵敏度不高、费时、费力、周期长, 这在很大程度上限制了 RFLP 技术的应用。

RFLP 和 RAPD 都是人们常用的 2 种分子标记技术, 但它们各有优缺点, 现将二者比较如下:

RAPD 相对 RFLP 有一些缺点: 1) RAPD 技术实验的稳定性和重复性差; 2) 凝胶电泳只能分开不同长度的 DNA 片段, 而不能分开那些虽然长度相同但其中的碱基序列组成不同的片段。当然它的优点也很明显: 1) 操作简便, 快捷高效, 甚至因为单个碱基的变化也会使后果发生变化; 2) 所需 DNA 样品少, 这对分析珍稀物种的基因组非常有利; 3) 需要不多的引物即可, 一次实验中的引物可以对多个不同的基因组进行分析, 而在 RFLP 中, 若基因组很大, 引物数量有限, 会对结果造成影响; 4) RAPD 可以检测整个基因组, 反映整个基因组的变化。

1.3 AFLP(amplified fragment length polymorphism) AFLP 即扩增长度片段多态性, 于 1993 年由荷兰科学家 Zabeau 和 Vospieter 建立。其基本原理是用限制性内切酶对基因组 DNA 进行酶切, 形成不同的酶切片段, 将双链人工接头与基因组

DNA 酶切片段相连接后作为扩增的模板。AFLP 引物包括 3 部分: 5'端的与人工接头序列互补的核心序列(CORE)、限制性内切酶特控序列(ENZ)和 3'端带有选择性碱基的粘性末端(EXT)。其中 AFLP 接头的设计(包括核心序列和酶特控序列)是关键之处。接头与接头相邻的酶切片段的碱基序列是引物的结合位点。进行 AFLP 分析既可采用单酶切也可采用双酶切。为了使酶切片段大小分布均匀, 一般采用双酶切, 一种是切割位点可以识别 4 个碱基序列的内切酶(如 MseI), 一种是切割位点可以识别 6 个碱基序列的内切酶(如 EcoRI)。蔡丹英^[3]等用 AFLP 分子标记技术对甘肃中部梨(*Pyrus spp.*)种质资源的遗传多样性进行分析, 结果表明, 多态率高达 86%, 显示了甘肃中部梨资源丰富的遗传多样性。

AFLP 技术是在 RAPD 和 RFLP 技术基础上建立和发展起来的, 兼具 RAPD 与 RFLP 的优点, 即有 RFLP 的可靠性, 也有 RAPD 的灵敏性。AFLP 所需 DNA 量少, 很少的样品也可用来分析; 其可靠性好, 重复性高, 多态性高; AFLP 分析可以通过改变限制性内切酶和选择性的碱基种类与数目调节扩增的条带数, 具有较强的多肽分析能力; AFLP 分析不受环境、季节、时间的限制, 遗传性稳定, 易操作且样品适应性广, 聚类敏感, 定位专一。随着其技术的不断进步和完善, AFLP 分析的效率会进一步提高, 并在构建遗传图谱、种质鉴定、遗传多样性研究、基因定位、基因的克隆和序列分析中发挥重要的作用。尽管 AFLP 的诞生不过是 20 多年的时间, 但它却被认为是目前一种十分理想有效的分子标记, 它使分子标记技术又登上了另一个新台阶。

1.4 SRAP(sequence-related amplified polymorphism) SRAP 即相关序列扩增多态性, 也叫基于序列扩增多态性(sequence-base amplified polymorphism), 由美国加州大学蔬菜作物系 Li 与 Quiros 博士于 2001 年提出, 是一种新型的标记系统。其基本原理是通过设计的引物对 ORFS 进行扩增, 上游引物对外显子进行特异扩增, 下游引物对内含子区域、启动子区域进行特异扩增。因个体不同以及物种的内含子、启动子与间隔区长度不等而产生多态性。在该技术中, 引物的设计很关键, 上游引物一般长 17 bp, 5'端前 10 个碱基为“填充”

序列 (filler sequence), 无任何特异组成, 接着为 CCGG 序列, 该序列组成核心序列及 3' 端 3 个选择性碱基, 可对外显子进行特异性扩增; 下游引物长 18 bp, 5' 端前 11 个碱基为“填充”序列, 紧接着是 AATT。该序列组成核心序列即 3' 端 3 个选择性碱基, 可对内含子区域、启动子区域进行特异性扩增。

该标记具有简便、稳定、产率高、便于克隆目标片段等特点, 可用于种质资源的鉴定评价、遗传图谱构建、绘制基因组转录图谱、重要性状基因标记和比较基因组等各个方向, 今后 SRAP 技术将会在生命科学的研究中发挥越来越重要的作用。

1.5 SSR (single sequence repeats) SSR 即简单重复序列, 又叫微卫星 DNA。卫星是指以少数几个核苷酸 (一般 1~6 个) 为单位多次串联重复的 DNA 序列, 是 1974 年 Skinner 在研究寄居蟹的卫星 DNA 时发现的。微卫星广泛均匀地分布在基因组上, 其重复数和重复单位序列都是可变的, 故多态信息含量大。微卫星两侧区域的 DNA 序列较为保守和专一, 且重复基因数变化不一, 可与两侧保守的 DNA 序列相互补的方式设计特定的寡聚核苷酸引物进行 PCR 扩增, 扩增产物可用电泳进行分离。

SSR 标记是一种以 PCR 技术为基础的分子标记, 它具有稳定性好、位置确定、所需 DNA 用量少、一次性可检测到基因座位数可达几十个等优点。同时, 它同连锁群或染色体具有对应关系, 有助于图谱的连锁群或染色体的归并和不同连锁群的整合, 并能有效准确区分大量的等位基因, 因而可以区分同一物种不同基因型, 甚至亲缘关系非常近的材料。但是获得基因组 SSR 标记一般都需要建立和筛选基因组文库、克隆、测序等一系列操作。因此消耗人力、物力、成本较高, 这限制了 SSR 技术的应用。近年来, 随着公共数据库的发展, 一种新开发的 SSR 分子标记方法——EST (expressed sequence)–SSR 已成为研究热点, 这种利用公共数据库中 EST 序列开发的 SSR 标记具有成本低、方法简便等优点。

SSR 分子标记技术应用广泛, 它在建立 DNA 指纹、品种鉴定及种子纯度检测, 种质资源保存、评价和利用, 基因标记与作图, 系谱分析及标记辅助育种中发挥了重要作用。

2 分子标记技术在中药材鉴定中的应用

2.1 中药真伪鉴定 我国中药材品种来源复杂, 互混、互代现象时有发生。传统的鉴定中药的方法对于某些品种, 特别是经过多道工序加工后的药材无法准确鉴定。采用 RAPD 指纹分析技术既可以鉴定一般经典方法不能鉴定的药材, 又可以克服经典方法的局限性。除 RAPD 以外的其他分子标记技术也可以达到同样的效果。黄丰^[4]等对诃子 (*Folium Chebulae*) 及其混淆品进行 DNA 多态性比较, 有效地鉴别了诃子及其混淆品。罗恒^[5]等从 62 条引物中筛选出 4 条引物, 用于海风藤 (*Caulis Piperis Kadsurae*) 与其替代品的鉴别, 对于制品和原植物的鉴别都获得了成功。Shaw 等用 RAPD 方法对人参 (*Panax ginseng* C. A. Mey)、西洋参 (*Panax quiquefolium* L.)、三七 (*Panax pseudo-ginseng* Wall. var. japonicus) 及伪品进行鉴别, 根据扩增产物有效地鉴别了 3 种药材。

2.2 种的鉴别 种间的鉴别是关系中药材质量的一个因素。采用分子标记技术在部分中草药同科同属不同种或品种、亚种、变种之间的鉴别中取得了比较满意的结果。盛丽^[6]等用筛选出的 7 个随机引物对来自甘肃省不同产区的 20 个当归 (*Angelica sinensis*) 样品的基因组 DNA 进行了 RAPD 及其聚类分析, 共扩增出 82 个位点, 其中多态性位点 58 个, 占 70.7%。聚类分析表明 20 个当归样品可以聚为 5 类, 其结果与当归的地理分布比较吻合。赵庆芳^[7]等采用 RAPD 方法分析了来自 3 个百合 (*Lilium brownii* var. *viridulum*) 品系的 15 个栽培百合品种的遗传多样性和亲缘关系, 聚类分析表明: 来自 3 个品系的百合栽培品种在遗传关系上明显地聚为 3 类; 亚洲百合品系和东方百合品系的品种有较近的亲缘关系, 两者和铁炮百合品系的品种亲缘关系较远; 在同一品系内部, 相同花色的百合品种具有较近的亲缘关系。

2.3 药材的道地性分析 道地药材与非道地药材物种来源一致或十分相近, 在形态、生药性状及化学成分特征上具有高度相似性, 因而道地药材的鉴别很困难, 有很大的主观性, 严重影响了中药材进入国际市场。近年研究人员尝试用分子生物学技术重要手段的 DNA 分子标记遗传方法, 将从群居的分子水平上阐明药材地道性。高文远^[8]等以采用 RAPD 方法对甘肃岷县的当归 (*Angelica sinensis*) 基因组 DNA 进行分析发现, 在同一引物的 RAPD

指纹图谱中,不同供试样品的主谱带基本一致,次谱带间存在着不同程度的差异,说明不同地方当归居群的遗传背景相似且呈现丰富的多样性。

2.4 野生种与栽培品种的鉴别 生态环境的改变和人们生活生产活动的影响,使中药材遗传特性及其生药品质在一定程度上发生了变化。中药材产地和栽培对生药品质和药性产生巨大影响。在人类回归自然呼声日益高涨的今天,人们普遍认为野生种比栽培品种要好。同时,由于经济利益的驱使,以栽培品种冒充野生种的现象时有发生,给临床造成了一定的混乱。因野生种和栽培品种来自同一个物种,在植物性状、药材性状等方面难以区分。利用分子标记进行鉴别可以说是一种选择,但事实上用于中药材野生种与栽培品种的鉴别方面的报道很少。仅见张建清^[9]等从 DNA 分子水平上分析甘肃党参(*Radix Codonopsis Pilosulae*)主要栽培区的 9 个栽培居群和 4 个自然居群的遗传多样性和遗传关系。

2.5 植物遗传研究

2.5.1 遗传多样性分析及物种亲缘关系鉴定

研究物种的遗传多样性对于保护遗传学研究具有基础性的作用,为了合理有效地开展保护遗传学研究,首先了解保护物种的遗传多样性。分子标记能较好地地区分种内变异及亚种,周延清^[10]等用 RAPD 与 ISSR 技术对地黄 [*Rehmannia glutinosa* (Gaert.) Libosch. ex Fisch. et Mey.] 的 8 个品种和 2 个脱毒品系进行了种质遗传多样性研究。经过分析,10 个供试材料可以明显分为 2 个类群。杨佳^[11]等采用随即扩增多态性(AFLP)方法对华中特有单种属植物裸芸香(*P.sinense* Hemsl)的 8 个自然居群的遗传多样性进行了检测和分析。结果表明:裸芸香的遗传多样性较低,且居群内遗传多样性显著低于物种水平遗传多样性。彭锐^[12]等用 RAPD 技术分析了 15 种石斛(*Dendrobium*)药用植物,聚类分析表明,10 个引物能将 15 种石斛属植物有效地区分开,其中 4 个扩增出了特异带。已报道的用分子标记鉴定中药种质资源的遗传多样性的还有金银花(*Lonicera Japonica*)^[13]等。

2.5.2 构建植物遗传图谱 随着 RFLP 分子技术标记的应用,构建遗传图谱在许多物种中得到迅猛发展。利用分子标记构建遗传图谱的一般步骤是:选择适于作图的遗传标记;根据遗传材料间的

变型性,确定作图群体的基本组合并构建作图群体;作图群体中个体或品系标记基因型的确定;标记间连锁群的确定等。杨飞^[13]等进行了金银花(*Lonicera Japonica*)DNA 遗传图谱的构建,可以将 5 种供试材料清楚区分开,从而建立了 5 种金银花品系的 DNA 指纹图谱,为金银花品系的鉴定提供了分子生物学证据。已报道分子图谱的植物包括番茄(*Solanum lycopersicum*)、玉米(*Zea mays*)、水稻(*Oryza sativa*, *Oryza glaberrima*)、小麦(*Triticum aestivum* Linn.)、黄瓜(*Cucumis sativus* Linn.)及芸苔属(*Brassica juncea*)植物等,从 1990~1999 年关于芸苔属植物共有 26 张分子标记图谱发表。指纹图谱技术是保证中成药质量均匀稳定,实现中药现代化的关键。

2.5.3 比较基因组和遗传多样性的研究 比较基因组作图(comparative genome mapping)的基本思路就是利用共同的分子标记在相关物种中遗传或物理作用,比较这些标记在不同物种基因组中的分布情况,揭示染色体或染色体片段上同线性(synteny)和共线性(colinearity)的存在,从而对不同物种的基因结构及基因组进化历程进行分析。目前,中草药中利用比较基因组的方法来进行研究的很少,还未见相关报道。

2.5.4 分子标记辅助选择(molecular marker assisted selection MAS) 育种在很长的一段时间内,药用植物的生产长期处于自由发展的状态,良种选育工作处于起步阶段,品种混杂,质量差异较大。近几年来,药用植物的品种改良工作引起了越来越多专家的关注,随着分子生物学特别是药用植物遗传图谱研究资料的积累,一种全新的育种方法——基于分子连锁图与育种技术相结合的分 子标记辅助选择技术应运而生,并广泛应用于药用植物品种改良工作中。分子标记辅助选择是通过分析与目标基因紧密连锁的分子标记来判断目标基因是否存在。通过不同分子标记技术的分析可筛选出与目标基因性状紧密连锁的 DNA 片段,这样可以作为辅助育种的分子标记。该方法已在当归等药用植物中得到应用,在加强当归属植物传统育种的基础上,利用 RAPD、AFLP 等分子标记技术对其进行遗传多样性分析,构建其遗传图谱,并进行改良,从野生类型筛选优良目的基因,对其进行改良,得到了较好的效果,因此可以说,

利用分子标记辅助选择(MAS)育种是一个诱人的领域,将给传统的育种带来革命性的变化。

3 中药材分子标记技术的选择

选择何种分子标记要结合其优势和缺陷综合考虑,作为一个理想的分子标记技术,需要具备:1)具有较高的多态性;2)共显性遗传;3)能明确辨别等位基因;4)遍布整个基因组;5)除特殊位点的标记外,要求分子标记均匀分布于整个基因组;6)选择中性(无基因多效性);7)检测手段简单、易于观察和操作、快速;8)开发成本和使用成本尽量低廉;9)重复性较好。

在一个实验中,为了提高实验的质量,有时可同时应用2种或2种以上的分子标记技术进行联用或者比较筛选,以更好地全面确定实验分析结果。周延清^[10]等利用RAPD和TSSR分子标记很好地分析地黄的种质遗传多样性。张书芬^[14]等分析了RAPD、SSR和AFLP3种分子标记在研究油菜(*Brassica chinensis* L.)遗传多样性方面的应用效率问题,最后得出SSR和AFLP比RAPD有效。廖朝林等也系统的阐述了RAPD、ISSR和ITS等分子标记在当归属植物种质资源鉴定及遗传多样性研究中的应用进展。LaRosa R. 等用RAPD、AFLP和SSR3种分子标记技术构建了第1张橄榄(*Olea europaea*)的遗传图谱。因此在进行中药材分子标记时要根据具体情况研究对比,以确定最佳标记技术,在实际应用中取长补短,发挥作用。

4 展望

中药现代化推进了中药发展的新机遇,尽管分子标记技术在中药材研究中有了长足进展,但相对于我国广阔的中药材资源而言也仅是冰山一角,随着生物化学和分子生物学技术的发展,有越来越多新的研究方法产生,但由于技术本身与中药研究的结合需要一定的过程,目前很多方法仍处于起步阶段。

利用现代生物技术改良中药材品质将是当前和今后的一个重要发展方向。采用DNA重组技术,借助基因工程技术,可以对药理作用显著而有效成分含量不足的野生、珍贵药材,在遗传性状上提高有效成分含量,改善药材品质;或利用转基因技术培育出具有某种优良特性的新品种,如耐寒

性品种、抗虫性品种等,由此在遗传性状上提高药用植物有效成分的含量,改良药材品质,创造高质优秀的新品种。这对挽救和保存珍稀药材资源,繁殖濒危物种,有效开发和规范生产中药资源,以及减少环境污染等都具有重要意义。胡之壁等应用植物细胞培养技术进行洋地黄(*Digitalis purpurea* Linn.)培养细胞的生物转化研究,筛选出高产细胞并获得了相当好的遗传稳定性。另外已培养出抗癌活性成分三尖杉酯含量高于原植物的三尖杉(*Cephalotaxus fortune* Hook.F.)培养细胞。

当前为加快开发利用中药资源,使中药材走向国际市场,必须建立一套自主完善的调控体系,使中药产业更加规范化、产业化、规模化,相信随着各种分子标记技术的不断进步和完善,中药材分子标记技术必将在推动中药材的发展中发挥重要作用。

主要参考文献

- 汪小全,邹喻萍,洪德元. 银杏多样性的RAPD分析. 中国科学, 1996, 26(5): 416—441.
- 盛丽,王蒂,司怀军. 当归RAPD反应条件的优化. 甘肃农业大学学报, 2005, 40(5): 591—595.
- 蔡丹英,范太伟,滕元文等. 甘肃中部梨种质资源的AFLP分析. 果树学报, 2008, 25(3): 298—304.
- 黄丰等. 诃子及其混淆品RAPD分析. 中草药, 2003, 31(9): 31.
- 罗恒,王和勇,孙敏. 应用RAPD快速鉴别中药材海狗肾及其替代品. 中医药学报, 2004, 32(5): 33—37.
- 盛丽,王蒂,司怀军. 甘肃省当归种质资源的RAPD分析. 甘肃农业大学学报, 2007, 42(4): 60—64.
- 赵庆芳,马世荣,曾小英等. 百合栽培品种资源的RAPD分析. 兰州大学学报·自然科学版, 2005, 41(2): 30—33.
- 高文远,秦思强,肖小河等. 当归药材适地性的RAPD分析. 中草药, 2001, 32(10): 926—929.
- 张建清,苏雪,吴琼等. 药用植物党参的RAPD分析. 中药材, 2006, 29(5): 417—420.
- 周延清,景建洲,李振勇等. 利用RAPD和ISSR分子标记分析地黄种质遗传多样性. 遗传, 2004, 26(6): 922—928.
- 杨佳,李晓东,李新伟等. 华中特有珍稀植物裸芸香的AFLP的遗传多样性研究. 武汉植物学研究, 2007, 25(3): 226—234.
- 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, 2004, 26(4): 437—440.
- 杨飞,张敏,彭兴扬等. 金银花5个品系的RAPD分析及DNA指纹图谱的建立. 武汉植物学研究, 2007, 25(3): 235—238.
- 张书芬,傅延栋,马朝芝等. 3种分子标记分析油菜品种间的多态性效率比较. 中国油料作物学报, 2005, 27(2): 19—23. (E-mail: xbsd-yn@163.com)