

采用随机引物组合对绞股蓝作 RAPD 分析及 SCAR 鉴定

罗育, 吴耀生*, 周娟, 李科志, 徐鹏

(广西医科大学生物化学与分子生物学教研室, 南宁 530021)

摘要: 为寻找简单、可重复的分子鉴定方法, 对绞股蓝 (*Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino) 新鲜品、药材干品及其混淆品乌蕪莓 (*Cayratia japonica* (Thunb.) Gagnep) 进行了鉴定。首先从 2000 余条 10 碱基的随机引物中筛选出 20 条, 并以 5 条为 1 组随机分成 4 组, 然后采用 RAPD 方法对 7 份不同来源的绞股蓝新鲜品进行扩增, 对扩增得到的绞股蓝特征条带进行基因克隆、测序, 分析序列特征, 再设计特异性引物, 最后, 用绞股蓝新鲜品、药材干品及其混淆品乌蕪莓等样品进行 PCR 验证。结果显示: RAPD 扩增能够得到 7 份绞股蓝新鲜品重复的共有特征条带; 经基因克隆、测序并设计特异性引物后进行 PCR 验证, 获得了绞股蓝特异序列扩增区域标志 (Sequence-characterized amplified region maker, SCAR)。初步建立了区分绞股蓝及其混淆品乌蕪莓的分子鉴定标准, 并首次将 SCAR 应用于绞股蓝分子鉴定中。

关键词: 绞股蓝; 随机引物组合; RAPD; SCAR; 分子鉴定标准

中图分类号: Q943; R282.710.3

文献标识码: A

文章编号: 2095-0837(2011)02-0243-05

RAPD Analysis with Random Primer Combinations and SCAR Identification of *Gynostemma pentaphyllum*

LUO Yu, WU Yao-Sheng*, ZHOU Juan, LI Ke-Zhi, XU Peng

(Department of Biochemistry and Molecular Biology, Guangxi Medical University, Nanning 530021)

Abstract: The aim of this study was to develop species-specific molecular marker for identification of *Gynostemma pentaphyllum* and that with their adulterant *Cayratia japonica*, in order to avoid adulteration that affects the quality and quantity of *G. pentaphyllum*. The first, twenty 10-bp random primers were picked out from more than 2000 random primers and then divided randomly into four terms that were consist of five random primers. The second, Genomic DNAs of seven *G. pentaphyllum* from different places in Guangxi, China, were amplified using a PCR-based RAPD technique and the same manipulation was repeated to confirm species-specific DNA fragment which was the one of RAPD products. The last, with getting the message of cloning and sequencing of the RAPD products, the species-specific primer was designed and synthesized to amplify fresh leaves and dried medicines of *G. pentaphyllum*, *Cayratia japonica* and so on. As anticipated, the genomic DNAs of *G. pentaphyllum* were only amplified a band and that of others were amplified no band, using the species-specific primer and so sequence-characterized amplified region (SCAR) marker were developed. The SCAR marker are potentially useful for the identification of *G. pentaphyllum* in Guangxi and their adulterant *Cayratia japonica*, also other plants. In addition. This is the first report of species-specific SCAR development in *G. pentaphyllum*.

Key words: *Gynostemma pentaphyllum*; Random primer combinations; RAPD; SCAR; Molecular identification

收稿日期: 2010-03-23, 修回日期: 2010-06-09。

基金项目: 广西科学基金 (桂科基 0731065); 广西研究生教育创新计划项目 (2008105981001M228)。

作者简介: 罗育 (1980-), 男, 硕士研究生, 助教, 从事药用植物分子生物学研究 (E-mail: luoyu2005@126.com)。

* 通讯作者: 吴耀生, 教授, 硕士生导师 (Author for correspondence. E-mail: wuyaosheng03@sina.com)。

绞股蓝(*Gynostemma pentaphyllum* Makino)是葫芦科绞股蓝属多年生草质藤本植物,其有效成分是皂苷,目前已分离的绞股蓝皂苷有80多种,其中6种皂苷与人参皂苷结构相同,是五加科以外少数含人参皂苷的药用植物^[1],全世界绞股蓝有16~17种、2个变种,我国共有11种、2个变种,主产于我国秦岭山区和江南各省,尤其是西南地区,绞股蓝资源极为丰富^[2],故有“南方人参”的美誉。现代药理学研究证明绞股蓝具有抗肿瘤、降血脂、抗衰老、护肝等作用^[3,4]。

随着绞股蓝资源的开发,含有相似生药特征的绞股蓝属中不同种相继被证实含有相似的皂苷类型,可扩充为药用植物资源。但市场上绞股蓝属药材来源复杂,质量差异显著,常见的混淆品主要包括乌莓(*Cayratia japonica* (Thunb.) Gagnep)、雪胆(*Hemsleya chinensis*)、崖爬藤(*Tetrastigma formosanum* (Hemsl.) Gagnep)等,其中乌莓最易与绞股蓝混淆,因其具有与绞股蓝属十分相似的生境与形态特征,易造成药材采收的混乱。

当前,对绞股蓝与乌莓进行鉴别研究已有大量的文献报道,如刘天学等^[5]从植物形态特征、化学成分与药理作用、采集加工与简要用法等方面对绞股蓝与乌莓进行了鉴别;马成亮^[6]从分类归属、性状特征、名称、分布区域等方面进行了鉴别;程存归等^[7]使用 FTIR 法直接对二者进行了鉴定;王太霞等^[8]对绞股蓝与乌莓药用部分进行了显微鉴别;杜丽君等^[9]从性状、解剖结构、现代研究等方面对绞股蓝与乌莓进行了鉴定;王肿等^[10]使用 PCR-RFLP 方法从分子水平上对绞股蓝和乌莓进行了鉴别;蒋军富等^[11]通过 RAPD 指纹图谱从分子水平上对绞股蓝和乌莓进行了鉴定。

本研究与本课题组蒋军富等的研究^[11]均是通过对 RAPD 指纹图谱从分子水平上鉴定绞股蓝和乌莓,但与其不同的是本研究所用引物为10碱基引物,并选择不同的序列;然后从2000余条随机引物中筛选出20条引物,每5条为1组,分成4组,可提高多态性范围;蒋军富等的研究^[11]中的引物扩增所得的序列经比对后发现属于绞股蓝基因组多态性区域,而本文中的引物扩增所得到的序列经比对后发现属于绞股蓝基因组保守区域,丰富了绞股蓝遗传特征的研究。

本研究使用上述筛选出来的4组随机引物对7

份绞股蓝新鲜叶片进行 RAPD 扩增,对其中的共有 DNA 片段进行克隆、测序分析;再根据该片段序列特征设计高特异性引物,从而提高了鉴定的准确度;最后,使用此引物对绞股蓝与其易混品乌莓进行 SCAR 区分鉴定,最终建立了绞股蓝与乌莓的分子鉴定标准。

1 材料和方法

1.1 材料

共选用7份绞股蓝(*Gynostemma pentaphyllum* Makino)植物、葡萄科乌莓属乌莓(*Cayratia japonica* (Thunb.) Gagnep)以及烟草(*Nicotiana tabacum*)、积雪草(*Centella asiatica* (L.) Urban)的新鲜叶片,材料来源均由广西药用植物园凌征柱研究员和广西中医药研究院何开家研究员提供并进行鉴定。同时,从市场中购买了绞股蓝药材干品(或用新鲜品直接烘干)。具体材料及来源见表1。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 提取

采用陈莉等的 CTAB 法^[12]并加以改良,提取出各供试样品材料基因组 DNA。

1.2.2 绞股蓝基因组 DNA-RAPD 扩增

从2000余条10 bp的随机引物中按照碱基比例适中,且G+C含量>40%的原则筛选出20条引物用于本研究,引物由上海生物工程技术有限公司合成;然后将这20条引物随机分成4组,每组5条进行PCR扩增。在前期对RAPD反应体系和反应程序进行优化后,确定反应体系为25 μ L,包括10 $\times$ PCR Buffer 2.5 μ L, 2.0 mmol/L Mg^{2+} 2 μ L, 25 mg/mL BSA 1 μ L, dNTPs(包括dATP、dGTP、dCTP、dTTP四种原料,混合后每种浓度为2.5 mmol/L)1 μ L, 10 μ mol/L引物各加1 μ L(每组有5条引物,共加5 μ L/反应组),40 ng/ μ L模板DNA 1 μ L, 1.0 U/ μ L Taq DNA聚合酶1 μ L,加水至25 μ L。扩增反应在MyCycler™型PCR仪上进行,反应程序为:94℃预变性3 min;94℃变性30 s, 38℃退火30 s, 72℃延伸80 s,进行40个循环;72℃延伸10 min,以三蒸水代替模板作空白对照。PCR产物以1.5%琼脂糖凝胶电泳分离,在UVI-7600Z凝胶成像系统上观察并拍照记录结果。

1.2.3 绞股蓝共有特征条带的克隆、测序

分析RAPD扩增所得的电泳图谱,并挑选出能

表 1 新鲜叶片及药材干品的来源
Table 1 Source of fresh leaves and dried medicincs

编号 No.	样品 Samples	来源 Source
1	绞股蓝鲜叶 I <i>Gynostemma pentaphyllum</i> fresh leaves I	广西药用植物园 Guangxi Medicinal Botanical Garden
2	绞股蓝鲜叶 II <i>G. pentaphyllum</i> fresh leaves II	广西医科大学内 Guangxi Medical University
3	绞股蓝鲜叶 III <i>G. pentaphyllum</i> fresh leaves III	广西大明山 Guangxi Damingshan
4	绞股蓝鲜叶 IV <i>G. pentaphyllum</i> fresh leaves IV	茎、叶分化组织培养品 ¹⁾ The samples were from the cultivated leaves with the stems and leaves
5	绞股蓝鲜叶 V <i>G. pentaphyllum</i> fresh leaves V	广西药用植物园 Guangxi Medicinal Botanical Garden
6	绞股蓝鲜叶 VI <i>G. pentaphyllum</i> fresh leaves VI	广西凌云县 Lingyun county, Guangxi
7	绞股蓝鲜叶 VII <i>G. pentaphyllum</i> fresh leaves VII	广西药用植物园 Guangxi Medicinal Botanical Garden
8	乌莓鲜叶 <i>Cayratia japonica</i> fresh leaves	广西凌云县 Lingyun county, Guangxi
9	烟草鲜叶 <i>Nicotiana tabacum</i> fresh leaves	茎、叶分化组织培养品 ¹⁾ The samples were from the cultivated leaves with the stems and leaves
10	积雪草鲜叶 <i>Centella asiatica</i> fresh leaves	广西药用植物园 Guangxi Medicinal Botanical Garden
11	绞股蓝药材干品 I ³⁾ <i>G. pentaphyllum</i> dried medincine I	广西金秀 Jinxiu County, Guangxi
12	绞股蓝药材干品 II ²⁾ <i>G. pentaphyllum</i> dried medincine II	广西药用植物园 Guangxi Medicinal Botanical Garden
13	绞股蓝药材干品 III ³⁾ <i>G. pentaphyllum</i> dried medincine III	广西大明山 Guangxi Damingshan
14	绞股蓝药材干品 IV ²⁾ <i>G. pentaphyllum</i> dried medincine IV	湖南 Hunan

注：1) 由广西药用植物园凌征柱研究员提供，经本实验室组织培养；2) 为商品药材；3) 用鲜叶直接烘干。
Notes: 1) The samples were provided by Guangxi Medicinal Botanical Garden Fellow, Ling Zheng-zhu and then were cultivated in our lab; 2) The samples belonged to commercial herbal products; 3) The fresh leaves of samples were drying by baking.

够扩增绞股蓝基因组的引物组,重复 RAPD 反应,确定出稳定、重复性好的共有特征条带。7 份绞股蓝新鲜叶片特征条带经胶回收后,使用 pTG19-T PCR 产物克隆试剂盒构建重组质粒,再将重组质粒转化感受态 *E. coli* JM109,通过蓝白斑、*Bam*H I 酶切电泳及 PCR 筛选重组子,最后抽提质粒 DNA,送至上海生物工程技术有限公司测序。

1.2.4 绞股蓝特异性引物的设计

分析条带的序列特征,用 Primer Premier 5.0 及 Oligo 等软件设计引物。遵循引物设计原则,在 Primer Premier 5.0 中输入相应参数,然后选择评分高的引物作为候选,将候选引物输入 Oligo 中验证引物可行性,最后设计出一对 20 bp 左右的最佳引物,送至上海生物工程技术有限公司合成。

1.2.5 绞股蓝特异性引物的验证

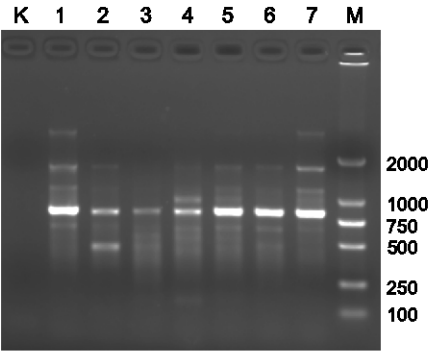
以本实验的 7 份绞股蓝、乌莓、积雪草、烟草等新鲜叶片以及绞股蓝药材干品作为模板,使用通过实验设计出来的高特异性引物,进行特异 PCR 扩增,其中反应体系和反应程序参照 1.2.2,退火温度为 56 ℃,循环数为 30 个。

2 研究结果

2.1 绞股蓝共有特征条带的筛选

其中一组随机引物 RAPD 扩增产物中,7 份绞股

蓝新鲜叶片在碱基长度为 1000 ~750 bp 之间的同一位置均出现有 DNA 条带,且条带非常清晰(与其他条带的比较见图 1),推测可能为绞股蓝属鉴定的一种分子标记,据此分别将这 7 种绞股蓝新鲜叶片的特征条带提取出来,进行下一步的基因克隆、测序。



M. Maker DL2000; K. 空白对照; 1. 绞股蓝 I; 2. 绞股蓝 II; 3. 绞股蓝 III; 4. 绞股蓝 IV; 5. 绞股蓝 V; 6. 绞股蓝 VI; 7. 绞股蓝 VII。
M. Maker DL2000; K. Blank; 1. *Gynostemma pentaphyllum* I; 2. *G. pentaphyllum* II; 3. *G. pentaphyllum* III; 4. *G. pentaphyllum* IV; 5. *G. pentaphyllum* V; 6. *G. pentaphyllum* VI; 7. *G. pentaphyllum* VII

图 1 RAPD 扩增 7 份绞股蓝新鲜叶片电泳图

Fig. 1 Results of RAPD on the fresh leaves of seven *Gynostemma pentaphyllum*

2.2 绞股蓝特异性引物的设计

对样品测序结果分析显示,7 份绞股蓝新鲜叶

片的特征条带长度分别为 826、811、826、826、825、826 bp 及 826 bp,与 Marker 标定的长度基本一致(在 1000 ~750 bp 之间),且两端序列和所用引物序列完全匹配,证明本研究基因克隆操作准确。然后,运用生物信息软件 Blast 中的 ClustalW 进行同源性比对,发现 7 份绞股蓝新鲜叶片特征条带中核苷酸序列的同源性均在 99% 以上(见表 2),从而证明此特征条带的同源性非常高,核苷酸组成基本一致,可能为绞股蓝基因组的保守区域。最后,使用 Primer Premier 5.0 及 Oligo 等软件进行引物设计,确定采用最佳的 1 对引物为特异引物,其中 1 条引物的 Tm 为 60.4℃,另 1 条为 60.5℃,两者 Tm 值非常接近,且引物内及引物间的碱基配对均不超过

3 对,预期扩增长度为 680 bp。

2.3 绞股蓝特异性引物的验证

使用上述设计出来的高特异性引物对 7 份绞股蓝、混淆品乌菰莓、积雪草、烟草等新鲜叶片以及绞股蓝药材干品进行 PCR 扩增。结果显示(见图 2、图 3),仅有绞股蓝(包括新鲜叶片和药材干品)的扩增出现有目的条带(在 750 ~500 bp 之间,预期扩增长度为 680 bp),而包括混淆品乌菰莓在内的其他属植物均未能扩增出 DNA 条带,相同条件下进行重复实验得到的结果均一致。由于引物是根据绞股蓝共有特征条带的序列特征而设计的,所以据此证明该对引物能够用于绞股蓝与混淆品乌菰莓以及其他属植物的鉴别。

表 2 核苷酸序列同源性比对
Table 2 The comparison of nucleotide sequences' homology

序列 Sequence	绞股蓝 I	绞股蓝 II	绞股蓝 III	绞股蓝 IV	绞股蓝 V	绞股蓝 VI	绞股蓝 VII
绞股蓝 I	100%						
绞股蓝 II	99%	100%					
绞股蓝 III	100%	99%	100%				
绞股蓝 IV	100%	99%	100%	100%			
绞股蓝 V	100%	99%	100%	100%	100%		
绞股蓝 VI	99%	99%	99%	99%	99%	100%	
绞股蓝 VII	100%	99%	100%	100%	100%	99%	100%

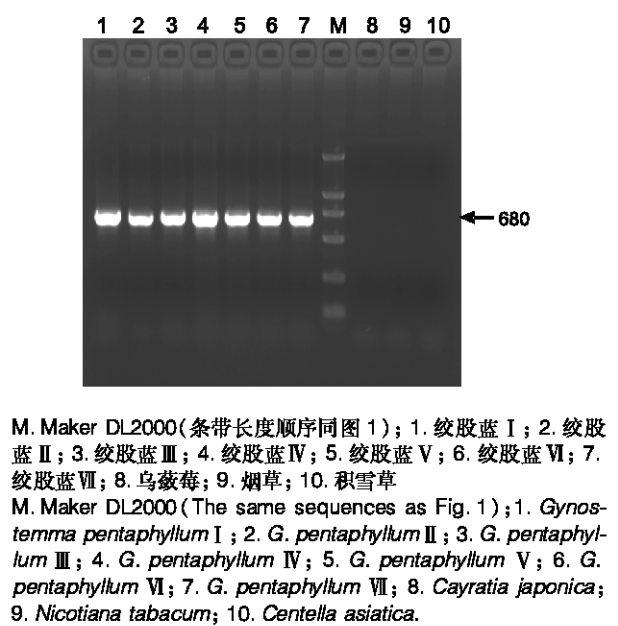


图 2 绞股蓝新鲜叶片特异性引物的验证结果电泳图
Fig.2 Results of PCR by the species-specific primer of the fresh leaves of *Gynostemma pentaphyllum*

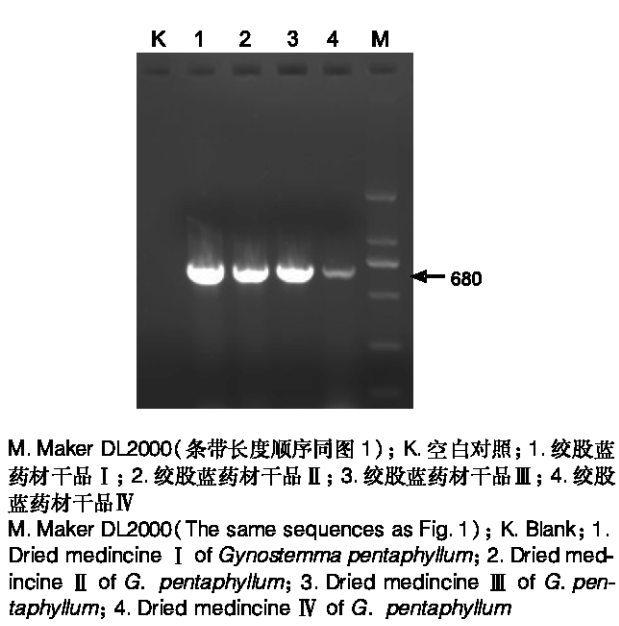


图 3 绞股蓝药材干品特异性引物的验证结果电泳图
Fig.3 Results of PCR by the species-specific primer of the dried medincines of *Gynostemma pentaphyllum*

3 讨论

为了更准确、快速地区分绞股蓝属植物与其易混品乌菰莓,以保证绞股蓝药材来源可靠,保证用药安全,当前已有少量从分子水平上进行研究的报道^[10],本课题组也从不同的角度进行了相关的研究^[11]。

本研究的特点是从 2000 余条 10 bp 随机引物中筛选出适合研究要求的 20 条引物,并随机进行分组,然后对 RAPD 扩增所获得的绞股蓝新鲜叶片共有 DNA 片段进行基因克隆、测序,据此设计出高特异性引物再行 PCR 扩增。实验结果显示,新鲜叶片和药材干品绞股蓝均能得到特异的目的条带,而包括乌菰莓在内的其他属植物,均无任何扩增结果,因此对引物只与绞股蓝基因组的共有区域特异性结合,所以只有绞股蓝能够得到目的条带,这不仅表明特异性引物设计成功,而且也表明该对引物可用于绞股蓝与其他植物的鉴别,更有意义的是能用于药材干品的鉴别。实验结果中,绞股蓝特征条带核苷酸序列同源性在 99% 以上,表明所获得的共有 DNA 片段为绞股蓝基因组中的保守区域,可以作为绞股蓝属植物的一种分子标记。实验最终表明,本研究所用技术具有操作简单、结果稳定、重复性好等特点,能够准确、快速地鉴别绞股蓝及其混淆品乌菰莓。

目前,虽有少量的研究^[13,14]使用 RAPD 技术扩增的特征条带进行基因克隆、测序,确定条带长度;根据条带序列特征,设计特异性引物,再行 PCR 扩增以构建遗传图谱,或制备探针用于不同属植物的鉴别,但未见应用在绞股蓝与乌菰莓鉴别上。

在本研究基础上,若能增加更多不同种属、不同产地绞股蓝及其他种属植物的新鲜品以及更多的绞股蓝药材干品,然后利用本研究所获得的特异性探针引物构建出绞股蓝属与其他属植物的遗传特征图谱,并结合本课题组使用不同引物研究获得的信息,最终建立一套分子鉴定标准,将会为绞股蓝属的鉴定提供一种新的思路,同时,也为保护、开发绞股蓝这种药用植物提供更有力的依据,这也将是本研究下一步需要解决的问题。

致谢:感谢广西药用植物园凌征柱研究员和广西中医药研究院何开家研究员在植物鉴定方面提供的帮助,感谢本课题组的全体成员对实验和论文撰写的完成所提供的帮助。

参考文献:

- [1] Chang C K, Chang K S, Lin Y C, Liu S Y, Chen C Y. Hairy root cultures of *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb) Makino: A promising approach for the production of gypenosides as an alternative of ginseng saponins[J]. *Biotechnology Letter*, 2005, 27(16): 1165–1169.
- [2] 陈书坤. 绞股蓝属植物的分类系统和分布[J]. *植物分类学报*, 1995, 33(4): 403–410.
- [3] 余建峰, 黄俏庭, 艾明仙. 绞股蓝抗肿瘤作用研究进展[J]. *中华现代医学与临床*, 2006, 4(9): 55–57.
- [4] 潘峰, 刘迪, 黄霞霞, 薛秀琴. 绞股蓝皂甙的药理与临床研究[J]. *现代中西医结合杂志*, 2006, 15(5): 674–676.
- [5] 刘天学, 李俐俐, 纪秀娥. 绞股蓝和乌菰莓的性状辨析与药用[J]. *周口师范学院学报*, 2004, 21(2): 76–77.
- [6] 马成亮. 绞股蓝与乌菰莓的比较形态学研究[J]. *潍坊学院学报*, 2002, 2(6): 18–19.
- [7] 程存归, 李冰岚. 绞股蓝及其伪品乌菰莓的 FTIR 法直接鉴定研究[J]. *四川中医*, 2003, 21(1): 25–26.
- [8] 王太霞, 李金亭, 李景原, 胡正海. 绞股蓝与乌菰莓药用部分的显微鉴别[J]. *中草药*, 2003, 34(5): 465–467.
- [9] 杜丽君, 王艳. 绞股蓝与乌菰莓的鉴别及现代研究[J]. *中华当代医学*, 2005, 3(2): 91.
- [10] 王翀, 张媛媛, 杨娟, 蒋玲燕, 李苗苗, 赵桂仿. 绞股蓝属植物及其混淆品乌菰莓的 PCR-RFLP 鉴别研究[J]. *中国中药杂志*, 2008, 33(19): 2167–2170.
- [11] 蒋军富, 李雄英, 吴耀生, 罗育, 赵瑞强, 蓝秀万. 绞股蓝的 RAPD 指纹图谱鉴定及其特异 DNA 片段克隆、序列分析[J]. *中药材*, 2009, 32(2): 190–193.
- [12] 陈莉, 魏莉, 周童, 李敏瑜, 覃玉斌, 吴耀生. 几种中药 DNA 提取方法的比较研究[J]. *广西植物*, 2007, 27(1): 137–139.
- [13] Malay Das, Samik Bhattacharya, Amita Pal. Generation and characterization of SCARs by cloning and sequencing of RAPD products: A strategy for species-specific marker development in bamboo[J]. *Annals of Botany*, 2005, 95(5): 835–841.
- [14] Wu Y J, Chen Y, Wang J, et al. RAPD analysis of jasmine rice-specific genomic structure[J]. *Genome*, 2006, 49(6): 716–719.