

天麻特异 DNA 序列的克隆及其在天麻鉴定中的应用 Cloning of Distinguishing DNA Sequences of *Gastrodia elata Blume* and Application of Them in Identifying *Gastrodia Tuber*

陶 钧^{1,2}, 傅铁祥¹, 罗志勇², 文 李¹, 王志成¹, 舒孝顺¹, 刘水平², 陶 珺¹, 胡维新^{2*}
TAO Jun^{1,2}, FU Tie-Xiang¹, LUO Zhi-Yong², WEN Li¹, WANG Zhi-Cheng¹, SHU Xiao-Shun¹, LIU Shui-Ping², TAO Yao¹ and HU Wei-Xin^{2*}

1 长沙理工大学生物与食品工程学院,长沙 410076

2 中南大学生物科学与技术学院分子生物学研究中心,长沙 410078

1 Bioengineering and Food Engineering School, Changsha University of Science and Technology, Changsha 410076, China

2 Molecular Biology Research Center, School of Biological Science and Technology, Central South University, Changsha 410078, China

摘 要 应用改进的 RAPD 方法测定了名贵中药材天麻基因组 DNA 指纹图谱,通过选择和回收各种天麻种群共有和优良种群特有的 DNA 片段,加以克隆、测序和生物信息学分析,证明其中 5 个 DNA 序列是未报道的,已被美国基因数据库收录,并运用高效液相色谱技术测定了天麻样本的有效成分天麻素含量。运用 PCR 技术研究了这些 DNA 序列在 9 个天麻种群中的分布及其与天麻素含量的关系。结果表明,这 5 个 DNA 序列在这些天麻种群中的分布各不相同,其中 DNA 序列 1 是所研究的全部天麻种群共有,而其伪品没有的特异 DNA 分子标记,DNA 序列 2 可能与天麻的天麻素含量高有关。这些 DNA 标记序列可用于天麻的真伪鉴别、品种鉴定和优选优育等。

关键词 DNA 分子标记,天麻,天麻素,生物信息学分析

中图分类号 Q785 文献标识码 A 文章编号 1000-306X(2006)04-0587-05

Abstract *Gastrodia elata Bl.* is a famous and costful traditional Chinese medicine. Their genomic DNA fingerprints were investigated using a modified Randomly Amplified Polymorphic DNA method. DNA fragments common to all or to fine populations were identified and recovered. Five DNA fragments were proven not to be reported through DNA cloning, PCR identifying, nucleotide sequencing and bioinformatics analyses and were received in and recorded by NCBI GenBank. Gastrodine contents of the *Gastrodia tuber* samples were determined using high performance liquid chromatography technique. The distribution of the five DNA fragments in 9 *Gastrodia elata Blume* populations and the correlation with gastrodine content were studied. The results show the distribution of these DNA sequences varied greatly among the populations whereby DNA Sequence 1 was the common and distinguishing molecular marker for all the populations studied and DNA Sequence 2 may relate to higher gastrodine content. In conclusion, these DNA marker sequences can be employed to identify genuine *gastrodia tubers*, better varieties and optimize their selection and cultivating.

Key words DNA molecule marker, *Gastrodia elata Bl.*, gastrodine, bioinformatics analyses

Received: November 21, 2005; Accepted: April 5, 2006.

This work was supported by a grant from the Research Key Project from Department of Education of Hunan Province and the National Sciences Foundation of China (No. 30470189).

* Corresponding author. Tel: 86-731-4805449; Fax: 86-731-4481180; E-mail: weixinhu@hotmail.com

湖南省教育厅重点研究项目和国家自然科学基金资助项目(No. 30470189)中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

DNA 分子标记不受组织、发育阶段、生存环境和季节限制,常以中性和共显性形式表现,是非常稳定、有用的遗传标记,已被广泛用于生物遗传进化、品种分类鉴定等各方面研究^[1-3],在中草药鉴定研究方面尤其如此^[4,5]。但是,有关药用植物 DNA 分子标记与有效成分的相关性研究报道较少。然而,探索中药材 DNA 分子标记与药材的品质和有效成分的相关性具有更加重要的意义和作用,可为中药材育种改良、规范化种植、提高中药材产量和质量、实现可持续利用提供科学依据和理论指导。

天麻是名贵中药,其主要有效成分天麻素具有广泛的药理作用,如镇静催眠、抗惊厥、增智、健脑、治疗老年性痴呆症、抗氧化、延缓衰老、增强免疫功能、调节心血管等作用^[6]。天麻素含量的高低是衡量天麻品质好坏的重要标志之一。我们运用 RAPD、DNA 克隆、DNA 测序、PCR 鉴定等技术和生物信息学方法以及高效液相色谱测定技术,研究了天麻特有 DNA 分子标记序列的结构和在各种天麻种群中的分布及其与天麻素含量的关系,为天麻品种和品质鉴定、优选优育提供了科学依据。

1 材料与方法

1.1 天麻、天麻伪品和天麻素对照品

天麻块茎样本采自湖南常德德海药材开发公司的天麻开发种植基地。红杆天麻(原产于陕西)用 H 代表;绿杆天麻(原产于贵州)用 L 代表;乌杆天麻(原产于云南)用 W 代表,其中 H1、H2、H3、H4、L1、L2、L3、W1 和 W2 分别代表三种颜色天麻品种的不同种群(样本数为 3~5)。天麻伪品:马铃薯、大理菊、芭蕉芋、紫茉莉、羽裂蟹甲草、天花粉和芋头的新鲜块根样本采自当地或其产地。样本采回后,保存于 -78℃ 低温冰箱中。天麻素对照品购自中国药品生物制品检定所,批号为 807-200104。

1.2 DNA 提取

采用 FLORACLEAN™ Plant Genomic DNA Isolation kit(美国公司产品)提取天麻及其伪品样本的基因组 DNA。

1.3 天麻基因组 DNA 的 RAPD 测定及特异 DNA 条带的选择

为了获得特异性强的、DNA 条带丰富的指纹图谱,采用陶钧等(2005)改进的 RAPD 技术^[7,8]和随机引物测定不同天麻 DNA 样本,然后从 20 个引物(上海 Sangon 生产)中筛选出 4 个引物(S1: GTTTCGCTCC、S6: TGCTCTGCC、S10: CTGCTGGGAC

和 S14: TCCGCTCTGG),并用于扩增天麻基因组 DNA。然后,取 20 μL PCR 扩增产物用 1.4% 琼脂糖凝胶电泳 1.5 h 左右,使 DNA 电泳带充分分离,溴乙锭染色,在紫外光投射箱上,选择和切取全部样本共有的和天麻素含量高的样本特有的 DNA 条带。

1.4 DNA 片段的回收

使用 EZ Spin Column DNA Gel Extraction Kit(加拿大 Bio Basic 公司生产)从凝胶中回收 DNA 片段。用凝胶成相系统检测回收 DNA 的纯度;用紫外可见分光光度计测定其含量。使用乙醇沉淀法纯化和浓缩 DNA。

1.5 回收 DNA 的克隆和筛选

采用美国 Promega 公司的 pGEM-T 载体系统将回收 DNA 片段插入 T 载体中;采用 CaCl₂ 转化法将重组载体转化 DH5α 大肠杆菌;运用氨苄青霉素和蓝白筛选法筛选阳性重组子克隆^[9]。

1.6 阳性重组子克隆的鉴定

应用 PCR 鉴定阳性重组子克隆:阳性菌液置沸水浴中处理 5min。在 0.5mL 离心管中按顺序加入双蒸无菌水 19.8μL、10 × 缓冲液 2.5μL、dNTPs 0.5μL、T7 引物 0.5μL(5'-TAATACGACTCACTATA GGGCGA-3')、SP6 引物 0.5μL(5'-CATACGATTTAGGT GACTACTATAG-3')、Taq DNA 聚合酶 1u、菌液 1μL,混合后置 PCR 仪中扩增。温度和时间参数为:94℃ 预变性 3min、94℃ 变性 1min、55℃ 退火 1min、72℃ 延伸 1.5min,循环 35 次,最后,延伸 10min。扩增产物采用上述方法检测和照相。根据扩增的 DNA 片段长度与原回收的 DNA 片段长度完全一致,确定为阳性克隆。

1.7 DNA 测序和拼接

鉴定为阳性的 6 个 DNA 克隆送上海博亚生物技术公司测定核苷酸序列,获得 5 个有效 DNA 序列。根据 T 载体插入位点两侧的核苷酸序列和所用随机引物的序列,去掉克隆 DNA 片段的多余序列和重叠序列,拼接成完整的全长序列;并根据克隆 DNA 片段两端的头 10 个核苷酸序列与原扩增引物是否完全相同,进一步确定阳性克隆 DNA 片段的真实性。

1.8 DNA 序列的生物信息学分析与注册

运用美国国家生物技术信息中心(NCBI)的 Blastn 比对软件工具分析 5 个 DNA 序列的相似性,然后将它们输入美国 NCBI 基因数据库作 Blastn 比对搜索,确定克隆 DNA 是否为以前未报道的 DNA 序列,并利用美国 NCBI 的序列提交软件工具向

NCBI 基因数据库申请登记注册。

1.9 天麻素含量测定

天麻素萃取方法参见文献 [10], 天麻素含量的高效液相色谱测定方法参见文献 [11]。

首先, 根据 5 个 DNA 序列两端的核苷酸顺序设计 5 对引物。为了减少原随机引物可能错配引起的误差, 引物设计从 DNA 序列两端的第 11 个核苷酸开始。因此, 扩增的产物比原序列要短 20 个核苷酸。设计的 5 对引物的序列见表 1。这些引物由上海博亚生物技术公司合成。

表 1 5 对引物及其序列

Table 1 Sequences of the five pairs of primers

| Primer name | Primer sequence |
|------------------|--------------------------------|
| Forward primer 1 | 5'-catagccatccaaatctgcaaa-3' |
| Reverse primer 1 | 5'-aggataaatattggagtgttccc-3' |
| Forward primer 2 | 5'-ctaaaatatgcatttggtcaatt-3' |
| Reverse primer 2 | 5'-tgaacataaaattctatgcatag-3' |
| Forward primer 3 | 5'-ctaaatattggggaattggggc-3' |
| Reverse Primer 3 | 5'-ataaatagacctgcaactctcata-3' |
| Forward primer 4 | 5'-aaatggtgacacctgtccga-3' |
| Reverse Primer 4 | 5'-gaaatcaacctgtctgacgc-3' |
| Forward primer 5 | 5'-tgctctggttcccatagac-3' |
| Reverse Primer 5 | 5'-caattgagactttatagagattgc-3' |

其次, 应用设计合成的引物扩增各种天麻样本基因组 DNA: 在 0.5mL 离心管中按顺序加入双蒸无菌水 18.8 μ L、10 \times 缓冲液 2.5 μ L、dNTPs 0.5 μ L、上游引物 0.5 μ L、下游引物 0.5 μ L、Taq DNA 聚合酶 1.5u、模板 DNA 2 μ L (25ng/ μ L), 混匀后置 PCR 仪中扩增。扩增条件为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 3min, 94 $^{\circ}$ C 变性 1min、退火 1min (退火温度比引物 T_m 值低 5 $^{\circ}$ C 左右), 72 $^{\circ}$ C 延伸 1.5min, 循环 35 次, 最后, 延伸 10min。扩增产物分离与检测同上。根据各种天麻有无相应的特异 DNA 条带, 确定这些 DNA 序列为各种天麻共有的 DNA 分子标记序列或某些样本特有的 DNA 分子标记序列, 并分析这些 DNA 分子标记序列与天麻素含量的相关性及其意义。

2 结果与分析

2.1 回收 DNA 的克隆、鉴定、测序、生物信息学分析与注册

通过 PCR 扩增、DNA 片段选择回收、DNA 克隆

和鉴定, 获得了 6 个阳性克隆, 鉴定结果见图 1。

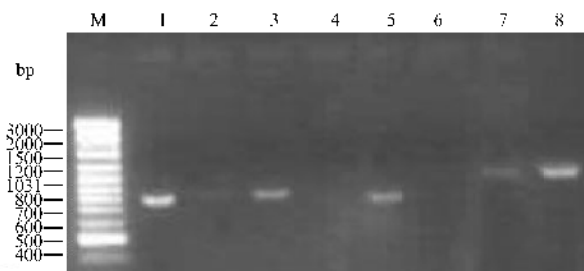


图 1 DNA 序列 2 和 3 的 PCR 鉴定结果

Fig. 1 Products of amplifying DNA sequence 3 and DNA sequence 2 using PCR technique was resolved by electrophoresis in 1.4% agarose gel which was stained with ethidium bromide and photographed.

1, 2, 3, 5: positive results of sequence 3; 7, 8: positive result of sequence 2.

DNA 测序获得 5 个有效 DNA 序列, DNA 序列 1~5 的 GenBank 号分别为: AY905620, AY905621, AY905622, AY905623, AY905624; 其核苷酸数分别为 360bp, 790bp, 631bp, 1682bp, 446bp。

由 5 个 DNA 序列两端的头 10 个核苷酸分析来看, 它们与原随机扩增引物的核苷酸序列完全吻合。这进一步证实 DNA 序列 1 和 3 是由引物 S1 从天麻基因组中扩增得到的, 而序列 2、序列 4 和序列 5 分别是由引物 S6、引物 S14 和引物 S10 从天麻基因组中扩增得到的。

利用 NCBI 的 Blastn 比对软件工具分析 5 个 DNA 序列彼此之间的相似性, 证实它们是不同的 DNA 序列。将 5 个 DNA 序列输入美国 NCBI 的 GenBank 作 Blastn 比对搜索, 结果表明: 这 5 个 DNA 序列与世界上 GenBank + EMBL + DDBJ + PDB 几大互通的权威基因数据库中的 2 842 920 个已知 DNA 序列不同, 相似性位点记分都在 50 以下, 是以前未报道的 DNA 序列。

2.2 天麻素含量的测定

应用高效液相色谱仪测定天麻样本的天麻素含量, 结果见表 2。

2.3 特异 DNA 标记序列在不同天麻样本中的分布及其与天麻素含量的关系

使用 5 对合成引物和 PCR 技术扩增天麻基因组 DNA, 检验 5 个 DNA 序列在天麻种群中的分布,

表 2 9 个天麻种群的天麻素含量(%)

Table 2 The gastrodine contents(%) in the 9 populations of *Gastrodia elata* Blume

| Populations | H1 | H2 | H3 | H4 | L1 | L2 | L3 | W1 | W2 |
|----------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Gastrodine average content | 0.1146 | 0.3345 | 0.3854 | 0.2371 | 0.1997 | 0.1001 | 0.1334 | 0.3681 | 0.1020 |
| Standard deviation | 0.021 | 0.035 | 0.015 | 0.028 | 0.023 | 0.014 | 0.017 | 0.026 | 0.019 |

结果见图 2、3 和表 3。

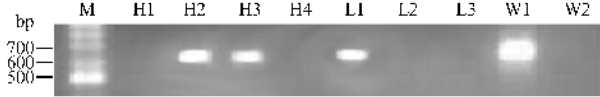


图 2 用引物 3 扩增 9 种天麻基因组 DNA 得到的 DNA 产物的琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 2 Products of amplifying genomic DNA from 9 populations of *Gastrodia elata* Blume using Primer 3 was resolved by electrophoresis in 1.4% agarose gel which was stained with ethidium bromide and photographed.

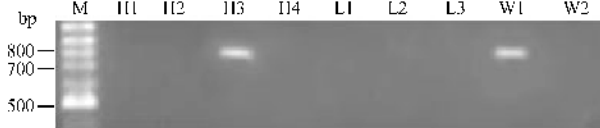


图 3 用引物 2 扩增 9 种天麻基因组 DNA 得到的 DNA 产物的琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 3 Products of amplifying genomic DNA from 9 populations of *Gastrodia elata* Blume using Primer 2 was resolved by electrophoresis in 1.4% agarose gel which was stained with ethidium bromide and photographed

表 3 用 5 对合成引物扩增的 9 个天麻种群基因组 DNA 产生的特异 DNA 条带分布

Table 3 Distribution of the distinguishing DNA fragments yielded by PCR amplification of genomic DNA from the 9 populations of *Gastrodia elata* Blume using the 5 primer pairs

| Name of Sample | Primers | | | | |
|----------------|-----------|----------|----------|----------|----------|
| | Primer 1* | Primer 2 | Primer 3 | Primer 4 | Primer 5 |
| H1 | + | - | - | + | + |
| H2 | + | - | + | - | + |
| H3 | + | + | + | + | + |
| H4 | + | - | - | + | + |
| L1 | + | - | + | - | + |
| L2 | + | - | - | + | + |
| L3 | + | - | - | + | + |
| W1 | + | + | + | + | + |
| W2 | + | - | - | - | - |

* : + & - stand for with or without distinguishing amplified DNA band respectively.

由表 3 可见, 被研究的 9 种天麻都有引物 1 扩增的 340 bp 特异 DNA 条带, 说明 DNA 序列 1 是各种天麻(无论是新鲜的, 还是干制的样本)共有的特异 DNA 分子标记。只有天麻素含量最高的 H3 和 W1 具有引物 2 扩增的 DNA 条带。这说明 DNA 序列 2 可能与天麻种群的天麻素含量高有关。另外, H3 和 W1 还有一个共同特征, 它们都具有其余 4 个引物扩增的 DNA 条带。由此看来, H3 和 W1 具有较多的共同特点。DNA 序列 3 是 H2、H3、L1 和 W1 四个天麻种群的特异 DNA 分子标记。DNA 序列 4 是

H1、H3、H4、L2、L3 和 W1 6 个天麻种群的特异 DNA 分子标记。除了 W2(干制样本)以外, 其余所有种群都具有引物 5 扩增的 446 bp 特异 DNA 条带。这说明 DNA 序列 5 也是绝大多数天麻样本共有的 DNA 分子标记。W2 只具有引物 1 扩增的特异 DNA 条带, 不具有其余 4 个引物扩增的 DNA 条带。这可能与它的干制有关。

2.4 DNA 序列 1 及其引物的应用

使用引物 1(根据 DNA 序列 1 设计合成)扩增 3 种天麻的 9 个群体样本及其伪品: 马铃薯、大丽菊、芭蕉芋、紫茉莉、羽裂蟹甲草、天花粉和芋头的基因组 DNA, 结果见图 4。

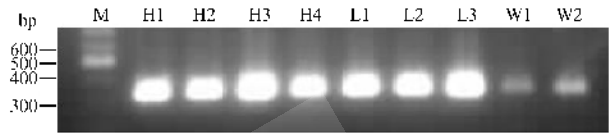


图 4 用引物 1 扩增 9 种天麻基因组 DNA 获得的产物的琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 4 Products of amplifying the genomic DNA from 9 varieties of *Gastrodia elata* Blume using Primer 1 was resolved by electrophoresis in 1.4% agarose gel which was stained with ethidium bromide and photographed

由应用结果来看, 各种天麻都具有引物 1 扩增的特异 DNA 片段, 而它的常见伪品: 马铃薯、大丽菊、芭蕉芋、紫茉莉、羽裂蟹甲草、天花粉和芋头没有这个特异条带。可见该 DNA 序列是各种天麻共有的而它的常见伪品没有的特异 DNA 分子标记。

3 讨论

研究 DNA 分子标记与品种的生产性能和品质的相关性, 可以增强品种选育的针对性, 减少盲目性, 加快品种选育提高的速度。我们的研究表明: DNA 序列 2 可能与天麻的天麻素含量高有关。因此, 在天麻选育过程中, 可以把它作为天麻的辅助选择标记, 用于选择天麻素含量高的优良类群。这有利于提高天麻的有效成分含量和品质以及培育优良新品种。DNA 序列 1 是各种天麻包括干制天麻共有的特异 DNA 分子标记。该 DNA 序列及其引物可以用于天麻真伪鉴别、相似物种的鉴定。本研究为天麻的优选优育、品种鉴定等提供了科学依据。该研究成果的开发与运用有利于保护天麻遗传资源, 防止天麻退化, 促进天麻可持续利用等。此外, 对其它名贵中药材相关研究亦具有重要借鉴作用。

我们在比对分析这些 DNA 序列与其它生物

DNA 的相似性中发现 :与其它物种同源相似很高的 DNA 短片段绝大多数集中在某些区段 ,如 :天麻 DNA 序列 3 的第 140 ~ 180 bp 区段和第 500 ~ 540 bp 区段(见图 5)。

Distribution of 65 Blast Hits on the Query Sequence

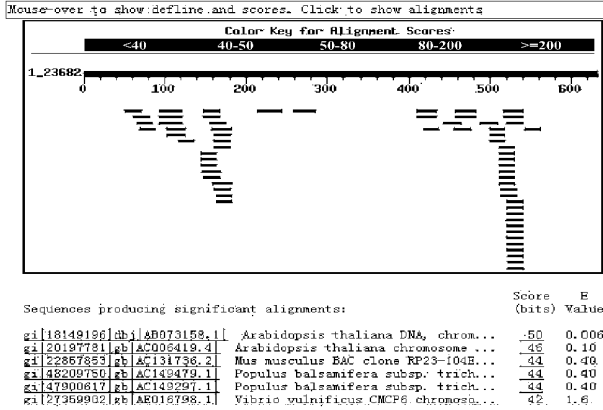


图 5 运用比对软件工具将 DNA 序列 3 与国际基因数据库已知 DNA 序列比对得到的同源性片段分布

Fig. 5 Distribution of Blast hits found by aligning DNA sequence 3 to the known DNA sequences in GenBank by using Blastn software tool

DNA 序列 2 的第 180 ~ 220bp 区段 ,DNA 序列 1 的第 20 ~ 50bp 区段 ,DNA 序列 4 的第 600 ~ 640bp 区段 ,DNA 序列 5 的第 170 ~ 240bp 区段 ,这些区域可能是天麻与其它生物 DNA 的高同源区。这些同源相似性高的 DNA 区段在不同物种的功能相同或相似的基因序列中可能出现频率更高。因此 ,我们可以利用已知基因的这种保守的 DNA 区段的核苷酸序列设计引物 ,并运用 PCR 技术从不同物种中获得功能相同或相似的基因序列 ,并研究分析其变异程度。

REFERENCES(参考文献)

[1] Elena DC , Amal AA , Damian C , et al. Root cap specific expression of an endo- β -1,4-glucoanase(cellulase): a new marker to study root development in *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology* , 56(2) 309 - 323

[2] Manifesto MM , Schlatter AR , Hopp HE et al. Quantitative evaluation of Genetic Diversity in wheat Germplasm using molecular markers. *Crop Science* , 2001 , 41 : 682 - 690

[3] Koch TC , Goldman IL. Relationship of carotenoids and tocopherols in a sample of carrot root-color accessions and carrot germplasm carrying Rp and rp alleles. *Journal of Agriculture Food Chemistry* , 2005 , 53(2) : 325 - 331

[4] Ding XY(丁小余) , Xu LX(徐珞珊) , Wang ZK(王峥涛) et al. Molecular authentication of *dendrobium chrysanthum* from its allied species of *dendrobium*. *China Journal of Chinese Materia Medica* (中国中药杂志) , 2002 , 27(6) : 407 - 411

[5] Liu XH(刘向华) , Wang YQ(王义权) , Liu ZQ(刘忠权) et al. Identification of Chinese crude drug snake gall bladder by DNA molecular marker. *Acta Pharmaceutica Sinica*(药学学报) , 2001 , 36(3) : 229 - 232

[6] Xu YE(徐玉娥) . The study of Chinese traditional medicine gastrodia tuber. *Chinese Wild Plant Resource*(中国野生植物资源) , 2003 , 22(4) : 12 - 14

[7] Tao J(陶钧) , Luo ZY(罗志勇) , Liu SP(刘水平) et al. Optimizing of RAPD amplifying condition and analysis of genomic DNA polymorphism of *Gastrodia elata Blume*. *Life Science Research* (生命科学研究) , 2005 , 9(2) : 150 - 155

[8] John GKW , Anne RK , Kenneth JL et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* , 1990 , 18(22) : 6531 - 6535

[9] Hu WX(胡维新) . Usual experiment manipulation of molecular biology(分子生物学实验操作) . Changsha : Hunan Science and Technology Press(长沙 湖南科学技术出版社)

[10] Wang YS(王跃生) , Li JX(李菊萍) , Liu SZ(刘淑芝) et al. Research on methodology of determining gastrodine contents in gastrodia tuber and Yinaoling granules using HPLC. *China Journal of Chinese Materia Medica*(中国中药杂志) , 1998 , 23(9) : 541 - 543

[11] Xie XT(谢笑天) , Zheng F(郑萍) , Yang MH(杨明惠) et al. Determination of gastrodine and preparations of gastrodine by HPLC. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*(中草药) , 2001 , 32(6) : 513 - 515.