

• 药物分析 •

不同产地红曲基原菌的 RAPD 分析

邢旺兴¹, 宓鹤鸣¹, 陈士景², 贺祥³, 吴玉田¹ (1. 第二军医大学药学院药物分析教研室, 上海 200433; 2. 解放军第117医院, 杭州 310023; 3. 第二军医大学科研部, 上海 200433)

摘要:目的: 建立中药红曲基原菌的 RAPD 分析方法。方法: CTAB 法提取不同产地红曲基原真菌的基因组 DNA; 琼脂糖凝胶电泳法检测 PCR 扩增产物, PHYLIP3.5c 进行聚类分析。结果: S282 等 10 个随机引物的扩增产物谱带多, 特征好; 产地间指纹图谱呈现出明显的 DNA 扩增产物多态性。结论: RAPD 分析技术可作为红曲鉴定的有用手段。

关键词: 红曲; RAPD; 鉴别

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 1006-0111(2001)-03-0163-03

Analysis of the origin fungi of the traditional Chinese medicine, *Hongqu* from different producing areas with RAPD technique

XING Wang-xing¹, MI He-ming¹, CHENG Shi-jing², HE Xiang³, WU Yu-tian¹ (1. Department of Analysis, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. The 117th Hospital of PLA, Hangzhou 310013, China; 3. Department of Science Research Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE: Establish a random amplified polymorphism DNA (RAPD) method for classification of origin fungi of the traditional Chinese medicine, *Hongqu*. **METHODS:** The genome DNAs of the origin fungi of *Hongqu* from 14 different producing areas were extracted by CTAB. Amplification products were detected by agarose gel electrophoresis and done clustering analysis using PHYLIP3.5c. **RESULTS:** A characteristic pattern was produced dependent on one of the 10 screened random primers and the genome amplified. The diversities of the fingerprint patterns of *Monascus* exist obvious by which we can distinguish easily. **CONCLUSION:** RAPD assay technique is a useful tool to identify of *Hongqu*.

KEY WORDS: *Hongqu*; RAPD; identification

红曲是一种食疗兼备的传统中药, 具有活血化瘀、健脾消食等功效; 近年来的研究发现, 红曲同时具有降脂、降压、降糖和抑制肿瘤生长等作用。但制备红曲的基原真菌种类较多, 我国约有 19 种, 由于菌种、生产方法及所用大米不同等使不同产地红曲所含成分存在差异而致临床疗效不同, 需要提供较好的鉴别方法; 同时红曲基原菌的命名在分类学上一直存在争议^[1]。随机扩增多态性 DNA (RAPD) 是一种运用 PCR 原理, 以一条随机设计的寡核苷酸单链为引物, 对模板 DNA 进行 PCR 扩增的遗传标记技术^[2]; 已广泛用于动植物的物种形成、系统演化关系等各个领域的研究^[3-5]。鉴于红曲霉菌的分

子生物学研究至今未见报道, 其 DNA 等分子生物学背景不清, 常规分子生物学技术等不适用, 本文首次运用 RAPD 分析技术, 从分子水平上研究了不同产地红曲基原菌的遗传背景差异, 为中药鉴定提供新的有力手段和科学依据。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

Perkin Elmers 480 型 DNA 扩增仪, Beckman J2³/21M 型超速离心机, 岛津 UV-265FW 紫外分光光度计, FR280 电泳仪, FR180A 台式离心机及 FR120 暗箱式紫外分析仪。S282 (CATCGCCGCA), S502 (CACAGCTGCC), S710 (AGCGATGCAC), S750 (CGGGCAACGT), S782 (GAGGTCCACA), OPH₃ (AGACGTCCAC), OPH₄ (GGAAGTCCGC), OPH₅ (AGTCGTCCCC), OPH₇ (CTGCATCGTG), OPH₈

(GAAACACCCC) 10 个随机引物及 Taq DNA 聚合酶, 上生生物工程公司。DNA 提取缓冲液含 0.1 mol/L Tris³/HCl (pH9.0), 0.2 mmol/L EDTA (pH8.0), 1.4 mol/L NaCl, 5% 十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)及 0.5% β-巯基乙醇。TE 缓冲液: 0.1 × TE 缓冲液; 5 × TBE 缓冲液。

1.2 菌株

不同产地红曲米中的红曲霉分离株 14 株(见表 1)。

表 1 试验用红曲霉分离株的来源

No.	Sources	No.	Sources
X1	Zhouchun, Shandong	X8	Huwua, Guangdong
X2	Wuhan, Hubei	X10	Nanjing, Jiangsu
X3	Changsha, Hunan	X11	Zhengjiang, Jiangsu
X4	Jiangyin, Jiangsu	X12	Gutian, Fujiang
X5	Yongkang, Zhejiang	X13	Shanghai
X6	Gutian, Fujiang	X16	Fuzhou, Fujiang
X7	Jiaoling, Guangdong	X18	Longyan, Zhejiang

1.3 DNA 提取与测定

依 CAT B 法略加改动^[6]。用 EB 荧光强度和分光光度计双重测定法确定 DNA 大小及浓度, 测定 A_{260}/A_{280} 比值并判断 DNA 纯度, 应大于 1.5 为佳。

1.4 PCR 反应

参照 Williams 的方法^[3]稍加改动。

1.5 DNA 条带的计算

根据片段大小排列并记录, 条带有计为“1”; 条带无计为“0”; 缺失数据计为“* ”。

1.6 相似率计算

根据 Nei 等人(1979)的相似率分析公式进行数据分析

$$\text{相似率}(F_{ab}) = (2 \times N_{ab}) / (N_a + N_b) \times 100\%$$

其中, N_{ab} 为菌株 a 和 b 之间共有的 DNA 扩增片段数目, N_a 为个体 a 具有的 DNA 扩增片段数目, N_b 为个体 b 具有的 DNA 扩增片段数目。

1.7 聚类分析

根据原始数据 0-1 矩阵计算出相似矩阵及遗传距离矩阵, 使用 PHYLIP3.5c (Phylogeny Inference Package) 中的 UPGMA 聚类方法构树。

2 结果与分析

2.1 DNA 提取

提取的红曲霉基因组 DNA 片段大小一致, 约为 21Kb, 说明用本法能提取较完整的红曲霉基因组 DNA。

2.2 红曲霉 RAPD 产物的电泳图谱

用筛选出的 10 个随机引物进行扩增。不同产地红曲霉分离株的 RAPD 扩增产物谱带有 3~9 条; 各材料主带 1~3 条, 次带丰富, 既有相同条带又有差异条带; 见图 1。

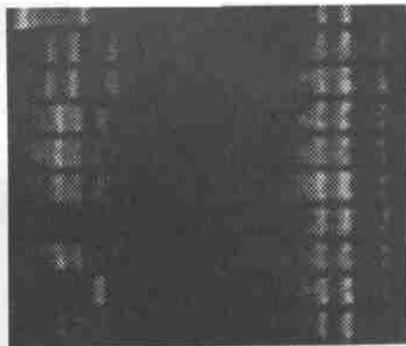


图 1 红曲霉分离株的 RAPD 结果

2.3 DNA 多态性分析

从全部材料的 10 个 RAPD 引物扩增的指纹图谱上可以看出, 种内不同产地居群指纹图谱差异较小, 主带基本一致, 只个别次带存在差异; 统计所有电泳结果, 共获得电泳条带 434 条, 其中多态性条带 78 条, 占 18%。

2.3.1 不同产地红曲霉分离株的 RAPD 分析: 14 株红曲霉分离株的相似矩阵见表 2, 聚类分析结果见图 2。红曲霉分离株间的相似率为 33.0%~100%, 平均 72.6%; 说明了不同产地红曲大多是用同一种红曲霉来制造的, 这结果与形态学及扫描电镜观察的结果一致, 即我国大部分地区是用紫红曲霉来发酵制备红曲的^[7]。表明分子系统学与基于基因组 DNA 基础之上的形态分类学具有良好的吻合度, RAPD 扩增产物指纹谱能很好地反映两者之间的遗传距离, 具有极强的鉴别能力。

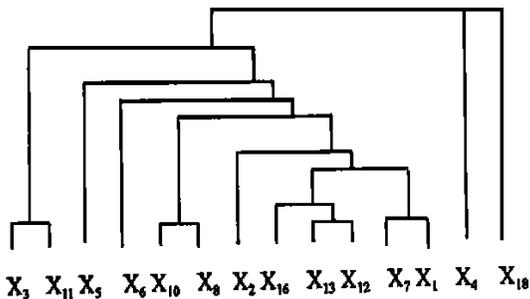


图 2 不同产地红曲霉分离株的系统聚类图

聚类分析结果表明, X_{18} 分离株与其它产地的红曲霉分离株相比, 在亲缘关系上应有一定的距离, 它们之间呈现出较明显的 DNA 扩增产物多态性, 这深刻反映了菌株发生变异的 DNA 基础。

表 2 不同产地红曲霉的相似矩阵

	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	X8	X10	X11	X12	X13	X16	X18
X1	1.00													
X2	0.63	1.00												
X3	0.93	0.63	1.00											
X4	0.95	0.67	0.95	1.00										
X5	0.97	0.68	0.97	0.98	1.00									
X6	0.97	0.68	0.97	0.98	1.00	1.00								
X7	0.97	0.68	0.97	0.98	1.00	1.00	1.00							
X8	0.85	0.63	0.82	0.82	0.89	0.89	0.86	1.00						
X10	0.83	0.64	0.83	0.85	0.86	0.86	0.86	0.94	1.00					
X11	0.95	0.66	0.98	0.97	0.98	0.98	0.98	0.90	0.84	1.00				
X12	0.72	0.53	0.69	0.72	0.73	0.73	0.73	0.66	0.67	0.71	1.00			
X13	0.79	0.50	0.76	0.76	0.77	0.77	0.77	0.73	0.71	0.78	0.90	1.00		
X16	0.79	0.60	0.79	0.78	0.79	0.83	0.79	0.75	0.73	0.81	0.75	0.85	1.00	
X18	0.41	0.30	0.38	0.39	0.43	0.43	0.43	0.33	0.38	0.41	0.44	0.48	0.49	1.00

3 讨论

红曲霉属真菌的分类、名称及其与商品红曲药材的关系一直比较混乱,新种不断出现和学名更迭更增添了分类与鉴定的困难。因此,基于 RAPD 多态性分析的数值分类将从分子水平上为揭示红曲霉属遗传背景差异及为系统分类鉴定提供更有力的现代研究手段和支持依据。

RAPD 多态性聚类分析结果与经典分类具有很大的吻合度,说明 RAPD 分析具有很好的重现性和可靠性,可作为真菌系统分类客观而有效的手段之一,对某些分类学混乱和争议能做出更为明确和自然的处理。

利用 RAPD 指纹图谱所建立的聚类系统树所反映的种间关系与经典形态分类又有一定的差异,如 RAPD 多态性提示 X₄ 和 X₁₈ 一样与其它产地的几种红曲霉的遗传距离较远,应为不同种;而依经典形态学观点, X₁₈ 与其它几种红曲霉不同种,而 X₄ 与其它产地的几种红曲霉同种。造成这种现象的原因是与不同分类水平相关的。传统分类是以几个主要的形态特征为依据,而控制这几个形态特征的基因在整个遗传信息中所占的比例较小。RAPD 分析则

是通过多个不同的引物给出覆盖整个基因组的多态性信息,并且是直接 DNA 分子中检测碱基序列的变化,因此以形态为依据的分类系统与以 DNA 水平为依据的分类结果就不可能完全吻合,这也提示了 RAPD 分析最好与包括形态学在内的其它分类方法相结合,以提高分类的客观性、真实性和正确性。

参考文献:

- [1] 宋洪涛, 宓鹤鸣, 郭 涛. 中药红曲的研究进展[J]. 药学实践杂志, 1999, 17(3): 172.
- [2] 邢旺兴, 宓鹤鸣, 田 靓, 等. RAPD 技术及其在生药学研究中的应用[J]. 解放军药学学报, 1999, 15(3): 25.
- [3] Williams JGK, Kubelik AR. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers[J]. Nucleic Acids Res, 1990, 18(22): 6531.
- [4] 李增智, 黄 勃, 樊美珍, 等. 利用 RAPD-PCR 检测三种白僵菌及球孢白僵菌种内变异[J]. 菌物系统, 1998, 17(2): 185.
- [5] Birch M, Anderson MJ, Denning WD. Molecular typing of Aspergillus species[J]. J Hospit Infect, 1995, 30(2): 339.
- [6] Murray MG, Thompson WF. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA[J]. Nucleic Acids Res. 1980, 8(7): 4321.
- [7] 邢旺兴, 尹 茶, 宓鹤鸣, 等. 中药红曲基原真菌的高效毛细管电泳色谱法鉴别[J]. 第二军医大学学报, 2000, 21(1): 59.

收稿日期: 2001- 02- 27

(上接第 153 页)

$\ln A = \ln \beta / T_m^2 - \ln R / E + E / RT_m$, 可求得频率因子 A, 这样由 Arrhenis 公式 $k = Ae^{-E/RT}$, 求出任一温度下的 k 值。

反应级数与 DTA 峰形有关, 反应级数小, 峰形对称性也小, 从而提出了峰形指数的概念, 其定义为 DTA 曲线峰拐点处切线斜率之比: 峰形指数 $S = \text{左半峰宽} / \text{右半峰宽}$

峰形指数是反应级数的函数, 存在以下关系式:
 $S = 0.63n^2$

则 $n = 1.26S^{1/2}$

3.2 通过本试验体会到, DTA 法测定药物的分解反应动力学参数, 比用经典恒温法简便易行, 需要的数据少, 因而 DTA 在新药处方前的研究中是一种很有用的测试手段, 国内外已有药厂将其作为原辅料常规的定性方法。

参考文献:

- [1] 郑俊民, 李启先, 丁平田, 等. 经皮给药新剂型[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1997. 205.
- [2] 苏得森. 物理药剂学[M]. 沈阳: 沈阳药科大学出版社, 1994. 110~ 112.

收稿日期: 2000- 11- 23