

保健食品铁皮石斛及其混淆品的分子鉴别及亲缘关系分析

丁 鸽^{1,2}, 张代臻³, 张伟超⁴, 丁小余^{2,*}

(1.盐城工学院化学与生物工程学院, 江苏 盐城 224003; 2.南京师范大学生命科学学院, 江苏 南京 210046;

3.江苏省滩涂生物资源与环境保护重点建设实验室, 江苏 盐城 224002;

4.环境保护部南京环境科学研究所, 江苏 南京 210042)

摘 要:目的: 寻找简易且重复性高的分子标记方法对保健食品铁皮石斛及其混淆品进行分子鉴别并对其亲缘关系进行分析。方法: 对铁皮石斛及其混淆品的 *matK* 基因进行扩增、测序并进行序列分析, 寻找其中存在的单核苷酸多态性(SNP)位点并根据 SNP 位点设计特异性鉴别引物; 运用 Mega 3.0 等软件进行遗传关系分析。结果: 根据 *matK* 基因序列中存在的 SNP 位点及特异性鉴别引物, 可将铁皮石斛与其混淆品成功分开; 各样品之间存在较大的遗传差异。结论: SNP 位点及特异性鉴别引物可对保健食品铁皮石斛及其混淆品进行快速、简便的鉴别, 通过 *matK* 基因可以分析正品与混淆品之间的亲缘关系。

关键词: 铁皮石斛; *matK* 基因; 单核苷酸多态性; 位点特异性聚合酶链式反应(PCR); 分子鉴别

Molecular Identification and Phylogenetic Analysis of Functional Food *Dendrobium officinale* and Its Adulterants

DING Ge^{1,2}, ZHANG Dai-zhen³, ZHANG Wei-chao⁴, DING Xiao-yu^{2,*}

(1. Chemical and Biological Engineering College, Yancheng Institute of Technology, Yancheng 224003, China;

2. College of Life Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210046, China;

3. Jiangsu Provincial Key Laboratory of Coastal Wetland Bioresources and Environmental Protection, Yancheng 224002, China;

4. Nanjing Institute of Environmental Sciences, Ministry of Environmental Protection, Nanjing 210042, China)

Abstract: To develop a simple and reproducible molecular method to discriminate between functional food *Dendrobium officinale* and its adulterants, PCR products of the *matK* gene were sequenced to find single nucleotide polymorphism (SNP) sites. Then allele-specific PCR primers were designed according to the identified SNP sites. The phylogeny of *D. officinale* and its adulterants were analyzed by Mega 3.0. It was found that *D. officinale* and its adulterants can be discriminated by SNP sites and allele-specific PCR primers. There was apparent genetic difference between all the samples tested. It is concluded that this method can be used to discriminate between *D. officinale* and its adulterants rapidly and accurately.

Key words: *Dendrobium officinale*; *matK* gene; single nucleotide polymorphism; allele-specific PCR; molecular discrimination

中图分类号: Q94

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)02-0141-05

铁皮石斛(*Dendrobium officinale* Kimura et Migo)是我国兰科(Orchidaceae)石斛属(*Dendrobium*)的珍稀濒危特有种, 是加工保健食品“铁皮枫斗”的优质原材料, 是《中国药典》^[1]中记载的适合加工成“枫斗”的五种原材料之一。铁皮石斛具有养阴生津、润肺明目、

抗癌防老等功效^[2], 早在《神农本草经》中就被列为滋补、保健上品, 应用历史悠久。其药理作用是增强机体免疫力、抗肿瘤、抗衰老、抗血小板聚集等^[3]。

“铁皮枫斗”是经过加工的铁皮石斛的干燥茎, 是制作“脉络宁注射液”、“石斛夜光丸”、“复方

收稿日期: 2010-03-02

基金项目: 国家自然科学基金项目(31000142; 30870234); 盐城工学院博士启动基金项目;

盐城工学院科研项目基金项目(XKR2010003)

作者简介: 丁鸽(1982—), 女, 讲师, 博士, 研究方向为植物分子生物学。E-mail: dingzyc@yahoo.com.cn

* 通信作者: 丁小余(1965—), 男, 教授, 博士, 研究方向为植物分子生物学。E-mail: dingge2001@163.com

清咽宁”等复方中药的重要原料^[1,4]。“铁皮枫斗”价格昂贵,一级品售价高达12000~30000元/kg^[5]。由于其良好的药用、保健价值、资源的濒危及高昂的价格^[5],市场上很多石斛属的其他种的石斛均被加工成“枫斗”,作为“铁皮枫斗”的替代品^[2]。因此,急需寻找简便可靠的鉴别方法对原材料进行有效的鉴别,以期对保健食品的功效和安全性提供保障^[6]。

随着分子生物学技术的迅速发展,DNA分子指纹标记技术已广泛应用于中药材的鉴定及食品检测、鉴定等方面的研究^[7-10]。*matK*基因位于叶绿体*trnK*基因的内含子中,编码成熟酶并参与RNA转录体中II型内含子的剪切,广泛应用于中药材的鉴别研究及种群亲缘关系的分析^[8,11-12]。本实验在对铁皮石斛及其混淆品的*matK*基因序列进行研究的基础上,寻找单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)分子标记并设计位点特异性鉴别引物,为保健食品铁皮石斛的鉴定及亲缘关系分析提供分子依据。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

实验所用材料采自我国云南等地,各种植物的种类、来源及GenBank登录号详见表1。

表1 铁皮石斛及其混淆品样本来源及登录号

Table 1 Sources of *D. officinale* and its adulterants and their accession numbers in GenBank

编号	物种	采集地点	样本数量	GenBank登录号
1	铁皮石斛(<i>D. officinale</i>)	广东韶关市	10	EF221847
2	粉花石斛(<i>D. loddigesii</i>)	广西百色市	3	GU565194
3	细叶石斛(<i>D. hancockii</i>)	云南昆明市	3	GU565195
4	玫瑰石斛(<i>D. crepidatum</i>)	云南勐腊县	3	GU565185
5	金钗石斛(<i>D. nobile</i>)	海南海口市	4	GU565186
6	短棒石斛(<i>D. capillipes</i>)	云南西双版纳傣族自治州	2	GU565187
7	兜唇石斛(<i>D. aphyllum</i>)	云南普洱市	2	GU565188
8	流苏石斛(<i>D. fimbriatum</i>)	云南西双版纳傣族自治州	2	GU565189
9	报春石斛(<i>D. primulinum</i>)	云南勐腊县	3	GU565190
10	叠鞘石斛(<i>D. aurantiacum</i>)	云南昆明市	2	GU565191
11	晶帽石斛(<i>D. crystallinum</i>)	广西天峨县	3	GU565192
12	海南石豆兰(<i>Bulbophyllum hainanense</i>)	海南	3	GU565193

Taq DNA聚合酶、dNTP 美国 Promega 公司;引物均由上海生工生物技术公司合成;DNA marker DL2000 (100~2000bp) 南京天为时代科技有限公司。

MJ PTC-200 PCR 仪 美国 MJ Research 公司;GDS-8000 凝胶成像系统 美国 UVP 公司;DYCP-31E 电泳仪 北京市六一仪器厂。

1.2 总 DNA 的提取

取用硅胶干燥的各种植物的叶片和茎,在CTAB法^[13]

的基础上略做改进以提取总DNA,部分材料使用QIAGEN试剂盒进行DNA的提取。

1.3 PCR 扩增

根据滕艳芬等^[14]的扩增石斛属植物的*matK*基因的引物进行该序列的扩增。引物序列为:*matK* F5'-CCT ATATCCGCTACTCCTTC-3';*matK* R5'-CTCA GTGAATTTACCACG-3'。PCR扩增反应在30μL的反应体系中进行。反应液10mmol/L Tris-HCl, pH8.3, 50mmol/L KCl, 1.5mmol/L MgCl₂, *Taq* 酶1U, 4种dNTP各150mmol/L, 2个引物各10pmol/L, DNA模板约100ng。反应在PCR仪上进行,扩增条件:94℃预变性5min,再以94℃变性1min,50℃退火45s,72℃延伸1.5min循环30次,在72℃保温7min。

1.4 序列测定

PCR产物用Vitagene试剂盒纯化,按试剂盒操作指南进行。PCR产物送上海生工生物工程有限公司进行测序。

1.5 DNA 序列数据分析

所测得的所有样品序列均参照GenBank中兰科及石斛属植物的各序列的范围,序列均递交GenBank,登录号见表1。所得的DNA序列输入计算机后,用Clustal X1.8软件对位排列,并辅以人工校对,用MEGA 3.0软件分析各样本间DNA序列的差异。

1.6 位点特异性引物设计及扩增

将所得序列输入计算机,用Clustal X1.8、Mega 3.0软件对位排列,根据变异的碱基位点设计AS-PCR引物来对铁皮石斛及其混淆品进行鉴别。

AS-PCR扩增反应的引物为AS1:5'-TGGAC CGATTTATCGGATTT-3'、AS2:5'-CTC AGTG AATTTACCACG-3'。30μL的反应体系包括1.5mmol/L MgCl₂, 0.8mmol/L dNTPs, *Taq* 酶1U, 2个引物各0.2mmol/L, DNA模板约100ng。反应在PCR仪上进行,循环参数为94℃预变性5min,94℃变性45s,54~60℃退火45s,72℃延伸1.5min,共30个循环后,72℃延伸7min补齐,以ddH₂O代替模板作空白对照。每个反应最少重复3次,以保证其稳定性和可重复性。

2 结果与分析

铁皮石斛及其混淆品的*matK*基因的起始端和终止端参考了GenBank已发表的兰科植物的*matK*序列。铁皮石斛及其混淆品的*matK*序列长度范围为1331~1345bp,长度变异较大,其中铁皮石斛的*matK*序列长度为1340bp;各物种的G+C含量从32.6%到33.1%不等,其中铁皮石斛的G+C含量为32.7%。各样本的*matK*序列长度及碱基含量列于表2。

表3 基于 *matK* 序列的铁皮石斛及其混淆品的遗传距离
Table 3 Genetic distances of *matK* sequences of *D. officinale* and its adulterants

物种	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<i>D. officinale</i>												
<i>D. aurantiacum</i>	0.002											
<i>D. crepidatum</i>	0.013	0.014										
<i>D. nobile</i>	0.007	0.008	0.011									
<i>D. crystallinum</i>	0.011	0.011	0.015	0.009								
<i>D. aphyllum</i>	0.014	0.014	0.018	0.011	0.011							
<i>D. primulinum</i>	0.013	0.013	0.017	0.011	0.011	0.005						
<i>D. loddigesii</i>	0.011	0.011	0.015	0.008	0.011	0.006	0.007					
<i>D. hancockii</i>	0.014	0.014	0.018	0.011	0.011	0.011	0.011	0.012				
<i>D. capillipes</i>	0.018	0.018	0.022	0.015	0.016	0.015	0.016	0.017	0.014			
<i>D. fimbriatum</i>	0.008	0.008	0.012	0.006	0.006	0.005	0.006	0.007	0.005	0.010		
<i>B. hainanense</i>	0.040	0.040	0.045	0.037	0.039	0.036	0.039	0.04	0.036	0.041	0.033	

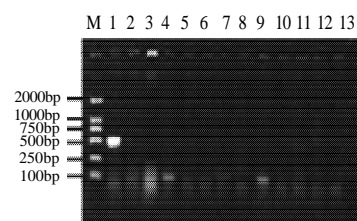
表2 铁皮石斛及其混淆品 *matK* 序列长度及碱基含量
Table 2 Sequence sizes and G + C percents of *matK* in *D. officinale* and its adulterants

物种	含量/%				序列长度/bp	G+C含量/%
	T	C	A	G		
<i>D. officinale</i>	37.5	17.1	29.8	15.6	1340	32.7
<i>D. loddigesii</i>	37.4	17.4	29.5	15.7	1345	33.1
<i>D. hancockii</i>	37.4	17.5	29.6	15.5	1340	33.0
<i>D. crepidatum</i>	37.4	17.6	29.5	15.5	1341	33.1
<i>D. nobile</i>	37.3	17.4	29.6	15.7	1339	33.1
<i>D. capillipes</i>	37.6	17.1	29.8	15.5	1331	32.6
<i>D. aphyllum</i>	37.4	17.4	29.6	15.7	1340	33.1
<i>D. fimbriatum</i>	37.5	17.5	29.4	15.6	1343	33.1
<i>D. primulinum</i>	37.4	17.5	29.6	15.6	1340	33.1
<i>D. aurantiacum</i>	37.5	17.2	29.6	15.7	1340	32.9
<i>D. crystallinum</i>	37.3	17.6	29.6	15.4	1340	33.0
<i>Bulbophyllum hainanense</i>	37.6	16.9	30.0	15.5	1331	32.4

单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP), 是指在染色体基因组水平上由于单个核苷酸的变异而引起的DNA序列多态性, 包括单碱基的转换、颠换、插入及缺失等形式。如上所述, 铁皮石斛及其混淆品之间存在83个SNP位点, 利用这些位点, 可以对保健食品铁皮石斛及其混淆品进行鉴别。

铁皮石斛与其混淆品的 *matK* 序列差异较显著, 同源性为91.8%, 有101个变异位点, 信息位点数为18个, 其中第1015位的碱基在铁皮石斛为T, 在其他混淆品中均为C, 该位点可以作为铁皮石斛与混淆品的种间鉴别的分子标记。根据该SNP位点设计了一对位点特异性(AS-PCR)引物, 所设计的引物为上游引物, 而下游引物与扩增 *matK* 序列的下游引物相同。利用该引物产生的鉴别结果见图1, 在退火温度为54~56℃时, 利用该对鉴别引物, 对所有样本进行位点特异性PCR反应, 结果表明, 只有铁皮石斛能够产生阳性扩增条带, 长度大约为500bp, 而其他所有石斛及石豆兰样品均无扩增

条带产生, 呈阴性扩增。实验表明, 利用这对AS-PCR引物, 可以通过一次PCR即可将铁皮石斛与其混淆品鉴别开, 提高了分子鉴定的速率及效率。



1~12. 数字与表1中植物编号序号相同;
13. 阴性对照; M. DL2000 DNA 标记。

图1 铁皮石斛及其混淆品的AS-PCR鉴定结果
Fig.1 Molecular discrimination of *D. officinale* and its adulterants by AS-PCR

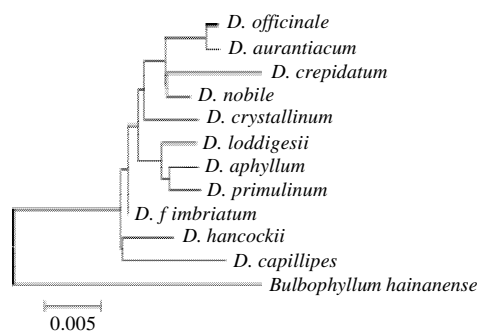


图2 基于 *matK* 序列的铁皮石斛及其混淆品的NJ树
Fig.2 NJ systematic tree based on *matK* sequences of *D. officinale* and its adulterants

利用Clustal X1.8软件比对序列, 然后利用Mega 3.0软件分析各序列间的遗传距离(表3)。从遗传距离来看, 铁皮石斛与叠鞘石斛差异最小为0.002, 而玫瑰石斛与石豆兰的差异最大为0.045, 铁皮石斛与石豆兰的差异为0.04, 与叠鞘石斛与石豆兰的差异相同。基于测序结果, 采用NJ法构建邻接树, 从图2可以看出, 铁皮

石斛与叠鞘石斛首先聚为一支, 然后与玫瑰石斛、金钗石斛及晶帽石斛聚为一支, 粉花石斛、兜唇石斛、报春石斛聚为一支, 其次, 细叶石斛与短棒石斛聚为一支, 与流苏石斛重新聚类, 与石豆兰形成并列的两个大支。分子进化证据表明, 铁皮石斛及其混淆品之间存在不同水平的遗传分化, 以叠鞘石斛与铁皮石斛的遗传距离最近, 金钗石斛次之, 石豆兰最远。

3 讨 论

matK 基因是叶绿体基因组蛋白编码基因中进化速率最快的基因之一, 也是近年来研究较多的一种叶绿体基因, 适合于系统发生、种间遗传关系、种间及居群间的鉴别等研究^[14-18]。在本研究中, 对铁皮石斛及其混淆品的 *matK* 序列进行测定, 发现铁皮石斛及其混淆品的 *matK* 序列长度存在一定差异, 其中铁皮石斛的 *matK* 序列长度为 1340bp。基于 *matK* 序列的铁皮石斛及其混淆品的遗传距离分析(表 3)可以看出, 铁皮石斛与石斛属其他混淆品之间的遗传距离明显小于与石豆兰之间的遗传距离, 此结果与 NJ 邻接树(图 2)的分析结果一致, 即石斛属的所有品种聚为一支, 而石豆兰聚为单独的一支, 从分子水平验证了石斛属内物种的亲缘关系较近, 而石豆兰则与石斛属的植物亲缘关系较远, 与传统分类学的观点一致。

SNP 是近年来出现的第三代遗传标记, 由于具有位点丰富、更高的遗传稳定性、易实现分析的自动化等特点^[19-20], 广泛地应用于疾病检测^[21]、分子育种^[22]及中药材鉴别^[23]等领域。如上所述, 铁皮石斛及其混淆品之间存在 83 个 SNP 位点, 差异显著而稳定。AS-PCR, 又称位点特异性 PCR, 具有操作简单、高效等特点, 被广泛应用于药材及其混淆品、伪品以及保健食品的鉴别研究^[24-28]。利用 *matK* 序列中存在的 SNP 位点, 可以对保健食品铁皮石斛及其混淆品进行有效的分子鉴别, 还可以在单核苷酸变异位点的基础上设计位点特异性引物, 无需测序即可对正品及混淆品进行准确的分子鉴定, 为保健食品的原料鉴别及终端成品鉴别提供理论依据。

保健品铁皮石斛加工的过程当中, 鲜药材茎上的叶片均被去掉, 然后经炭火烘烤揉搓成螺旋形, 再用稻草捆扎定形^[29], 如此的操作过程使经典的鉴别方法不能很好的鉴别铁皮石斛及其混淆品, 使得保健食品的植物来源混乱。当根据植物形态及药材、保健品性状难以鉴别种类时, *matK* 序列是可靠的分子鉴别标记。在我们的研究中, 基于 *matK* 序列差异, 通过 SNP、AS-PCR 方法成功鉴别保健食品铁皮石斛及其混淆品并对其亲缘关系进行分析, 具有简便快捷、重复性好、稳定性强

等特点, 在保健食品原料来源鉴定及终端产品的鉴别等方面有着广阔的应用前景。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 2000 版. 北京: 化学工业出版社, 2000.
- [2] DING Xiaoyu, XU Luoshan, WANG Zhengtao, et al. Authentication of stem of *Dendrobium officinale* by rDNA ITS region sequences[J]. *Planta Medica*, 2002, 68(2): 191-192.
- [3] 管艳红, 马洁, 张丽霞, 等. 西双版纳石斛属药用植物资源[J]. *中国野生植物资源*, 2004, 23(6): 38-39.
- [4] 王康正, 高文远. 石斛属药用植物研究进展[J]. *中草药*, 1997, 28(10): 633-635.
- [5] SHEN Jie, DING Xiaoyu, LIU Dongyang, et al. Intersimple sequence repeats (ISSR) molecular fingerprinting markers for authenticating populations of *Dendrobium officinale* Kimura et Migo[J]. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 2006, 29(3): 420-422.
- [6] 徐海滨, 严卫星. 保健食品原料安全评价技术与标准的研究简介[J]. *中国食品卫生杂志*, 2004, 16(6): 481-484.
- [7] 褚必海, 丁小余, 李雪霞, 等. 保健食品建泽泻及其混淆品的 PCR-RFLP 分子鉴别[J]. *食品科学*, 2007, 28(2): 177-181.
- [8] YANG Dongye, FUSHIMI H, CAI Shaoqing, et al. Molecular analysis of *Rheum* species used as *Rhei Rhizoma* based on the chloroplast *matK* gene sequence and its application for identification[J]. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 2004, 27(3): 375-383.
- [9] DING Ge, XU Guohua, ZHANG Weichao, et al. Preliminary geoherbism study of *Dendrobium officinale* food by DNA molecular markers[J]. *European Food Research and Technology*, 2008, 227(4): 1283-1286.
- [10] 黄东东, 吕振岳, 王庆华, 等. PCR 方法对转基因食品定性检测的研究[J]. *食品科学*, 2002, 23(1): 99-101.
- [11] 刘玉萍, 曹晖, 韩桂茹, 等. 中日产川芎的 *matK*、ITS 基因序列及其物种间的亲缘关系[J]. *药学报*, 2002, 37(1): 63-68.
- [12] 章群. 中药杜仲原植物的分子鉴定[J]. *生态科学*, 2004, 23(2): 141-143.
- [13] DOYLE J J, DOYLE J L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue[J]. *Phytochemical Bulletin*, 1987, 19: 11-15.
- [14] 滕艳芬, 吴晓俊, 徐红, 等. 石斛及其常见混淆品的 *matK* 基因序列比较[J]. *中国药科大学学报*, 2002, 33(4): 280-283.
- [15] 曹晖, 蔡金娜, 刘玉萍, 等. 蛇床子地理分布与叶绿体 *matK* 基因序列的相关性分析[J]. *中国药理学杂志*, 2001, 36(6): 373-376.
- [16] KOMATSU K, ZHU Shu, FUSHIMI H, et al. Phylogenetic analysis based on 18S rRNA gene and *matK* gene sequences of *Panax vietnamensis* and five related species[J]. *Planta Medica*, 2001, 67(5): 461-465.
- [17] TAKAYAMA K, OHI-TOMA T, KUDOH H, et al. Origin and diversification of *Hibiscus glaber*, species endemic to the oceanic Bonin Islands, revealed by chloroplast DNA polymorphism[J]. *Molecular Ecology*, 2005, 14(4): 1059-1071.
- [18] ZHANG Zhiyong, YANG Junbo, LI Dezhu. Phylogenetic relationship of an extremely endangered species, *Pinus squamata* (Pinaceae) inferred from four sequences of the chloroplast genome and ITS of the nuclear ribosomal DNA[J]. *植物学报*, 2003, 45(5): 530-535.
- [19] YOON M S, SONG Q J, CHOI I Y, et al. BARCSoySNP23: a panel of 23 selected SNPs for soybean cultivar identification[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2007, 114(5): 885-899.
- [20] SCHWARZ G, BAUMLER S, BLOCK A, et al. Determination of detection and quantification limits for SNP allele frequency estima-

- tion in DNA pools using real time PCR[J]. Nucleic Acids Research, 2004, 32(4): e24.
- [21] GABRIELLE S S, CHRISTINE G, RICHARD S H. A novel gene for neonatal diabetes maps to chromosome 10p12.1-p13[J]. Diabetes, 2003, 52(10): 2636-2638.
- [22] NASU S, SUZUKI J, OHTA R, et al. Search for and analysis of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in rice (*Oryza sativa*, *Oryza rufipogon*) and establishment of SNP markers[J]. DNA Research, 2002, 9(5): 163-171.
- [23] SASAKI Y, FUSHIMI H, KOMATSU K. Application of single-nucleotide polymorphism analysis of the *trnK* gene to the identification of *Curcuma* plants[J]. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 2004, 27(1): 144-146.
- [24] LIU Zhongquan, WANG Yiquan, ZHOU Kaiya, et al. Authentication of Chinese crude drug, Gecko, by allele-specific diagnostic PCR[J]. Planta Medica, 2001, 67(4): 385-387.
- [25] 刘中权, 王义权, 周开亚, 等. 中药材龟甲及原动物的高特异性 PCR 鉴定研究[J]. 药学报, 1999, 34(12): 941-945.
- [26] SASAKI Y, FUSHIMI H, CAO Hui, et al. Sequence analysis of Chinese and Japanese *Curcuma* drugs on the 18S rRNA gene and *trnK* gene and the application of amplification refractory mutation system analysis for their authentication[J]. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 2002, 25(12): 1593-1599.
- [27] YANG Dongye, FUSHIMI H, CAI Shaoqing, et al. Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) and amplification refractory mutation system (ARMS) analyses of medicinally used *Rheum species* and their application for identification of *Rhei Rhizoma*[J]. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 2004, 27(5): 661-669.
- [28] LI Xuexia, DING Xiaoyu, CHU Bihao, et al. Molecular authentication of *Alisma orientale* by PCR-RFLP and ARMS[J]. Planta Medica, 2007, 73(1): 67-70.
- [29] 丁小余, 徐珞珊, 王峥涛, 等. 铁皮石斛居群差异的研究(I): 植物体形态结构的差异[J]. 中草药, 2001, 32(9): 828-831.