

珍稀中草药金线莲的 RAPD 研究[△]

厦门市药品检验所(厦门 361012) 胡珊梅* 张启国 袁文杰
厦门大学生命科学院 周涵韬 周兴旺 陈鹭真

摘要 为了鉴别金线莲的品种,探索同属植物之间的亲缘关系及同种植物不同产地的遗传变异,并制定正品金线莲的 DNA 指纹图谱,采用随机扩增多态 DNA(RAPD)技术对兰科开唇兰属植物花叶开唇兰 *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl.、台湾开唇兰 *A. formosanus* Hay. 进行了鉴定,结果选择的 7 个引物对 3 个品种共扩增出 98 个位点,其中 3 个引物为高特异性引物。结论 RAPD 技术不仅能鉴别种间差异,而且能揭示同种不同产地植物的遗传变异。

关键词 RAPD 标记 金线莲 遗传变异

Studies on Valuable and Rare Chinese Herbs *Anoectochilus roxburghii* by DNA Fingerprintings Using RAPD

Xiamen Institute for Drug Control (Xiamen 361012) Hu Shanmei, Zhang Qiguo and Yuan Wenjie
College of Life Science, Xiamen University Zhou Hantao, Zhou Xingwang and Chen Luzhen

Abstract In order to explore the consanguinity of plants of genus *Anoectochilus* Bl. (Orchidaceae), and to distinguish *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl. from two different localities, Fujian and Guangxi Province, and *A. formosanus* Hay as to their genetic variance, DNA fingerprintings were analysed with the aid of RAPD. Results showed that 7 primers amplified a total of 98 sites for the 3 species. 3 of the 7 primers were highly specific for genuine *A. roxburghii*. Thus, the 3 species could be distinguished according to the bonding pattern of their amplified DNA on agarose gel. It was concluded that the method may be of value for the authentication of different species and same species of *Anoectochilus* Bl. from different localities.

Key words RAPD marker *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl. (Jin Xian Lian) genetic variation

金线莲为兰科开唇兰属植物,是福建和台湾民间常用的多年生珍稀草药。其性平、味甘,具有清热凉血、祛风利湿等功效。广泛用于治疗肝炎、肾炎、肺炎、小儿惊风高热、糖尿病、风湿病等。近年来金线莲的神奇功效倍受人们的关注,享有“药之王”、“金草”等美称。主要药用品种为花叶开唇兰(福建产者习称福建金线莲、广西产者称为广西金线莲)和台湾开唇兰(药材称为台湾金线莲)。福建是我国野生金线莲分布区域之一。由于近年来的大量采集,天然资源日趋枯竭,已列为濒危药用植物,目前栽培获得成功^[1,2]。另据化学成分初步分析报道,金线莲主要含有多糖、微量元素^[3]、强心甘类^[4]及氨基酸等多种成分^[5]。台湾的 Cheng 等曾对 *Anoectochilus formosanus* 及 *A. koshunensis* 进行了 RAPD 鉴定研

究^[6],并进行了二者的杂交,用了 8 个引物,获得 19 种 RAPD 标记。其中 9 种为 *A. formosanus* 的特异位点,10 种为 *A. koshunensis* 的特异位点。有关 *A. roxburghii* 与 *A. formosanus* 亲缘关系的分子标记方面的研究及金线莲同种不同产地的遗传变异的研究未见报道。金线莲药材为无花的全草,药材为干品,性状上难以鉴别。郑纯等曾做过福建金线莲和广西金线莲的生药鉴定,但用传统的形态组织学无法区别二者遗传上的差异^[4],香港的 Zhang 等成功的应用分子标记技术对不同产地的党参进行了鉴定,结果证明 RAPD 技术是鉴定地道药材的有效方法^[7]。近年来随着分子标记技术的发展,中药鉴定的水平逐步从形态组织学、化学水平提高到分子水平,因为后者更能代表基因多态性的变异类型的遗传标

* Address: Hu Shanmei, Xiamen Institute for Drug Control, Xiamen

胡珊梅 女,1957 年生。副主任药师,药学硕士。1982 年江西中医学院中药专业本科毕业,1991 年江西中医学院药学系天然药物资源鉴定与开发专业获硕士学位。从事天然药物的鉴定与开发研究多年,着重进行了江西地道药材江香薷的生药学研究,并对其他香薷类一并进行了全面系统的比较鉴定,1994 年获国家中医药管理局中医药科技进步三等奖。自 1997 年以来,主要应用分子生物学技术对名贵中药材及地道药材进行鉴定,发表论文 10 余篇。

[△]厦门市卫生局医学科学技术进步基金资助项目

记^[8]。因此,对以上主要药用品种福建金线莲、广西金线莲和台湾金线莲作了分子标记研究,探索三者之间的亲缘关系及遗传变异,有利于指导栽培、资源保护、合理利用开发,为金线莲的品种鉴别及正品DNA指纹图谱的制定提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 植物材料:a)福建金线莲 *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl. 福建永安,野生。b)广西金线莲 *A. roxburghii* (Wall.) Lindl. 福建热带作物技术研究所从广西引种的组培苗,漳州五峰。c)台湾金线莲 *A. formosanus* Hay. 福建热带作物技术研究所从台湾引种的组培苗,漳州五峰。

1.2 DNA提取分离:取新鲜叶片0.5 g于液氮中研成细粉,迅速倒入预热至60℃盛有CTAB提取液(100 mmol/L Tris-HCl, 20 mmol/L EDTA, 1.4 mol/L NaCl, 临用前加入2% CTAB, 1% β -巯基乙醇)的5 mL离心管中,摇匀,60℃保温60 min;取出,离心10 min(15 000×g),倾出上清液,加入等体积氯仿-异戊醇(24:1)抽提约60 min,轻轻颠倒混匀,离心10 min(15 000×g);吸取上清液,加入2/3体积的异丙醇,混匀,-20℃沉淀30 min;离心10 min(15 000×g),倾去上清液,70%乙醇洗涤2次,挥干乙醇,加入400 mL TE(10 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA, pH 8.0)溶液溶解;加入RNA酶至终浓度为50 ng/mL,37℃保温60 min;等体积苯酚-氯仿(1:1)抽提一次,离心10 min(15 000×g),定量吸取上清液,加入1/10体积3 mol/L 醋酸钠和2倍量无水乙醇,混匀,-20℃沉淀60 min;离心10 min(15 000×g),70%乙醇洗涤2次,挥干乙醇,加入100 mL TE溶液溶解,部分作定性定量用,其余4℃储存备用。

1.3 PCR反应:扩增总体积25 μ L,其中2.5 μ L 10×buffer, Mg^{2+} 2 mmol/L, dNTP 0.1 mmol/L, 引物15 ng, DNA模板80 ng, 0.5单位Taq酶,水10.5 μ L。

在T₃型PCR仪(德国Biometra)上扩增,扩增程序为94℃,1 min;36℃,1 min;72℃,2 min;40个循环,最后72℃延伸7 min。扩增产物20 μ L在1.5%琼脂糖凝胶电泳中,经EB染色,凝胶成像系统(GDS8000,英国UVP)照相并打印。见表1。

2 结果与分析

实验选择了7个扩增多态性好的引物,对3个品种的DNA分别进行了扩增,得到清晰稳定的特征条带。所用7个引物共检出98个位点,各引物产

表1 RAPD所用引物名称及其序列

引物名称	序列 5'→3'
OPH13	GACGCCACAC
OPH15	GGCGCAGAAT
OPG2	GGCACTGAGG
OPH3	AGACGTCCAC
OPH17	CACTCTCTCTC
OPH19	CTGACCAGCC
OPH20	GGGAGACATC

生的标记数在1~7之间。其中引物OPH15对福建金线莲扩增出4条带,另两种则与之不同,广西金线莲为7条带,台湾金线莲为5条带;OPH17及OPH19对3个品种扩增出的条带各具有特异性,能用于这3个品种的鉴别。对不同样品所扩增DNA条带量化为1或0(条带存在为1,条带不存在为0)输入RAPD分析软件,得到任意两个样品间的遗传距离。福建金线莲与广西金线莲的遗传距离为0.2,与台湾金线莲的遗传距离为0.45,广西金线莲与台湾金线莲则为0.95(图1,表2和图2)。

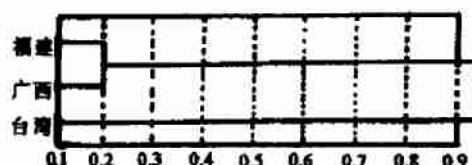


图1 三种金线莲分子聚类图

表2 遗传距离相似性矩阵

	福建	广西	台湾
福建	0		
广西	0.2	0	
台湾	0.45	0.95	0

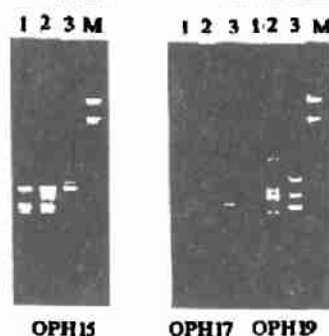


图2 3种引物对不同种样品的扩增图谱

3 小结与讨论

福建金线莲与广西金线莲的遗传距离为0.2,基本上可认为是同种植物,并且二者在形态上比较相似,只是产地不同,广西金线莲植株较大,产量高。本研究结果与郑纯和陈裕等的结论基本上是一致的。

的^[4,11],但用同一种引物对二者扩增出的位点有差异,并且遗传距离不为零,说明二者长期受不同地区的气候、土壤等多种生态环境的影响,已经产生了遗传变异,在栽培或组织培养选苗种时,可优先选广西金线莲,以提高产量。台湾金线莲与福建金线莲的遗传距离为 0.45,而与广西金线莲则为 0.95,表明遗传关系的远近与地理距离的远近有密切关系。引物 OPH15、OPH17、OPH19 可作为这 3 个品种的高特异性引物,用这几种鉴别引物对样品的 DNA 进行

PCR 反应,经琼脂糖凝胶电泳,与标准指纹图谱对照,就可准确鉴别样品的品种及真伪。

参考文献

- 1 陈 裕,林坤瑞,管其宽,等. 亚热带植物通讯,1994,23(1):46
- 2 江海燕,王 建. 中医药研究,1997,13(2):51
- 3 赖应辉,吴锦忠. 中药材,1997,20(2):84
- 4 郑 纯,黄以忠,潘 馨,等. 中药材 1997,20(11):552
- 5 王振登. 福建中医学院学报,1993,3(2):100
- 6 Cheng K T, Fu L C. Planta Med, 1998, 64:46
- 7 Zhang Y B, Ngan F G. Planta Med. 1999, 65:157
- 8 曹 辉,刘玉萍. 中国药学杂志,1998,33(5):269

(2000-03-12 收稿)

广金钱草栽培品与野生品的质量比较

湛江市药品检验所(524037) 王其新*

湛江吉民药业股份有限公司 林振洪 林海青

摘 要 比较广金钱草栽培品与野生品的质量。用薄层色谱法和紫外分光光度法对其主要质量指标进行定性定量研究,结果两者无明显差异。

关键词 广金钱草 栽培品 野生品 质量比较

Comparison of Quality Between Cultivated and Wild Species of *Desmodium styracifolium*

Zhanjiang Institute for Drug Control (Zhanjiang 524037) Wang Qixin

Zhanjiang Jimin Pharmaceutical Ltd. Lin Zhenhong and Lin Haiqing

Abstract To compare the quality of cultivated species with wild species of *Desmodium styracifolium* (Osbeck) Merr. TLC and UV were used to study their qualities. Results showed that there was no obvious difference between them.

Key words *Desmodium styracifolium* (Osbeck) Merr. cultivated species wild species quality comparison

广金钱草 *Desmodium styracifolium* (Osbeck.) Merr. 是传统的常用中药之一,具有清热除湿,利尿通淋的功效。过去使用的广金钱草都是野生品,随着用药量的不断增大,药源日趋贫缺,自 70 年代起已广泛开始人工栽培,现以雷州半岛的产量最大,成为商品药材的主要来源。至于栽培品与野生品的质量有无差异,目前尚无报道。为此,我们通过薄层色谱法和紫外分光光度法对其主要质量指标进行定性定量研究,为临床使用和质量标准的制订提供了依据。

1 实验材料

1.1 样品来源:广金钱草栽培品和野生品药材分别

由徐闻、海康、遂溪、廉江等市县药检所提供,有的样品采自湛江市郊,经作者鉴定为豆科植物广金钱草 *Desmodium styracifolium* (Osbeck.) Merr. 的干燥全草。

1.2 仪器、试剂:紫外分光光度计为日本岛津产 UV265 型;硅胶 G 是青岛海洋化工厂生产;芦丁对照品购于中国药品生物制品检定所;其他所用试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 薄层色谱:称取样品粗粉 2 g,加 50% 乙醇 50 mL,加热回流 30 min,放冷,滤过,滤液蒸至约 20 mL,放冷,用水饱和正丁醇振摇提取 2 次(20, 20

* Address: Wang Qixin, Zhanjiang Institute for Drug Control, Zhanjiang

王其新 男,1973 年毕业于中山大学药用植物学专业。现任湛江市药品检验所中药室主任,主任中药师。擅长生药学、中药鉴定学和植物化学。连续参加三版中国药典部分药品标准的起草和修订工作,对草豆蔻的薄层色谱鉴别进行了系统的研究。所建立的薄层色谱法被中国药典采用。编著著作 1 本,获广东药学院科技进步二等奖 1 项,发表科学论文 28 篇,取得“壮骨口服液”发明专利 1 项。