

增多,扩增片段大小集中在 250~2 000 bp;在新鲜样品中扩增较弱的片段,尤其是一些大片段,在干燥样品中基本扩增不出来,而在新鲜样品中扩增较强的片段在干燥样品中依然能有效扩增。这是由于绞股蓝作为中草药,入药前的加工步骤造成了 DNA 不同程度的降解。这也进一步说明要利用 RAPD 技术鉴定中药材,要考虑到新鲜药材和干药材 RAPD 指纹图谱的差别。若是想将 RAPD 标记转化为 sequence characterized amplified regions (SCAR) 标记,应针对是新鲜药材和干药材共有的特异条带。

王培训^[13]等在利用 RAPD 技术对南北五味子进行鉴别的研究中发现,以醋制南五味子为模板,各条引物的 PCR 产物电泳图谱见不到 PCR 产物。在中药过程炮制中某些需要经过高达 150 °C 的高温处理,导致 DNA 严重降解且 DNA 双链分子之间形成共价键,从而得不到 PCR 产物。而新鲜绞股蓝只需干燥后即可入药,其干药材的 DNA 降解程度较轻,在本研究所采用的 17 份绞股蓝干燥样品中,均可得到 PCR 产物。

在后续研究中,我们首先将针对此段 DNA 序列设计特异引物,将其转化为稳定的 SCAR 标记,增加扩增结果的稳定性和可重复性,从而将此特异 DNA 片段应用于绞股蓝的鉴定。

致谢:广西药用植物园凌征柱研究员、广西中医药

研究院何开家研究员为本研究鉴定并提供部分样品。

参考文献:

- [1] 刘世彪,胡正海. 绞股蓝生物学的研究进展 [J]. 中草药, 2005, 36(1): 144-146
- [2] 姜彬慧,杨万春,赵余庆. 绞股蓝抗肿瘤作用研究现状 [J]. 中药材, 2003, 26(9): 683-685
- [3] Megalli S, Aktan F, Davies N M, et al. Phytopreventative anti-hyperlipidemic effects of gynostemma pentaphyllum in rats [J]. J Pharm Pharm Sci, 2005, 8(3): 507-515
- [4] 刘国辉,姚丹丹,卢佳怡,等. 绞股蓝对 D-半乳糖所致亚急性衰老大鼠下丘脑的抗衰老作用及其机制研究 [J]. 医学理论与实践, 2006, 19(5): 497-499
- [5] Huang W C, Kuo M L, Li M L, et al. Extract of *Gynostemma pentaphyllum* enhanced the production of antibodies and cytokines in mice [J]. Yakugaku Zasshi, 2007, 127(5): 889-896
- [6] 王太霞,李金亭,李景原,等. 绞股蓝与乌菰药用部分的显微鉴别 [J]. 中草药, 2003, 34(5): 465-467
- [7] 曹亮,李顺祥,魏宝阳,等. 吴茱萸 RAPD 体系构建及道地性遗传背景研究 [J]. 中草药, 2010, 41(6): 975-978
- [8] 赵良贵,南晓洁,郝媛媛,等. 柴胡栽培种的 RAPD 和 AFLP 遗传关系研究 [J]. 中草药, 2010, 41(1): 113-117
- [9] 樊洪泓,李廷春,邱婧,等. 石斛属几种植物遗传关系的 SRAP 和 RAPD 比较分析 [J]. 中草药, 2010, 41(4): 627-632
- [10] 李雄英,罗育,吴耀生,等. RAPD 技术在药用植物绞股蓝鉴别中的初步研究 [J]. 武汉植物学研究, 2008, 26(3): 251-254
- [11] 黄健华,苗雪霞,李木旺,等. 家蚕基因特异性 CAPs 标记获得及其分子系统学应用 [J]. 遗传, 2005, 27(4): 584-588
- [12] 汪小全,邹玉苹,张大明. RAPD 应用于遗传多样性和系统学研究中的问题 [J]. 植物学报, 1996, 38(12): 954-962
- [13] 王培训,李劲平,周联,等. 南、北五味子的 RAPD 鉴别研究 [J]. 中药新药与临床药理, 2002, 13(2): 98-99

毛钩藤和无柄果钩藤的 ITS 序列分析研究

朱爽¹,周林¹,黄楷鸿¹,黄宏靓¹,高晓霞²,曾常青^{3*}

(1 广东药学院生命科学与生物制药学院,广东 广州 510006; 2 广东药学院药科学院,广东 广州 510006;

3 广东药学院中药学院,广东 广州 510006)

摘要:目的 以核糖体转录间隔区(rDNA ITS)序列为分子标记,对钩藤属的 2 种常用中药材毛钩藤 *Uncaria hirsute* 和无柄果钩藤 *U. sessilif ructus* 进行遗传分析,阐明钩藤属内不同种间的分子系统发育关系。方法 通过改良 CTAB 法对毛钩藤和无柄果钩藤进行总 DNA 提取,利用通用引物对 rDNA ITS 序列进行 PCR 扩增,RFLP 分析和序列测定,用 PAUP 软件进行系统发育分析,构建最大简约树。结果 获得毛钩藤和无柄果钩藤的限制性内切酶(*Msp* I & *Hae* III)酶切图谱以及 rDNA ITS 区的完整序列,其序列长度均为 718 bp。结论 通过基于 rDNA ITS 序列进行 RFLP 分析、序列测定和系统发育树构建的分子生物学方法,能够对钩藤属植物进行准确的分子鉴定,为钩藤属中药材的种类鉴定和种间的分类地位提供分子生物学依据。

关键词:毛钩藤;无柄果钩藤;ITS 序列

中图分类号:R284.1

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2010)10-1696-05

①收稿日期:2010-03-08

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30800227)

作者简介:朱爽(1977—),男,讲师。Tel/Fax: (020) 39352201 E-mail: wenchengji@yahoo.com.cn

* 通讯作者 曾常青 Tel/Fax: (020) 39352181 E-mail: gdzcq@163.com

ITS Sequence analysis of *Uncaria hirsute* and *Uncaria sessilifructus*ZHU Shuang¹, ZHOU Lin¹, HUANG Kai-hong¹, HUANG Hong-liang¹,
GAO Xiaoxia², ZENG Chang-qing³

(1 School of Life Science and Biopharmacology, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China

2 School of Pharmacy, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China; 3 School
of Chinese Materia Medica, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

Abstract: Objective In order to clarify the phylogenetic relationships between the different species of *Uncaria* Schred, genetic analysis was carried out for *Uncaria hirsute* and *U. sessilifructus* by using the rDNA ITS sequence as molecular marker. **Methods** Total DNA was extracted with modified CTAB method and thereby rDNA ITS regions were amplified with common primers. The rDNA ITS amplicon was characterized by RFLP, sequencing and phylogenetic analyses using PAUP by maximum parsimony. **Results** The *Msp* I- and *Hae* III-based RFLP patterns of rDNA ITS from *U. hirsute* and *U. sessilifructus* were obtained, where the resultant entire sequences of rDNA ITS region were both 718 bp. **Conclusion** Based on molecular biology methods of rDNA ITS sequence analysis, accurate molecular identification could be performed on traditional Chinese medicinal material plants in *Uncaria* Schred and provide molecular evidence for taxonomy and identification of different species in *Uncaria* Schred.

Key words: *Uncaria hirsute* Havil.; *Uncaria sessilifructus* Roxb.; ITS sequence

钩藤为茜草科钩藤属植物, 主要分布于我国广西、贵州、云南、广东等西南地区, 为中医常用药, 药用历史悠久, 《中国药典》2005 年版规定钩藤为茜草科植物钩藤 *Uncaria rhynchophylla* (Miq.) Jack.、大叶钩藤 *U. macrophylla* Wall.、华钩藤 *U. sinensis* (Oliv.) Havil.、毛钩藤 *U. hirsute* Havil. 和无柄果钩藤 *U. sessilifructus* Roxb. 5 种药材。化学成分研究表明, 钩藤中主要有效成分为生物碱, 但不同种的药效成分有明显的差别^[1]。目前, 中药钩藤的分类鉴定主要依据形态学、组织学和化学成分等传统分析方法, 由于这些方法的局限性, 钩藤药材在市场上的分类鉴定比较混乱, 在药材使用上存在互混、互代、以次充好等现象, 影响了用药的安全性和有效性^[2]。为了更安全、准确地使用钩藤属中药材, 有必要运用分子生物学技术进一步对钩藤属种间进行鉴定。分子生物学技术已在药用植物的分子系统发育分析中广泛地应用^[3-5], 但对钩藤属植物的资源调查和种间分子鉴定等基础研究工作还少有报道, 仅有陶刚曾对贵州中药材钩藤属植物进行分子鉴定并归类到属^[6-7]。本研究采用分子生物学技术, 以核糖体转录间隔区 (rDNA ITS) 序列为分子标记, 对钩藤属 2 种常用中药材毛钩藤和无柄果钩藤 rDNA ITS 序列进行限制性片段长度多态性 (restriction fragment length polymorphism, RFLP) 分析和序列测定, 构建其系统发育树, 从遗传本质上对钩藤属 2 种常用中药材的分类地位和种间鉴定提供分子证据。

1 材料来源与鉴定

实验用的毛钩藤 *Uncaria hirsute* Havil. 采自广东肇庆鼎湖山中科院树木园, 无柄果钩藤 *U. sessilifructus* Roxb. 采自广东广州华南植物园, 均由广东药学院曾常青教授提供并鉴定。采集新鲜的叶片, 48 h 内进行钩藤总 DNA 提取, 或直接放进含有硅胶的密封袋中快速干燥备用。

2 仪器和试剂

PCR 仪型号为 Applied Biosystems (2720 Thermal cycler PCR), HH-1 数控恒温水浴锅, TP-402 电子分析天平, SW-CJ-1F 清洁工作台, SPX 智能型生化培养箱, TGL-16G 系列离心机, BG-SubMIDI 水平电泳仪, Tanon-4100 全自动数码凝胶图像分析系统。

引物由上海生工生物工程公司合成, DNA 凝胶回收试剂盒 (上海碧云天 Beyotime 公司), SYBR Green I 电泳染料 (北京百泰克生物技术有限公司), pMD18-T Vector, rTaq 酶、限制性内切酶 (大连宝生物工程股份有限公司 TaKaRa), 其余试剂均为分析纯。

3 方法

3.1 改良 CTAB 法提取总 DNA: 称取 0.5 g 的新鲜叶片, 放进预冷的研钵中, 加入适量的液氮并研磨成粉末。按每 1 g 样品加入 5 mL 的 65 °C 预热 CTAB 裂解液 (4% CTAB, 100 mmol/L Tris · Cl, 25 mmol/L EDTA, 1.4 mol/L NaCl, 2% β-巯基乙醇, 1% PVP, pH 8.0), 每 1 mL 混合液分装到 1.5

mL Eppendorf 管中,充分混匀;65 ℃温浴 2 h(每隔 15~20 min 颠倒振荡 1 次),离心 5 min($12\,000 \times g$, 4 ℃),取上清液,用等体积的 Tris 饱和酚抽提 2 次,酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)和氯仿:异戊醇(24:1)各抽提 1 次,离心 10 min($12\,000 \times g$, 4 ℃),取上清液,先加入 NaAc(pH 5.2),使溶液终质量分数为 0.3 mol/L,再加入 2.5 倍体积的无水乙醇,−20 ℃沉淀 1 h,吸出 DNA 至 1.5 mL 的 Eppendorf 管中,用 70% 冷乙醇 1 mL 漂洗 2 次,无水乙醇洗涤 1 次,干燥后溶于 50 μ L 无菌 TE 缓冲液中,−20 ℃保存备用。

3.2 PCR 扩增:选择扩增植物 rDNA ITS 序列的通用引物^[8,9] ITS5(5′ GGAAGTAAAAGTCTGAA-CAAGG3′)和 ITS4(5′ TCCTCCGCTTATTGATATGC3′)对钩藤总 DNA 进行 rDNA ITS 序列的扩增。在 20 μ L 的 PCR 反应体系中含有 10 $\times$ Buffer 2 μ L(含 MgCl₂, 2.5 mmol/L), dNTP(10 mmol/L) 0.4 μ L,引物量为 10 pmol, *rTaq*(5 U/ μ L) 0.2 μ L,约 50 ng 的模板 DNA,其余体积以无菌超纯水补足。PCR 扩增条件为:95 ℃预变性 3 min,94 ℃变性 1 min,52 ℃退火 50 s,72 ℃延伸 50 s,35 个循环,72 ℃延伸 10 min。

3.3 PCR 产物的纯化、连接及转化:PCR 扩增产物采用 DNA 凝胶回收试剂盒进行割胶回收。钩藤 rDNA ITS 序列的 PCR 扩增产物(大约 720 bp)从 1% 的琼脂糖凝胶中割胶纯化。纯化产物连接到 pMD18-T-Vector,连接产物转化到 *Escherichia coli* JM109 感受态细胞,进行氨苄青霉素选择和蓝白斑的筛选。

3.4 菌落 PCR 及酶切分型:含有插入片段的单克隆用引物对 ITS5 和 ITS4 进行菌落 PCR。PCR 产物接着用来进行限制片段长度多态性(RFLP)分析,分别用 2 种限制性内切核酸酶(*Msp* I 和 *Hae* III)37 ℃恒温水浴 1.5 h。酶切 DNA 片段用 2% 琼脂糖凝胶电泳分离,经 SYBR Green 染色后,用 Tanor 4100 全自动数码凝胶图像分析系统扫描成相,得到 DNA 带型图谱进行比较分析电泳结果。

3.5 测序及序列分析:挑取单克隆菌液送交华大基因科技股份有限公司进行测序。测序得到的序列通过与国际基因数据库(GenBank)中已有的 ITS 区序列进行比较分析,得到该序列大概的分子系统发育关系。DNA 序列之间的比较分析通过 Bioedit 软件完成。通过 Clustal X 程序(版本 1.8)进行序列的比对。应用 PAUP 软件(版本 4.0b10),使用最大简约法

(maximum parsimony, MP) 计算及构建系统进化树,用 Bootstrap 值(1 000 bootstraps)检验系统树上各节点的置信水平。使用 Treeview 查看。

4 结果与讨论

4.1 钩藤总 DNA 的提取结果:用 50 μ L TE 回溶钩藤的总 DNA,取 3 μ L 总 DNA 样品,用 SYBR Green I 染色 10 min 后进行 1% 琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像系统记录结果见图 1。可以看出,2 个总 DNA 样品主带清晰,片段完整性好。

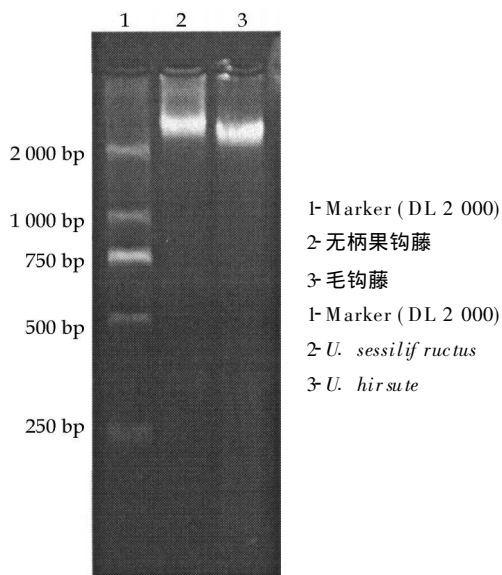


图1 总 DNA 样品的琼脂糖凝胶电泳图

Fig 1 Agarose gel electrophoresis of total DNA samples

4.2 钩藤 rDNA ITS 序列 PCR 扩增结果:以提取的总 DNA 为模板,模板浓度按 1、10、 10^2 、 10^3 、 10^4 倍的梯度稀释后进行 rDNA ITS 序列 PCR 扩增。模板浓度梯度扩增结果表明,可进行钩藤 rDNA ITS 序列 PCR 扩增的模板浓度范围在 $1 \times 10^2 \sim 1 \times 10^4$ 。

在最佳模板浓度下,钩藤 rDNA ITS 序列 PCR 扩增产物的 1% 琼脂糖凝胶电泳结果见图 2。可知,钩藤 rDNA ITS 序列 PCR 产物主条带清晰,非特异扩增条带少,大小约为 718 bp。由此可见,在最佳的模板浓度下,可以减少钩藤中生物碱等抑制物对 PCR 的不利影响。

4.3 酶切分型结果:如图 3 所示,泳道 1 和 4 分别是用核酸限制性内切酶 *Msp* I 对无柄果钩藤和毛钩藤 rDNA ITS 序列 PCR 扩增产物进行消化后得到的 RFLP 带型图谱,可以明显地把这两种钩藤区分开。同样地,泳道 2 和 5 分别是用核酸限制性内切酶 *Hae* III 对无柄果钩藤和毛钩藤 rDNA ITS 序列 PCR 扩增产物消化后得到的 RFLP 带型图谱,也

- 草药, 2007, 38(6): 911-914
- [5] 赵国平, 新关稔, 石川隆二, 等. 中日当归属药用植物 ITS 序列分析 [J]. 中草药, 2006, 37(7): 1072-1076
- [6] Sylvain G R, Birgitta B. Phylogeny and classification of *Naurcleeae* S. L. (Rubiaceae) inferred from molecular (ITS, rBCL, and tRNT-F) and morphological data [J]. *Am J Bot*, 2002, 89: 1027-1041
- [7] 陶刚, 刘涛, 朱英, 等. 贵州中药材钩藤属植物的分子鉴定 [J]. 中药材, 2008, 31(6): 825-828
- [8] Innis M A, Gelfand D H, Sninsky J J, *et al*. *PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications* [M]. San Diego: Academic Press, Inc. C A. 1990
- [9] Chou S J, Yen J H, Fang C L, *et al*. Authentication of medicinal herbs using PCR amplified ITS2 with specific primers [J]. *Planta Med*, 2007, 73: 1421-1426
- [10] Alvarez L, Wendel J F. Ribosomal ITS sequence and plant phylogenetic inference [J]. *Mol Phylogenet Evol*, 2003, 29: 417-434

决明种子硬实及萌发特性研究

张春平¹, 何平^{1*}, 杜丹丹¹, 喻泽莉¹, 韦品祥¹, 胡世俊²

(1 西南大学生命科学学院 三峡库区生态环境教育部重点实验室, 重庆市三峡库区植物生态与资源重点实验室, 重庆 400715; 2 中国科学院昆明植物研究所, 云南 昆明 650204)

摘要: 目的 通过对决明种子硬实和萌发特性的研究, 找到打破种子硬实、提高种子萌发率的适宜条件。方法 观察种子外部形态, 对决明种子长宽、千粒质量、净度、硬实率、含水量和吸水率进行测定, 通过研磨、预先冷冻和热水处理, 找到破除种子硬实的方法, 考察不同温度、不同质量浓度化学物质对种子萌发率的影响。结果 决明种子含水量为 10.43%, 未经处理的种子吸水率为 45.82%, 经过研磨处理和浓硫酸处理的种子吸水率分别为 154.2%、159.7%。经过 98% 浓硫酸处理 20 min 后的种子发芽率为 99.8%, 变温下 (25℃、14 h/15℃、10 h) 种子萌发率为 98.7%, 200 mg/L GA₃ 和 200 mg/L PEG 处理后的萌发率分别为 100% 和 98.9%, 较高质量浓度的 NNA 和 6-BA 对种子萌发具有明显的抑制效应。结论 种皮硬实是限制种子萌发的主要因素, 98% 的浓硫酸浸泡 20 min 可以较好地打破决明种子硬实, 200 mg/L GA₃ 和 200 mg/L PEG 能在短时间内显著提高种子的萌发率, 最佳萌发温度为 25℃, 14 h/15℃, 10 h。

关键词: 决明; 种子硬实; 吸水率; 萌发率

中图分类号: R282.2

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2010)10-1700-06

Study on hardness and germination characteristic of *Cassia obtusifolia* seeds

ZHANG Chun-ping¹, HE Ping¹, DU Dan-dan¹, YU Ze-li¹, WEI Pin-xiang¹, HU Shi-jun²

(1 Key Laboratory (Ministry of Education) of Eco environments of Three Gorges Reservoir Region, Chongqing Key Laboratory of Plant Ecology and Resources Research for Three Gorges Reservoir Region, School of Life Sciences, Southwest University, Chongqing 400715, China; 2 Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650204, China)

Abstract: Objective To break the seed hardness and improve the germination rate of the *Cassia obtusifolia* seeds, hardness and germination characteristic of *C. obtusifolia* seeds were studied. **Methods** Several physiological indexes like the weights per thousand seeds, pure rate, hard rate, content of moisture, and the rate of water absorption were measured. Methods of soaking in hot water, pre-freezing, immersing seed in H₂SO₄, and mechanical abrasion with coarse sand were used in the experiment. And the germination rate of *C. obtusifolia* seeds was determined under different temperature and different concentration of chemistry matter treatment. **Results** The content of moisture in *C. obtusifolia* seeds was 10.43%, the rate of water absorption (untreated) was 45.82%, the rate of water absorption treated by mechanical abrasion and H₂SO₄ were 154.2% and 159.7%, respectively. The rate of water absorption was 99.8% by the treatment of H₂SO₄ within 20 min. The germination rate under the alteration treatment of

①收稿日期: 2010-02-13

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30070080)

作者简介: 张春平 (1982—), 男, 山东潍坊人, 博士, 主要从事植物资源学与植物分子生物学等方面的研究。

Tel: 13667652727 E-mail: chunpingzhang520@163.com

* 通讯作者 何平 Tel: (023) 68254122 E-mail: heping196373@126.com