

道地药材建泽泻的 RAPD研究

胡珊梅¹,周涵韬²,张启国¹,阮元彬²

(1. 厦门市药品检验所,福建 厦门 361012; 2. 厦门大学生命科学学院,福建 厦门 361000)

摘要: 目的 为了探讨道地药材与非道地药材之间遗传变异的大小,并建立道地药材的品质鉴定方法。方法 运用了随机扩增多态 DNA (RAPD) 技术,对福建、江西、四川产的泽泻科植物泽泻 *Alisma orientalis* 进行了研究。结果 同种异地药材所形成的不同的居群,具有不同的遗传特征。结论 RAPD 技术可作为鉴别道地药材的参考方法。

关键词: 泽泻;道地药材;RAPD;居群;遗传变异

中图分类号: R282.2 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2002)02-161-02

Studies on DNA fingerprint of genuine Chinese herbs *Alisma orientalis* by RAPD

HU Shan-mei¹, ZHOU Han-tao², ZHANG Qi-guo¹, RUAN Yuan-bin²

(1. Xiamen Institute for Drug Control, Xiamen Fujian 361012, China; 2. College of Life Science, Xiamen University, Xiamen Fujian 361000, China)

Abstract Object To research genovariations between genuine Chinese herbs and non-genuine ones and to develop a valuable tool used in identification of the Chinese herb. **Methods** RAPD technique was applied in studies on the samples of *Alisma orientalis* (Sam.) Juzep. from different area in Fujian, Sichuan and Jiangxi provinces. **Results** The DNA fingerprints of genuine and non-genuine Chinese herbs were compared and it was suggested that the herbal populations growing in different area in above three provinces had different genus characteristics. **Conclusion** RAPD technique is a valuable tool for identification of genuine Chinese herbs.

Key words *Alisma orientalis* (Sam.) Juzep.; genuine Chinese herbs; RAPD markers; population; genetic variation

泽泻为泽泻科泽泻属植物 *Alisma orientalis* (Sam.) Juzep.,主产福建、四川、江西等地,药材分别称为“建泽泻”、“川泽泻”和“江泽泻”,以福建、四川产者最为著名,其中又以建泽泻质量最佳,被载入中国道地药材的南药^[1],建泽泻、川泽泻和江泽泻其植物形态、生药性状基本一致,因加工方法的不同,外观略有差异。为了揭示“道地”药材的生物学本质及三者之间的遗传变异的大小,采用 RAPD 技术对以上 3 种泽泻进行其遗传多样性研究,旨在为泽泻类道地药材的栽培、繁育与质量评价提供依据。

1 材料与方法

1.1 植物材料: 建泽泻采于福建龙海角美。川泽泻采于四川成都新繁。江泽泻采于江西广昌驿前。

1.2 DNA 提取分离: 采用改进的 CTAB 法,取新鲜叶片 0.8 g,提取步骤详见文献^[2]。

表 1 16个引物对 3个产地的泽泻 DNA 扩增结果

| 引物名称 | 序列 (5'→3') | 总标记数 |
|------|------------|------|
| S108 | GAAACACCCC | 14 |
| S198 | CTGGCGAACT | 19 |
| S158 | GGACTGCAGA | 22 |
| S188 | TTCAGGGTGG | 14 |
| S18 | CCACAGCAGT | 24 |
| S178 | TGCCCAGCCT | 17 |
| S148 | TCACCACGGT | 21 |
| S168 | TTTGCCCGGT | 24 |
| S88 | TCACGTCCAC | 29 |
| S8 | GTCCACACGG | 17 |
| S11 | GTAGACCCGT | 24 |
| S12 | CCTTCACGCA | 17 |
| S38 | AGGTGACCGT | 16 |
| S78 | CGAGTGGGTG | 26 |
| S28 | GTGACGTAGG | 20 |
| S15 | GGAGGTTGTT | 17 |

1.3 PCR 反应: 扩增总体积 25 μL,其中 2.5 μL

收稿日期: 2001-08-06

基金项目: 厦门市卫生局医学科学技术进步基金科研资助项目

作者简介: 胡珊梅 (1957-),女,江西省南昌市人,1982年毕业于江西中医学院药学系中药专业,获学士学位,1983年留校任教;1988年在该院读中药鉴定及资源开发专业研究生,1991年7月毕业,获硕士学位,同年开始从事药品检验工作。本人长期致力于中药品质的鉴定研究,发表论文十余篇,获部级中医药科技进步奖 1 项。近年来应用分子生物学技术,进行了福建名贵地道药材的研究,发表论文 2 篇。

10× buffer, Mg²⁺ 2 mmol/L, dNTP 1 mmol/L, 引物 15 ng (名称及序列见表 1), DNA 模板 50 ng, 0.5 U Taq 酶, 加超纯水至 25 μL

2 结果与分析

采用改进的 CTAB 法, 提取了 3 种不同产地的泽泻总基因组, 获得了较完整的基因组 DNA (片段大小约 23 kb) (图 1) 从 22 个 10-mer 随机引物中, 筛选出 16 个有效引物, 获得了清晰稳定重现性好的基因组 DNA 多态性指纹图谱, 每个引物产生的标记数在 3 ~ 12 之间, 共得到 321 个 RAPD 标记 (表 1); 多态性标记 68 个, 为一种泽泻所特有的标记有 14 个, 其中川泽泻 7 个, 江泽泻 7 个, 建泽泻与川泽泻共有的标记 28 个。以引物 S168 S148 信号强, 特征性明显 (图 2)。据 UPGA 分析, 建泽泻与川泽泻的遗传距离最近为 0.2, 与江泽泻的遗传距离为 0.55; 而川泽泻与江泽泻最远为 0.86 (表 2)。



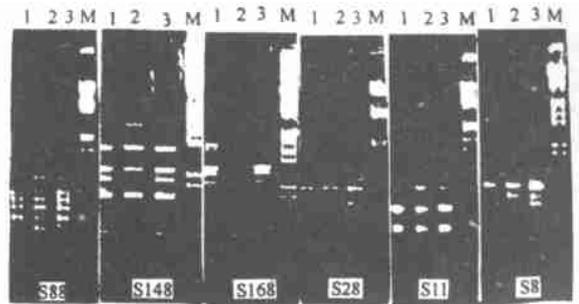
图 1 基因组 DNA 琼脂糖凝胶电泳图谱

3 小结与讨论

3.1 泽泻为一个广布种, 地理位置约为东经 92°至 132°, 北纬 26°至 62°之间, 气温、土壤、水分等生态因子差别很大。从 UPGA 分析结果看, 泽泻多态位点率为 19.5%, 说明同一基因的植物在不同的外界环境条件下所形成的大大小小的居群产生了遗传变异, 有的居群变异使之表现为质优效佳的药材, 称为道地药材, 因此表型差异即道地性是遗传变异的结果

3.2 遗传距离分析结果表明: 建泽泻与川泽泻的遗传距离最近, 而江泽泻与二者均较远, 说明前两者遗

传特征相似, 而后者却产生了较大的遗传变异。这与历来认为泽泻以建泽泻和川泽泻质量较好, 又以建泽泻质量最优的传统道地药材的评价标准及多年来临床实践证明的结果是一致的。



1 建泽泻 2 川泽泻 3 江泽泻
M λ DNA Eco RI/Hind III 分子量标记

图 2 6 种引物对 3 个不同产地泽泻样品的扩增图谱

表 2 遗传距离相似性矩阵

| | 建泽泻 | 川泽泻 | 江泽泻 |
|-----|------|------|-----|
| 建泽泻 | 0 | | |
| 川泽泻 | 0.2 | 0 | |
| 江泽泻 | 0.55 | 0.86 | 0 |

3.3 本次实验反复多次证明 RAPD 标记重现性好, 可以从分子水平定量定性地揭示道地药材的遗传变异。引物 S168 可以较好地鉴别这 3 种泽泻, 因此可作为鉴别 3 种不同产地泽泻的特异性引物。

致谢: 本课题样品采集得到四川省药检所王野、伍丕娥, 福建龙海药检所谢正理、黄汉融及江西省药检所张光文和广昌县药检所曾祥祯的大力帮助, 特此致谢!

参考文献:

[1] 胡世林. 中国道地药材 [M]. 哈尔滨: 黑龙江科学技术出版社, 1989.

[2] 胡珊梅, 张启国, 周涵韬, 等. 珍稀中草药金钱莲的 RAPD 研究 [J]. 中草药, 2000, 31 (12): 944-946.

(上接第 154 页)

凝血因子, 致使肺小动脉血栓形成而造成肺循环阻力增加。尤其以肺心病急性发作常伴有高凝状态, 因而在常规治疗的基础上配合中医益气活血法加以治疗。此方所治证属肺气虚损、脉络瘀阻、气虚血瘀所致的病症。方中黄芪能补脾肺之气, 且能升举阳气, 为补气要药, 党参大补元气, 鼓动血脉, 气行则血行。

当归尾、川芎既能活血祛瘀以调经, 又能行气开郁而止痛, 被称为血中之气药。赤芍、桃红活血祛瘀, 三棱、炮山甲破血逐瘀, 瘀祛则血行, 血行则气旺, 地龙通行经络。因“气为血帅, 血为气母”, 调整好“气血”, 补益心肺, 活血化瘀, 就能达到改善肺部血液循环。