

图 2 鸡血藤聚类树状图

Fig 2 Clustering analysis of Caulis Spatholobi

HPLC 指纹图谱分析, 结果表明正品鸡血藤中有 11 个峰, 和已知对照品相比较, 其中, 峰 1, 2, 5, 7, 8 和 9 分别是原儿茶酸、对羟基苯甲酸、大豆黄素、刺芒柄花素、樱黄素和大黄素。

4.2 11 个峰中, 其中非共有峰 6 个, 共有峰 5 个: 分别是峰 1(原儿茶酸)、峰 5(大豆黄素)、峰 7(刺芒柄花素)、峰 8(樱黄素)、峰 10(大黄素); 共有峰的相对保留时间分别为: 0.046, 0.664, 1.000, 1.198, 1.383, 相对峰面积分别为: 0.819, 0.221, 1.000, 0.331, 0.458。11 个色谱峰作为鸡血藤色谱峰的特性, 可作为鸡血藤的 HPLC 指纹图谱的特征。

4.3 鸡血藤及其混淆品的 HPLC 指纹图谱特征有一定差别, 5 个共有峰在各混淆品中是缺失的, 故各自相对保留时间和相对峰面积都有不同, 从而达到鉴别的目的。如厚果鸡血藤和大血藤 5 个共有峰都没有, 白花油麻藤缺峰 5, 亮叶崖豆藤缺峰 1, 光叶崖豆藤缺峰 1 和峰 10, 香花崖豆藤缺峰 8 和 10, 红鸡血藤、昆明鸡血藤均缺峰 5 和峰 8。

4.4 以 11 个色谱峰为特征峰, 运用模糊聚类对其进行分析, 结果表明 18 个样品能较好地分成两大类, 很明显地区分鸡血藤的正品及其混淆品种。

4.5 聚类方法曾采用了系统聚类方法, 数据运用对数转换、平方根、标准化等, 聚类距离运用了欧氏距离、马氏距离、兰氏距离、卡方; 运算方法采用离差平方和等多种方法, 其结果均不理想。后采用模糊聚类分析方法, 以中心化转换数据, 绝对指数计算聚类距离。其结果较好, 与经典形态鉴定具有一致性, 能达到鉴定的目的。

References

[1] Chen D, Xu G J, Xu L S Study on the properties of *Spatholobus suberectus* Dunn [J]. *J Chin Med Mater* (中草药), 1993, 16(8): 21-24.  
 [2] Kang Q Y, Feng M G *Practical Statistics and DPS Data Processing System* (实用统计分析及其 DPS 数据处理系统) [M]. Beijing: China Agricultural Press, 2002.

## 牛膝的 rDNA ITS 序列分析

王淑美<sup>1</sup>, 梁生旺<sup>1\*</sup>, 周开亚<sup>2</sup>, 刘忠权<sup>2</sup>, 冯卫生<sup>1</sup>, 吴明侠<sup>1\*</sup>

(1. 河南中医学院 药物分析学科, 河南 郑州 450008; 2. 南京师范大学遗传资源研究所, 江苏 南京 210097)

摘要: 目的 探讨不同产地牛膝的 ITS 的序列变异, 为鉴别牛膝提供 DNA 分子标记。方法 利用特异性 PCR 技术对牛膝的 rDNA ITS 区碱基序列进行测定, 报道了牛膝的 rDNA ITS 区的碱基序列。结果 得到核糖体 DNA 中的 ITS 及 5.8 S rDNA 完全序列, 18 S 和 26 S rDNA 部分序列, 共约 650 bp。牛膝与川牛膝及土牛膝碱基序列有明显差异, 不同产地、不同栽培品种牛膝碱基序列无差异。结论 此法可用于牛膝种间及真伪品鉴别。

关键词: 分子鉴定; 牛膝; PCR; 序列分析

中图分类号: R282.710.3

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2004)05-0559-04

### Ribosomal rDNA ITS sequence analysis of root of *Achyranthes bidentata*

WANG Shu-mei<sup>1</sup>, LIANG Sheng-wang<sup>1</sup>, ZHOU Kai-ya<sup>2</sup>, LIU Zhong-quan<sup>2</sup>,  
FENG Wei-sheng<sup>1</sup>, WU Ming-xia<sup>1</sup>

(1. Department of Pharmaceutical Analysis, Henan College of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China;

2. Institute of Genetic Resources, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China)

Abstract: Object To study the correlation between ITS sequence variation of root of *Achyranthes*

\* 收稿日期: 2003-08-11

基金项目: “九五”国家科技攻关项目(99-929-01-06)

作者简介: 王淑美(1966—), 女, 山东省海阳市人, 1990 年毕业于上海医科大学药化专业, 2001 年获硕士学位, 河南中医学院药物分析学副教授, 硕士生导师, 主要从事药物质量控制研究。Tel: (0371) 5680562 E-mail: ShmWang@sina.com

\* 通讯作者 Tel: (0371) 5961380 E-mail: Swliang371@163.com

*bidentata* Blume from different habitat to provide their DNA molecular marker for identification of *A. bidentata*. **Methods** To determine rDNA ITS base sequence by peculiar PCR technology. **Results** The completed sequence of ITS and 5.8 S rDNA, and the partial sequence of 18 S rDNA and 26 S rDNA of root of *A. bidentata* were obtained. They are about 650 bp. There is obvious diversity among the roots of *A. bidentata*, *Cyathula officinalis* Kuan, and *A. aspera*, while there is no difference among the roots of *A. bidentata* from different habitat and by different cultivation breeds. **Conclusion** The method can be used to identify the root of *A. bidentata* among different species and to differentiate its fakes.

**Key words:** molecular identification; the root of *Achyranthes bidentata* Blume; PCR; sequence analysis

牛膝为苋科植物牛膝属牛膝 *Achyranthes bidentata* Blume 的根,具有补肝肾,强筋骨,活血通瘀,引血下行之功效<sup>[1]</sup>。关于牛膝的化学成分及药理研究报道颇多。由于高等植物核糖体 rDNA ITS 区的 DNA 序列的进化速率较快<sup>[2]</sup>,且与植物生活型呈相关性,近年已被广泛用于种内变异和种间、近缘属间的分子系统学研究<sup>[3-5]</sup>。尽管苋科很多植物用于分子系统学研究,但到目前为止仍没有牛膝的 DNA 序列的报道。本实验对牛膝的 rDNA ITS 区序列进行了测定,为鉴别牛膝提供 DNA 分子标记。

## 1 材料

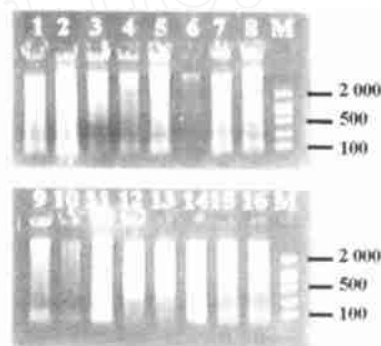
1.1 牛膝药材采自河南、安徽、山东、河北、内蒙古等地,经河南中医学陈随清博士鉴定为苋科植物牛膝属牛膝 *A. bidentata* Blume 的根,符合《中华人民共和国药典》2000 年版一部规定。

1.2 仪器与试剂:水浴恒温箱;电泳装置;微量离心机;紫外线观察装置及照相设备;PTC-200 型 PCR 仪;ABI 310 全自动测序仪(PE 公司)。脱皮甾酮对照品(含量>98.0%,由本实验室自制);DL 2000 (Takara 公司);CTAB 抽提液[50 mmol/L Tris-HCl pH 8, 0.7 mol/L NaCl, 10 mmol/L EDTA pH 8, 2% CTAB, 40 mmol/L 2-巯基乙醇(使用前迅速加入)];TE 缓冲液:Tris-HCl pH 8.0, 10 mmol/L EDTA; 1 mmol/L Taq 酶,其他试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

2.1 总 DNA 提取:取牛膝药材粉末约 5 g,用液氮于研钵中研磨成粉末状,将研磨好的组织粉末装入 2 个 5 mL 的离心管中(以便重复实验)。向离心管中加入 3 mL 65 预热的 CTAB 抽提液,65 水浴加热 45 min,其间上下颠混 2~3 次。取出离心(10 000 r/min),取上清液,加入等体积氯仿-异戊醇(24:1)温和颠倒 5 min 后,离心 10 min,取上清液,再用氯仿-异戊醇重复抽提一次。小心吸取上清液,加入 2.5 倍体积的无水乙醇和 1/10 体积的 3 mol/L NaAc,混匀,置入 -20 冰箱中约 1 h,以沉淀

DNA。10 000 r/min 离心 15 min,轻轻倒掉乙醇。用 70% 乙醇清洗 2 次,每次清洗后 10 000 r/min 离心 2 min,轻轻倒掉残留的乙醇,自然晾干管内的 DNA,加入适量的 TE 或 ddH<sub>2</sub>O 溶解 DNA,最后用 DNA 纯化试剂盒纯化 DNA,4 贮存备用。用 1%~0.8% 的琼脂糖进行电泳检测(TBE 系统)。见图 1。从图中可见,所有样品均提取出 DNA,且量较大(样品 1~16 见表 1)。



M-DNA Marker DL 2000

图 1 DNA 提取物电泳图谱

Fig 1 Agarose gel electrophoresis of DNA extracted from various *A. bidentata*s

2.2 PCR 扩增及产物纯化:根据东川芎 *Cnidium officinale* Makino 18 S rDNA<sup>[6]</sup> 及菊科 (*Hypochorisis*) 属 26 S rDNA 的序列设计出 ITS 的扩增引物 P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub>。P<sub>1</sub> 5'-CGTAACAA GGTTCCTCCG TAGGTGAAC-3', 位于 18S 上; P<sub>2</sub> 5'-TTATTGATATGCTTAAACTCAGCGGG-3', 位于 26S 上;由上海生物工程有限公司合成,用 ddH<sub>2</sub>O 配成 10 pmol/L 溶液待用。

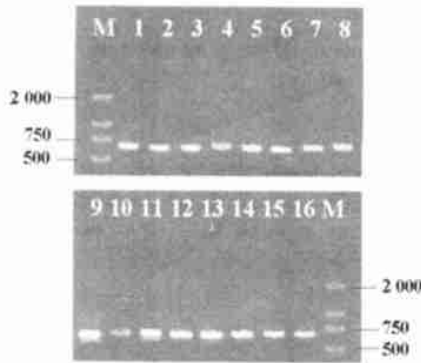
PCR 反应体积 30 μL,反应液含 10 mmol/L Tris-HCl pH 8.3, 50 mmol/L KCl, 1.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 0.1% Triton · X-100, 2.0 mmol/L dNTPS, 引物 P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub> 各 10 mmol/L, 1 U Taq 酶和模板 DNA 约 100~150 ng,用 ddH<sub>2</sub>O 补足体积。反应物在 PTC-200 型 PCR 仪上进行,循环参数为 95

，预变性 4 m in，然后经 95 变性 40 s，52 退火 40 s，72 复性 2 m in，完成 30 个循环后，72 延伸 7 m in 补齐。以 dd H<sub>2</sub>O 代替模板 DNA 作空白对照。扩增完后，PCR 产物用 Watson 试剂盒纯化，按试剂盒操作指南进行。取 PCR 反应液 5 μL 于 1.0% 琼脂糖凝胶上用 1×TBE 电泳缓冲液电泳；溴化乙锭显色后在紫外灯下拍照，见图 2。从图中检测结果看，所有样品 PCR 扩增产物效果良好。

表 1 不同产地牛膝样品

Table 1 Samples of *A. bidentata* from different habitat

样品	样品名称及品种	产地
1	土牛膝	四川
2	川牛膝	四川
3	牛膝	安徽亳州
4	牛膝	山东泰安岱岳区二郎坟
5	牛膝	山东泰安宁阳县
6	白牛膝	河南武陟大封驾部村
7	牛膝(风箐棵)	河南武陟大封驾部村
8	牛膝(园叶)	河南武陟大封驾部村
9	牛膝	内蒙赤峰
10	牛膝	河北安国市郑章乡新安村
11	牛膝(黑桃纹)	河南武陟大封驾部村
12	牛膝(特肥)	河南武陟大封驾部村
13	牛膝	河南武陟大封唐廊村
14	牛膝	河南武陟大封东宋村
15	牛膝	河南武陟大封驾部村
16	牛膝	河南武陟大封驾部村



M-DNA M marker DL 2000 (Takara)

图 2 PCR 产物电泳图谱

Fig 2 Agarose gel electrophoresis of PCR products

2.3 DNA 序列测定: 用 BigDye™ 测序试剂盒 (PE · Applid · Biosystems) 进行测序反应, 测序参数为: Mix 1 μL, 纯化后的 DNA 片段 15~45 ng, Primer 1.6 pmol, 缓冲液 1.2 μL, ddH<sub>2</sub>O 适量。测序反应条件为: 95 预变性 5 m in, 95 30 s, 50 20 s, 60 4 m in, 共 30 个循环。扩增产物纯化后用 10 μL TSR 溶解。热循环仪上变性 2 m in, 移入全自动测序专用管, 用 AB I310 全自动测序仪进行序列测定。操作过程按产品说明书。

2.4 DNA 序列数据分析: 不同产地牛膝样品见表 1, 序列分析结果见图 3。ITS-1 和 ITS-2 的起止范围

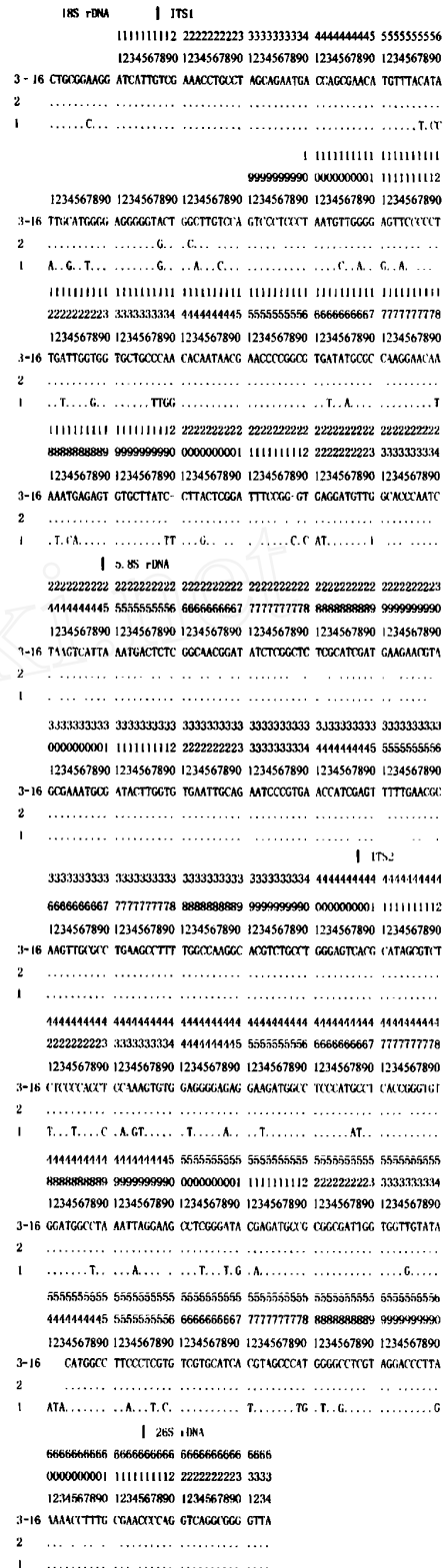


图 3 不同产地牛膝的碱基序列图

Fig 3 Alignment of ITS-1, 5.8S rDNA and ITS-2 nucleotide sequence of 16 samples of *A. bidentata* from different habitats

参照菟科植物 rRNA 基因 ITS 片段序列确定, 所得 DNA 序列输入计算机后, 用 ClustalW 软件对序列进行对位排列, 并输入人工校对。以尽量减少排列所需缺失的数目。得到的序列用 MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 1.02) 软件进行系统发生分析。在图中 18 S, 26 S 及 5.8 S 用阴影部分所示, “·”表示具相同碱基, “-”表示缺失, 序列上方的数字为排序后的各碱基的位置编号。

2.5 碱基序列大小: 共测得 16 个牛膝样品 ITS-1, 5.8 S rDNA 和 ITS-2 全序列 18 S rDNA 基因 3 端和 26S rDNA 基因 5' 端部分碱基序列, 共约 630 bp。其中 ITS-1 约为 230 bp, 5.8 S rDNA 约为 160 bp, ITS-2 约为 209 bp (见表 2)。

表 2 ITS-1, 5.8 S rDNA, ITS-2 的碱基大小及 G+C 的含量

Table 2 Size and G+C contents of ITS-1, 5.8 S rDNA, and ITS-2 sequence

样品	ITS-1		5.8 S rDNA		ITS-2		总计
	/bp	G+C/%	/bp	G+C/%	/bp	G+C/%	
1	231	51.3	160	50.6	209	52.6	600
2	231	51.3	160	50.6	206	56.8	597
3~16	231	51.3	160	50.6	206	56.8	597

### 3 讨论

3.1 通过对 16 个牛膝样品序列分析可知, 不同产地牛膝基因变异不大, 种间有明显差异, 且差异均在 ITS-区内, 川牛膝 ITS-1 有差异, 土牛膝 ITS-1 及 ITS-2 均有差异, 说明 ITS 区易变异。此方法可用于牛膝种间及真伪品鉴别, 不能用于鉴别地道药材。

3.2 牛膝属菟科植物牛膝含大量牛膝多糖, 在提取 DNA 时与 DNA 一起沉淀, 常常像凝胶一样, 很难去除, 并抑制随后 PCR 中 DNA 多聚酶的活性。通

过 DNA 纯化的方法可以去除这些物质。其药用部位为根茎类且多糖含量高, 故药材提取量要大, 用 5 mL 离心管, 大体积抽提。

3.3 实验过程中发现, 提取的 DNA 用 5  $\mu$ L 点样电泳检测, 有时并不能看到 DNA, 但并不意味着没有抽提到 DNA。可以继续 PCR 扩增, 将 DNA 模板适当增多, 有时同样可得到好的 PCR 扩增产物。只有检测不到 PCR 扩增产物才能确定没有抽提到 DNA。

3.4 PCR 扩增产物用试剂盒纯化后, 如果电泳检测产物仍不纯, 一般可采取提高反应条件(如退火温度), 切胶纯化、克隆纯化等措施。本实验的 3 号样品即采用克隆技术才达到良好的测定效果。

### References:

- [1] Ch P (中国药典) [S]. 2000 ed.
- [2] Wang X Q, Li Z N. The application of sequence analysis of rDNA fragment of the systematic study of the subfamily Cyrtandroideae (Gesneriaceae) [J]. *Acta Phytotaxon Sin* (植物分类学报), 1998 (36): 97.
- [3] Baldwin B G, Sanderson M J, Porter J M, et al. The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny [J]. *Ann Missouri Bot Gard*, 1995 (82): 247-277.
- [4] Sang T, Crawford D J, Stuessy T F. Documentation of reticulate evolution in peonies (Paeonia) using internal transcribed spacer sequences of nuclear ribosomal DNA: implication for biogeography and concerted evolution [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995 (92): 6813.
- [5] Cerbah M, Souza-Chies T, Jubier M F, et al. Molecular phylogeny of the genus hypochaeris using internal transcribed spacers of nuclear rDNA: inference for chromosomal evolution [J]. *Mol Biol Evol*, 1998 (15): 345.
- [6] Fushimi H, Komatsu K, Isobe M, et al. A new approach for the identification of a Chinese traditional medicine, "Chuan-xiong" by 18 S ribosomal RNA gene sequences [J]. *Phyto-medicine*, 1996 (3): 387.

## 盾叶薯蓣根状茎不同部位和不同生长期薯蓣皂苷元含量的差异性研究

曹玉芳<sup>1,2</sup>, 王太霞<sup>1,3</sup>, 胡正海<sup>1\*</sup>

(1. 西北大学植物研究所, 陕西 西安 710069; 2. 莱阳农学院生命科学学院, 山东 莱阳 265200; 3. 河南师范大学生命科学学院, 河南 新乡 453002)

**摘要:** 目的 揭示盾叶薯蓣根状茎不同部位和不同生长期中皂苷的积累与分布以及薯蓣皂苷元含量的差异。方法 组织化学和高效液相色谱法(HPLC)。结果 皂苷主要分布在基本组织内, 有小维管束分布的区域皂苷积累最丰富, 薯蓣皂苷元的含量也最高; 其次是无维管束分布的区域; 有大维管束分布的区域皂苷积累最少, 薯蓣皂苷元的含量最低。结论 雄株 3 个区域的皂苷元含量均明显的高于雌株, 雌雄同株其含量界于雄株和雌株之间。

\* 收稿日期: 2003-08-30

作者简介: 曹玉芳(1963—), 男, 山东莱西市人, 博士生, 副研究员, 主要从事植物学、药用植物学和结构植物学的教学与科研工作, 已发表论文 30 余篇。Tel: (0535) 2922145

\* 通讯作者 Email: zhenghaihu@yahoo.com.cn