

• 药材与资源 •

绞股蓝 RAPD 标记及序列分析

周娟, 罗育, 吴耀生*, 李科志, 徐鹏, 赵瑞强

(广西医科大学 生物化学与分子生物学教研室, 广西 南宁 530021)

摘要:目的 利用绞股蓝 RAPD 标记有效鉴别绞股蓝及其伪品。方法 用 19 条引物对 17 个绞股蓝样品和一个乌菰样品进行 RAPD-PCR 扩增, 并对绞股蓝 DNA 特异条带克隆测序及序列分析。结果 获得一个绞股蓝 RAPD 标记。经克隆测序, 8 个序列高度保守, 片段长度在 766~770 bp, 相似性均在 97% 以上。结论 获得的 RAPD 标记可以作为合成探针的基础, 用于鉴别绞股蓝及其伪品。

关键词: 绞股蓝; RAPD 标记; 序列分析

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2010)10-1692-05

Sequence analysis of RAPD markers related to *Gynostemma pentaphyllum*

ZHOU Juan, LUO Yu, WU Yao-sheng, LI Ke-zhi, XU Peng, ZHAO Rui-qiang

(Department of Biochemistry and Molecular Biology, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China)

Abstract: Objective The study is to identify the medicinal plant *Gynostemma pentaphyllum* and its fake called *Cayratia japonica* through the RAPD markers. **Methods** Nineteen random primers screened were applied to amplifying the total DNA extracts of 18 samples with RAPD and the specific fragments of *G. pentaphyllum* were analyzed by cloning and sequencing. **Results** A RAPD marker of *G. pentaphyllum* was acquired. The result of sequence analysis indicated that the length of eight sequences is 766~770 bp and the identities of them are over 97%. **Conclusion** The RAPD marker acquired could provide a basis for making probe to distinguish *G. pentaphyllum* and its spurious breed.

Key words: *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Markino; RAPD marker; sequence analysis

绞股蓝 *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino 为葫芦科绞股蓝属内分布最广、资源最丰富的主要药用植物种类^[1]。具有抗肿瘤^[2]、调节脂代谢^[3]、抗衰老^[4]、增强免疫功能^[5]等多种药理作用, 但由于其遗传背景混乱, 又易于与乌菰 *Cayratia japonica* (Benth.) Gagnep 混淆^[6], 严重影响了临床用药的安全性和加工产品的质量。笔者已获得了可以区分绞股蓝及乌菰新鲜样品的 RAPD 图谱。但由于入药的绞股蓝是经过加工处理的干燥品, DNA 模板有一定程度降解, 即使使用相同随机引物, 以干燥样品与新鲜样品作为模板也可能获得不同的 RAPD 图谱。绞股蓝的特异分子标记研究, 目前除本课题组外国内尚未见有报道。本研究利用已筛选出的 19 条随机引物, 对不同来源的 17 份绞股蓝干燥样品和 1 份乌菰干燥样品进行 RAPD-

PCR 扩增, 以期获得绞股蓝新鲜样品与干燥样品材料均有的特异条带, 从而对特异条带进行克隆测序及序列分析, 完善利用 RAPD 技术在分子水平上进行药材鉴别^[7-9]。

1 材料与方法

1.1 材料: 26 份实验材料中 18 份为干燥样品, 8 份为新鲜样品。绞股蓝及乌菰新鲜品均由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鉴定。种质材料及来源见表 1。

1.2 试剂和仪器: TaqDNA 聚合酶、M109 感受态细胞、X-gal、IPTG、BamH I、Hind III 均购自 Takara 宝生物工程有限公司; 10 碱基随机引物均由上海生工生物工程有限公司合成; 十六烷基三甲基溴化铵 (CTAB)、乙二胺四乙酸 (EDTA)、氯仿等均为国产。PCR 仪型号为 T1 Thermocycler (Bionetra),

①收稿日期: 2010-05-23

基金项目: 广西科学基金资助项目(桂科基 0731065); 广西区教育厅硕士研究生科研创新项目(2008105981001M228)

作者简介: 周娟(1982-), 女, 硕士, 研究方向为药用植物分子生物学。E-mail: zhoujuan1213@163.com

* 通讯作者 吴耀生 Tel: (0771) 5358817 E-mail: wuyao-sheng03@sina.com

表 1 26 份材料的来源及分类

Table 1 Twtewty six materials used for RAPD and their origins

编号	样 品	采集地或购买地	产 地	采集或购买时间	备 注
JG1	绞股蓝	广西药用植物园	广西南宁	2007-06	烘干样品
JG2	绞股蓝	广西南宁水街药材铺	广西金秀	2007-06	商品药材
JG3	绞股蓝	广西药用植物园	广西南宁	2007-06	烘干样品
JG4	绞股蓝	广西金秀	广西金秀	2008-10	烘干样品
JG5	绞股蓝	广西金秀	广西金秀	2008-10	烘干样品
JG6	绞股蓝	广西药用植物园	广西南宁	2007-06	烘干样品
JG7	绞股蓝	广西大明山	广西大明山	2007-06	烘干样品
JG8	绞股蓝	广西金秀	广西金秀	2008-10	烘干样品
JG9	绞股蓝	购于广西南宁药店	陕西	2007-06	绞股蓝茶叶
JG10	绞股蓝	贵州	贵州	2008-12	商品药材
JG11	绞股蓝	湖南	湖南	2008-07	商品药材
JG12	绞股蓝	购于广西南宁药店	湖南常德	2007-06	绞股蓝茶叶
JG13	绞股蓝	广西医科大学校园	广西南宁	2007-06	烘干样品
JG14	绞股蓝	广西桂林药材批发站	广西桂林	2007-06	商品药材
JG15	绞股蓝	广西南宁淡村农贸市场药材铺	广西荔浦	2007-06	商品药材
JG16	绞股蓝	广西南宁淡村农贸市场药材铺	广西扶绥	2007-06	商品药材
JG17	绞股蓝	广西南宁水街药材铺	广西靖西	2007-06	商品药材
W	乌菰莓	广西凌云	广西凌云	2007-06	烘干样品
J1	绞股蓝	广西药用植物园	广西南宁	2007-06	新鲜样品
J2	绞股蓝	广西凌云	广西凌云	2007-06	新鲜样品
J3	绞股蓝	广西药用植物园	广西南宁	2007-06	新鲜样品
J4	绞股蓝	广西金秀	广西金秀	2008-10	新鲜样品
J5	绞股蓝	广西金秀	广西金秀	2008-10	新鲜样品
J6	绞股蓝	广西药用植物园	广西南宁	2007-06	新鲜样品
J7	绞股蓝	广西大明山	广西大明山	2007-06	新鲜样品
J8	绞股蓝	广西金秀	广西金秀	2008-10	新鲜样品

凝胶成像系统为 UVI—7600Z 型。Smart spec™-plus 核酸蛋白测定仪(BIO-RAD Lab, Inc, USA.) TGLL218K 台式高速冷冻离心机(太仓市华美生化仪器厂)。

1.3 方法

1.3.1 总 DNA 提取: 采用改良的 CTAB 法^[10] 分别提取绞股蓝和乌菰莓新鲜样品 DNA 及干燥样品 DNA。1. 5% 琼脂糖凝胶电泳检测所得 DNA。用核酸蛋白测定仪测 260、280 nm 波长处吸光值(A), 得到 A₂₆₀, A₂₈₀, A₂₆₀/A₂₈₀ 及稀释后 DNA 浓度, 并确定提取总 DNA 的纯度和浓度。

1.3.2 引物: 在前期实验中以 8 份不同种质的绞股蓝新鲜样品为材料, 筛选出 19 条适合于绞股蓝 RAPD 分析的随机引物。

1.3.3 RAPD 扩增体系: 使用 25 μL 反应体系和优化的扩增程序, 即 10× Buffer 2.5 μL, 25 mmol/L Mg²⁺ 2μL, 10 μmol/L 10 碱基随机引物各 1 μL, Ex Taq DNA 聚合酶 1 U, 模板 DNA 60 ng 左右。RAPD-PCR 扩增程序为: 94℃预变性 3 min, 然后按 94℃变性 50 s, 37℃退火 50 s, 72℃延伸 120 s, 进行 40 个循环, 最后 72℃延伸 10 min, 4℃保存待测。取 10 μL 扩增产物, 用 1. 5% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.3.4 克隆绞股蓝特异 DNA 条带的选择: 选择 10 号引物扩增 17 份绞股蓝干燥样品材料 RAPD 图谱中重复性好、迁移率相同的一条约 750 bp 的 DNA 片段进行克隆。在 17 份绞股蓝干燥样品中得到的这条特异条带与 8 份新鲜绞股蓝中得到的特异条带片段电泳迁移率一致。而乌菰莓新鲜样品及干燥样品在相应电泳位置没有此条带。

1.3.5 绞股蓝特异 DNA 条带的克隆及测序: 采用 8 份新鲜绞股蓝为材料, 用 10 号引物扩增得到约 750 bp 的 DNA 片段。用胶回收试剂盒回收纯化, 将纯化后的 DNA 片段与 pMD18-T Vector 载体连接, 转化 JM109 感受态细胞, 通过蓝白筛选得到阳性重组体, 用质粒 DNA 小量提取试剂盒提取质粒, BamH I、Hind III 双酶切鉴定。将阳性克隆送至北京三博远志公司测序。

1.3.6 DNA 序列分析: 使用 Vector NTI 软件分析测序结果。运用 NCBI 基因数据库中的 Blast 程序对绞股蓝特征条带进行同源性比对。

2 结果

2.1 19 条随机引物干燥样品材料的 RAPD 扩增结果: 19 条随机引物扩增 17 份绞股蓝干燥样品得到的条带相对分子质量集中在 200~ 2 000 bp, 而新鲜样品扩增

条带相对分子质量集中在 500~3 000 bp, 干品扩增条带相对分子质量明显变小。干燥样品扩增条带数目多, 相对分子质量接近, 电泳图谱呈梯形。其中 10 号引物在 17 份绞股蓝干燥样品中扩增获得一条与 8 份绞股蓝新鲜样品位点一致的区别于乌菰的特异条带, 相对分子质量分别约为 750 bp(图 1~3)。

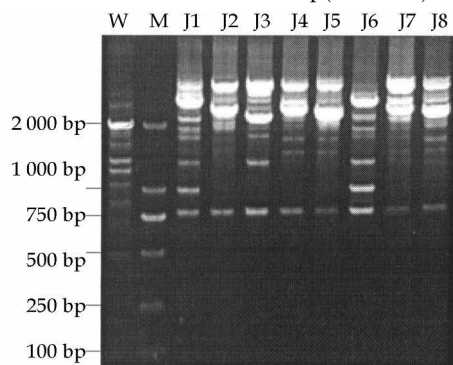


图 1 绞股蓝新鲜品 J1~J8 和乌菰扩增结果

Fig 1 Amplification of wet samples of *G. pentaphyllum* J1~J8 and *C. japonica*

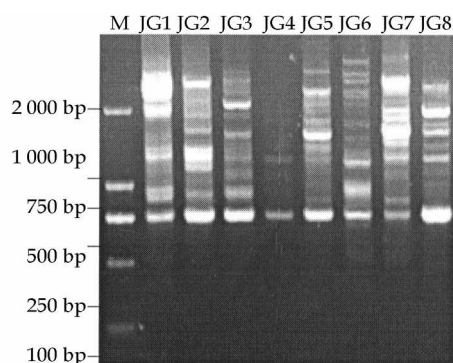


图 2 绞股蓝干品 JG1~JG8 扩增结果

Fig 2 Amplification of dried samples of *G. pentaphyllum* JG1~JG8

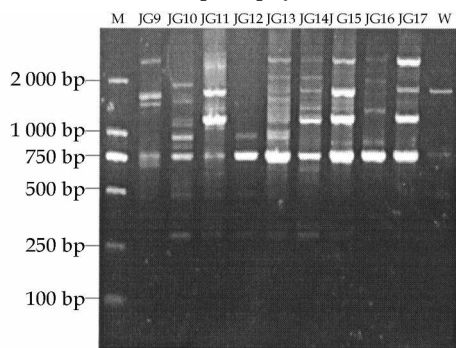


图 3 绞股蓝干品 JG9~JG17 和乌菰扩增结果

Fig 3 Amplification of dried samples of *G. pentaphyllum* JG9~JG17 and *C. japonica*

2.2 阳性重组质粒的鉴定: 阳性重组质粒经载体插入位点两端的 *Bam*H I 和 *Hind* II 限制性内切酶双

酶切, 均得到相对分子质量大于 2 000 bp 的质粒 DNA 和两个目的片段, 相对分子质量大小均为 500、270 bp(图 4)。这是由于克隆目的片段中含有限制性内切酶位点。这两个片段相对分子质量和大小与预期结果一致。经测序后证实, 克隆目的片段中确定含有 *Hind* II 限制性内切酶酶切位点。

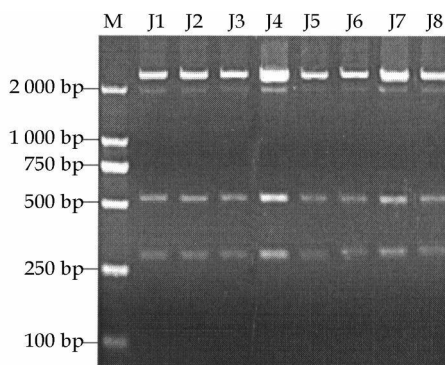


图 4 8 个重组质粒酶切鉴定图

Fig 4 Identification of eight recombinants

2.3 8 条绞股蓝特异 DNA 带序列一致性分析: 将引物 10 扩增绞股蓝新鲜样品 J1 得到约 750 bp 的特异 DNA 序列命名为 J1-150, 其他 7 份绞股蓝新鲜样品的特异 DNA 序列依次类推。8 条序列相似性均在 97% 以上, 属于高度保守序列。8 条序列共有 35 个碱基位点不同, 分布于不同部位。主要集中在两个部分: 20~170 碱基位点和 530~750 碱基位点, 可能是绞股蓝 DNA 的多态性区域(见图 5, 6)。8 条 DNA 序列的长度和一致性分析结果见表 2。

```

ATTTTCCATGATCAGTATAAGTTAAAAAACTACAACATACATGTA
ATTTTCCATGATCAATATAAGTTAAAAAACTACAACATACATGTA
ATTTTCCATGATCAGTATAAGTTAAAAAACTACAACATACAGTA
ATTTTCCATGATCAGTATAAGTTAAAAAACTACAACATACATGTA
ATTTTCCATGATCAGTATAAGTTAAAAAACTACAACATACATGTA
ATTTTCCATGATCAGTATAAGTTAAAAAACTACAACATACAGTA
ATTTTCCATGATCAGTATAAGTTAAAAAACTACAACATACAGTA
ATTTTCCATGATCAGTATAAGTTAAAAAACTACAACATACAGTA

```

图 5 1~8 号序列碱基位点 100~145 的比对结果 (Vector NII)

Fig 5 Alignment of base sits 100~145 of sequences 1~8 by Vector NII

```

TAATATTTGTGAGTGTTTCGGGTCAGTTTACACGTAACCTTC
TAATATTTGTGAGTGTTTCGGGTCAGTTTACACGTAACCTTC
TAACATTTGTGAGTGTTTCGGGTCAGTTTACACGTAACCTTC
TAATATTTGTGAGTGTTTCGGGTCAGTTTACACGTAACCTTC
TAATATTTGTGAGTGTTTCGGGTCAGTTTACACGTAACCTTC
TAATATTTGTGAGTGTTTCGGGTCAGTTTACACGTAACCTTC
TAATATTTGTGAGTGTTTCGGGTCAGTTTACACGTAACCTTC
TAACATTTGTGAGTGTTTCGGGTCAGTTTACACGTAACCTTC

```

图 6 1~8 号序列碱基位点 525~563 的比对结果 (Vector NII)

Fig 6 Alignment of base sits 525~563 of sequences 1~8 by Vector NII

表 2 8 条绞股蓝序列长度及一致性比较

Table 2 Length and consistency comparison of eight sequences of *G. pentaphyllum*

条带长度/bp	绞股蓝特异 DNA 带编号	J1-750	J2-750	J3-750	J4-750	J5-750	J6-750	J7-750	J8-750
769	J1-750	100 0%							
766	J2-750	97.7%	100 0%						
768	J3-750	99.3%	98.0%	100 0%					
767	J4-750	98.6%	98.2%	99.0%	100 0%				
770	J5-750	98.3%	97.4%	98.4%	98.8%	100 0%			
769	J6-750	99.9%	97.8%	98.7%	98.4%	100 0%			
766	J7-750	98.3%	97.8%	99.2%	98.6%	98.4%	100 0%		
769	J8-750	98.1%	97.5%	98.4%	99.0%	98.3%	98.2%	98.8%	100 0%

2.4 8 条绞股蓝特征带序列生物信息学分析: 8 条绞股蓝特异 DNA 序列经 Blastn 分析, 结果显示 8 条序列与 99 个来自其他物种的基因序列有部分相似性, 但相似位点片段在 40~90 bp, 整体同源性较小(图 7)。将这 8 条序列提交到 NCBI 进行开放阅读框架 ORF 的识别, 结果显示, 这 8 条序列有两种相同的可能的编码区域, 分别编码 48 和 45 个氨基酸。这两个 ORF 区, 是否编码蛋白及有何功能还有待进一步的研究。该 8 条序列含有大量 A 和 T, A 和 T 的量约为 68%。经酶切位点分析, 8 条序列均含有 11 种内切酶的酶切位点, 其中序列 J1-750、J6-750 有一个 *Ssp* I 酶切位点, J3-750、J4-750、J5-750、J7-750、J8-750 有 2 个 *Ssp* I 酶切位点, J2-750 有 3 个 *Ssp* I 酶切位点, 其他 10 种内切酶在 8 条序列的酶切位点均为单一酶切位点(表 3)。

3 讨论

本研究在前期工作的基础上, 利用筛选出的 19 对 RAPD 随机引物对绞股蓝干燥样品进行扩增, 获得一条绞股蓝新鲜样品和干燥样品共有的约



图 7 序列 J1-750 与 GenBank 中已知 DNA 序列比对得到的相似片段分布

Fig 7 Distribution of similar fragment aligning J1-750 with GenBank's sequences

表 3 8 条绞股蓝序列酶切位点分析

Table 3 Restriction site analysis of eight sequences of *G. pentaphyllum*

内切酶	酶切位点序列
<i>Acc</i> 65 I	G/GTACC
<i>Aha</i> III	TTT/AAA
<i>A</i> sp 718 I	G/GTACC
<i>Bbv</i> II	GAAGACNN/
<i>Bcl</i> I	T/GATCA
<i>Bsc</i> 91 I	GAAGACNN/
<i>Dra</i> I	TTT/AAA
<i>Hind</i> III	A/AGCTT
<i>Kpn</i> I	GGTAC/C
<i>Ssp</i> I	AAT/ATT
<i>Vsp</i> I	AT/TAAT

750 bp 的特异条带, 而乌菰莓没有扩增出此条带。将得到的 8 个克隆测序后, 发现这是一段高度保守的序列。通过 NCBI 中 Blast 比对, 未发现同源性较高的序列, 说明这是一段新发现的 DNA 序列。该段序列含有 11 种酶切位点, 根据其分布位点可选用内切酶 *A* cc65 I、*A* sp 718 I 中的任何一种与 *B* bv II 或者与 *B* sc91 I 进行双酶切可将该标记两端随机引物结合的部分切除后制为探针, 可以减轻杂交背景, 提高检测效率。也可选取合适的限制性内切酶, 对该扩增产物进行酶切, 获取 Cleaved amplified polymorphic sequence (CAPs) 分子标记。CAPs 是一种以 PCR 为基础的分子标记(又称为 PCR-RFLP)。CAPs 更为稳定可靠、快速有效, 并且对基因染色体的变化尤其是单核苷酸变异更为灵敏^[11]。

汪小全^[12]等报道, 从干样品中提取的 DNA 模板可获得与鲜样品同等的扩增效果, 从同一个体的干叶和鲜叶片中提取的 DNA 模板可获得完全一致的扩增产物; DNA 模板严重降解对 RAPD 产物有一定影响。而本研究中发现, 绞股蓝新鲜样品与干燥样品的 RAPD 图谱存在一定差别。绞股蓝干燥样品扩增出来的条带与新鲜样品相比, 2 000 bp 以上的大片段明显减少, 而 750 bp 以下的小片段明显

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