

用 RAPD 分析法对铁线莲属 7 种中药的鉴定研究

成都军区昆明总医院药剂科(昆明 650032)

张 荣* 邵建本 田学明

杨 静 张步振 叶 浩

摘 要 用 RAPD 法对铁线莲属 7 种生药的鉴定〔即山棉花 *Clematis chrysocoma* Fr.、三叶五香血藤 *C. fasciculifolia* Fr.、小九头狮子草 *C. ranunculoides* Fr.、小木通 *C. armandii* Fr.、红叶铁线莲 *C. rubifolia* C. H. Wright、红钉耙藤 *C. brevicaudata* DC.、和铁线莲 *C. florida* Thunb.〕。结果表明 RAPD 种间差异明显而同种不同产地差异不明显。

关键词 铁线莲属 RAPD 鉴定

RAPD(Randomly Amplified Polymorphic DNA)是最近发展起来的一种新的分子标记方法^[2],被广泛应用于生物学中^[3,4]。该方法与 RFLP 分析类似,也可以检测 DNA 多态性。但检测的不是限制性内切酶切片段长度多态性,而是随机引物的 PCR 特异扩增的多态性。故其操作简单、快速,不使用 Southern 杂交,仅通过 PCR 反应就可以完成。因此,采用 RAPD 方法用于生物类中药的鉴定研究,以期探研出一种直接采用 DNA 对生物类中药进行鉴定的新方法。

1 材料和方法

1.1 生药:为铁线莲属 7 种植物^[1](表)。标本存成都军区昆明总医院,实验材料取地上部分,晒干备用。

表 实验材料

| 编号 | 名 称 | 产地 |
|----|--|------|
| 1 | 山棉花 <i>Clematis chrysocoma</i> Fr. | 云南昆明 |
| 2 | 三叶五香血藤 <i>C. fasciculifolia</i> Fr. | 云南昆明 |
| 3 | 小九头狮子草 <i>C. ranunculoides</i> Fr. | 云南昆明 |
| 4 | 红叶铁线莲 <i>C. rubifolia</i> C. H. Wright | 云南景洪 |
| 5 | 小木通 <i>C. armandii</i> Fr. | 云南景洪 |
| 6 | 小木通 <i>C. armandii</i> Fr. | 云南昆明 |
| 7 | 红钉耙藤 <i>C. brevicaudata</i> DC. | 云南昆明 |
| 8 | 铁线莲 <i>C. florida</i> Thunb. | 云南昆明 |

1.2 试剂:引物:10~mer 引物购自中国科学院。Tag 酶;购自美国 PE 公司。

1.3 PCR 仪:购自美国 PE 公司,型号为

Perkin Elmer Cetus DNA Thermal Cycler480。

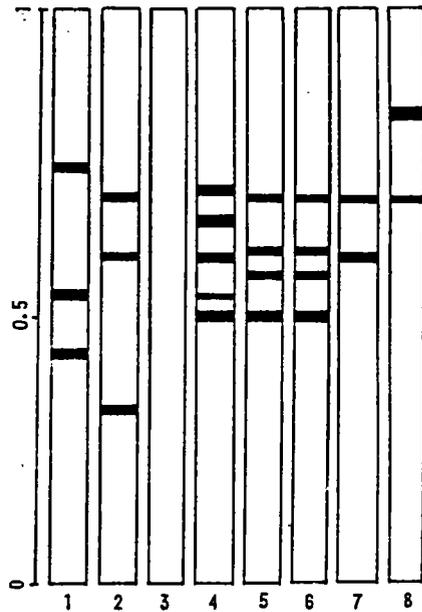


图 7 种铁线莲属生物的 β -10 引物扩增谱

1-山棉花 2-三叶五香血藤 3-小九头狮子草 4-红叶铁线莲 5-小木通(景洪) 6-小木通(昆明) 7-红钉耙藤 8-铁线莲

1.4 方法:DNA 提取:取 1g 材料研碎,加入 20ml 提取缓冲液(8mol/L Urea, 0.4mol/L NaCl, 0.05 mol/L Tris-HCl, pH 8.0, 0.02mol/L EDTA, 2% Sarcosyl, 5% Phenol)于 60℃保温 30min,用等体积的氯仿提取后,

* Address: Zhang Rong, Department of Pharmacy, Kunming General Hospital, Chengdu Military Region, Kunming

上清液再用等体积的苯酚-氯仿-异戊醇(25:24:1)抽提1次,用无水乙醇沉淀后将沉淀的DNA离心分离,再用70%酒精洗两遍后干燥,溶于适量TE中冻存。

RAPD反应:扩增总体积为25 μ l,其中含10mmol/L Tris-Cl(pH8.3),2.0mmol/L, MgCl₂, dATP, dCTP, dTTP, dGTP各0.1mmol/L,引物为0.2 μ mol/L,50ng核DNA,1.5单位Tag酶。整个扩增程序为94 $^{\circ}$ C1min,36 $^{\circ}$ C2min,72 $^{\circ}$ C2min,经45个循环后,再在72 $^{\circ}$ C延伸5min。扩增产物在1.4%的琼脂糖中电泳,经EB染色,在紫外灯下观察并照像。

2 结果与讨论

对40个引物进行扩增实验,结果5个引物扩增出谱条,如 β -10引物扩增(图)。结果表明种间有明显差异而种内差异不明显,如图中5、6号皆为小木通,但6号产昆明,5号

产景洪,其扩增产物一致。本研究初步表明RAPD作为一种鉴定方法是合理的,同时,由于本研究采用干燥的材料,因此对干燥的植物类中药的鉴定就更有实际应用价值。

在本研究中发现,Tag酶用1单位,没有用1.5单位好;循环由30增到45个后,扩增效果较好;对于不同的扩增材料,扩增优化条件也不相同,而优化条件对成功的扩增极为重要。

参考文献

- 1 江苏新医学院.中药大辞典.上、下册.上海:上海科学技术出版社,1986
- 2 Williams J G K, et al. Nucl Acids Res. 1990,18:36531
- 3 Lee Woong Bin, et al. Korean Journal Plant Tax, 1993, 23(2):35
- 4 Adams R P, et al. Theoretical Applied Genet, 1993, 87 (1~2):22

(1995-10-27 收稿)

Identification of Seven Species of *Clematis* (*Clematis* L.) by RAPD Analysis

Zhang Rong, Shao Jienben, Tian Xueming

Identification of seven species of *Clematis* L. (*C. chrysocoma* Fr., *C. armandii* Fr., *C. fasciculifolia* Fr., *C. ranunculoides* Fr., *C. rubifolia* C. H. Wright, *C. florida* Thunb. and *C. brevicaudata* DC.) was studied by RAPD analysis. Results showed that the differences of RAPD between different species were significant, but nonsignificant between same species obtained from different localities.

一年生延胡索块茎的研究

安徽中医学院药理学系(合肥 230038) 胡珂* 梁益敏

摘要 采集野生延胡索 *Corydalis yanhusuo* 的种子,在苗圃中播种,栽培,发现其出苗率与种子的大小及成熟度有关。对其1年生块茎的生长形态及内部结构进行观察,其虽为双子叶植物,但出苗时仅1枚子叶,皮层有分泌组织,形成层发达,而木质部、韧皮部均不发达。

关键词 延胡索种子 块茎 栽培 解剖

延胡索 *Corydalis yanhusuo* W. T. Wang
ex Z. Y. Su et C. Y. Wu 为多年生草本,无

毛,野生于丘陵坡地林下,也可栽培生长。其地上茎高5~25cm,茎生叶,互生全裂,披针

* Address: Hu Ke, Department of Pharmacy, Anhui College of Traditional Chinese Medicine, Hefei